

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**RODRIGO VIEIRA GOMES**

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO  
EPIDÉRMICO (EGFR) COMO FATOR PROGNÓSTICO NO  
COLANGIOCARCINOMA**

**Belo Horizonte**

**2016**

**RODRIGO VIERIA GOMES**

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO  
EPIDÉRMICO (EGFR) COMO FATOR PROGNÓSTICO NO  
COLANGIOCARCINOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Linha de Pesquisa: Bases Moleculares das Neoplasias

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Resende

Belo Horizonte

2016

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

## **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

## **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

## **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

## **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**

Profa. Dra. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo (Coordenador)

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Sub-coordenador)

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Representante discente: Taise Miriam Cruz Mosso Ramos

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que  
me insere na busca, não aprendo nem ensino.”

Paulo Freire

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vivian Resende, minha orientadora, por me incentivar no campo da pesquisa científica e por estar sempre presente e contribuindo com grande sabedoria e entusiasmo para o desenvolvimento do nosso trabalho.

À Profa. Dra. Paula Teixeira Vidigal e Prof. Dr. Eduardo Paulino Junior, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, pela pareceria na realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, Coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela parceria e disponibilização do Laboratório para a realização da imuno-histoquímica.

À Profa. Dra. Michele Ângela Rodrigues, do Laboratório de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo auxílio na realização da imuno-histoquímica.

À Dra. Karine Araújo Damasceno, da Fiocruz - Salvador (BA), pelo auxílio na realização e interpretação da imuno-histoquímica.

À Profa. Dra. Carla Jorge Machado, do Departamento de Medicina Social e Preventiva da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Dimitri Bassani Santos Neves, Designer do Centro de Informática em Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo auxílio na formatação das ilustrações.

Aos professores e colegas da Cirurgia do Aparelho Digestivo e da Endoscopia Digestiva do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo, que foram muito importantes para esses últimos anos de Residência Médica e Mestrado.

À minha amada esposa, Ana Júlia Barros Diniz Gomes, pelo amor, companheirismo e incentivo em busca da minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus pais, Luiz Pedro de Freitas Gomes e Maria das Graças Vieira Gomes, que são os responsáveis por tudo que consegui conquistar até hoje.

## RESUMO

O colangiocarcinoma (CCA) é um tumor maligno originado no epitélio dos ductos biliares, tem mau prognóstico e pouca resposta à quimioterapia. É considerado o segundo câncer primário mais comum no fígado. Com o aumento em sua incidência associado à falta de tratamento eficaz, pesquisas tem sido realizadas para identificar fatores que possam interferir no prognóstico e descobrir novos alvos terapêuticos. Estudos internacionais já demonstraram que a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é fator relacionado a pior prognóstico no CCA, porém os resultados ainda são controversos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão do EGFR, por meio de imunohistoquímica, e verificar sua associação com fatores prognósticos e a sobrevida dos pacientes. Foram coletados dados clínicos e laboratoriais de pacientes com diagnóstico de colangiocarcinoma no período de 2008 a 2015, e as peças de ressecção cirúrgica (n=30) ou biópsias (n=11) desses pacientes foram submetidas a exame histológico e estudo imunohistoquímico para avaliar a expressão do EGFR. Não houve diferença significativa na proporção entre homens (n=22) e mulheres (n=19). A média de idade dos pacientes foi de 58 anos, variando de 28 a 83 anos. Houve menor proporção de tabagistas, etilistas e de cálculos biliares. A expressão do EGFR foi considerada positiva em 28,6% dos casos e não esteve associada à classificação anatômica e nem à arquitetura polipóide ou não-polipóide. Entre os 17 casos de CCA polipóides, 5 (29,4%) foram positivos para o EGFR e 12 (70,6%) foram negativos. A expressão do EGFR esteve associada aos casos mais avançados (estádios III e IV) e à menor sobrevida dos pacientes (média de 14,4 meses nos positivos para o EGFR e 41,8 meses nos negativos). A sobrevida global foi de 30,5 meses e a sobrevida em 12, 24 e 36 meses foi de 78,3%, 48,9% e 21,1%, respectivamente. Outros fatores que se associaram a menor sobrevida foram a localização intra-hepática dos tumores e o baixo nível sérico de bilirrubina (0 a 4 mg/dL). Concluímos que a expressão do EGFR nos colangiocarcinomas esteve associada a pior prognóstico, mas serão necessários estudos multicêntricos com maior número de casos para confirmar tal achado e avaliar a real importância desse receptor como alvo terapêutico.

Palavras-chave: Colangiocarcinoma; Câncer do trato biliar; Receptor do fator de crescimento epidérmico; Prognóstico; Sobrevida.

## ABSTRACT

Cholangiocarcinoma is a malignant tumor originated in the epithelium of the bile ducts. Is the second commonest primary hepatic cancer. It shows poor prognosis and poor response to chemotherapy. Today, with the increase in incidence and the lack of effective treatment, there is an increased interest of research centers to identify factors that may influence the prognosis of patients and to find possible targets for cancer treatment. The expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in these tumors has proved as bad prognostic factor in some international studies, but the results are still controversial. The aim of this study was to evaluate the expression of EGFR in patients with CCA, and its association with prognostic factors and survival. Clinical and laboratory data and surgical specimens, resection (n = 30) or biopsy (n = 11), of patients with CCA were analyzed. EGFR expression was assessed by immunohistochemistry. There was no significant difference in the proportion of men (n = 22) and women (n = 19). The average age of patients was 58 years, ranging from 28 to 83 years. There was a lower proportion of smokers, alcoholics and gallstones. Overexpression of EGFR has occurred in 28.6% of cases. The EGFR expression was not associated with anatomical classification nor the papillary architecture or non-papillary. Among 17 cases of papillary CCA, 5 (29.4%) were positive for EGFR and 12 (70.6%) were negative. The EGFR expression was associated with more advanced cases (stages III and IV) and lower patient survival (median 14.4 months in positive for EGFR and 41.8 months in the negative). Overall survival was 30.5 months and survival at 12, 24 and 36 months was 78.3%, 48.9% and 21.1%, respectively. Other factors that were associated with lower survival were intrahepatic location of tumors and low serum bilirubin levels (0-4 mg / dL). In conclusion, EGFR expression in cholangiocarcinoma was associated with worse prognosis, but will be necessary multicentric studies with larger number of cases to confirm this finding and to assess the real importance of this receptor as a therapeutic target.

Keywords: Cholangiocarcinoma; Cancer of the biliary tract; Epidermal Growth Factor Receptor; Prognosis; Survivorship.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Terapia-alvo em colangiocarcinoma. *Chin J Cancer Res* 2015(5). ..... **18**
- Figura 2.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA intra-hepático nodular. **(a)** Coloração pela HE mostrando proliferação intensa dos ductos. **(b)** Expressão uniforme do EGFR em mais de 50% do tumor. **(c, d)** Detalhes da expressão do EGFR que é forte e com membrana completa, escore 3. .... **31**
- Figura 3.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA intra-hepático polipóide. **(a)** Coloração pela HE mostrando crescimento intraductal do tumor com arquitetura papilífera. **(b, c)** Expressão membranar difusa do EGFR em mais de 50% do tumor. **(d)** Expressão forte, membrana completa do EGFR, escore 3. .... **32**
- Figura 4.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA no colédoco distal. **(a)** Coloração pela HE mostrando crescimento exofítico polipóide com arquitetura papilífera. **(b)** Expressão difusa em mais de 50% do tumor, de intensidade moderada. **(c)** Detalhe de uma papila na qual observa-se um eixo central e células cilíndricas com núcleos alongados e hipercromáticos dispostos em fila na região basal da célula, o citoplasma é abundante e rico em mucina (HE). **(d)** Moderada expressão do EGFR, membrana completa, escore 2..... **33**
- Figura 5.** **(a)** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA peri-hilar. **(a)** Fraca expressão em mais de 50% do tumor. **(b, c)** Áreas tubulopapilíferas com fraca expressão do EGFR. **(d)** Membrana incompleta, escore 1. .... **34**
- Figura 6.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA distal. **(a)** Coloração pela HE mostrando lesão ocupando o lúmen do ducto. Observar a parede do ducto e tecido pancreático. **(b)** Expressão negativa de EGFR em 100% do tumor. **(c)** Detalhe da arquitetura papilífera (HE). **(d)** Expressão negativa do EGFR, escore zero. .... **35**
- Figura 7.** Intensidade de expressão do EGFR em CCA. Cortes corados pela HE à esquerda (a,c,e,g) e imuno-histoquímica para o EGFR à direita (b,d,f,h). **(b)** Membrana completa, forte, escore 3. **(d)** Membrana completa, moderada, escore 2. **(f)** Membrana incompleta, fraco, escore 1. **(h)** Negativo, escore zero. .... **36**

**Figura 8.** Colangiocarcinoma intra-hepático não-polipóide. Tomografia computadorizada do fígado em corte axial **(a)** e coronal **(b)**, mostrando CCA nos segmentos 4a e 4b (setas). Observa-se dilatação das vias biliares à esquerda. Delimitação do fígado esquerdo de cor escura **(c)**, devido à isquemia pelo acometimento circunferencial do ramo esquerdo da veia porta pelo tumor, que tem aparência nodular **(d)**. Aspecto microscópico do CCA corado pela HE **(e)**, mostrando intensa proliferação dos ductos, que expressam forte marcação de membrana pelo EGFR na imuno-histoquímica **(f)**..... **39**

**Figura 9.** Colangiocarcinoma intra-hepático polipóide. **(a)** Ressonância Magnética em corte axial do fígado mostrando lesão nos ductos intra-hepáticos segmentares à direita (seta). **(b)** Corte coronal mostrando tumor que preenche o lúmen dos ductos segmentares e se estende até a região proximal do ducto hepático direito (seta). **(c)** Aspecto macroscópico da lesão com crescimento exofítico e polipóide, ocupando grande extensão intraductal. **(d)** Colangiorressonância evidenciando interrupção do fluxo biliar e dilatação das vias biliares, em local correspondente à lesão vista em c. **(e)** visão ampliada do tumor ocupando o lúmen de ductos segmentares menores (seta). **(f)** Aspecto microscópico mostrando o tumor ocupando o lúmen dos ductos (HE). ..... **40**

**Figura 10.** Colangiocarcinoma peri-hilar não-polipóide. **(a)** Colangiorressonância magnética mostrando dilatação das vias biliares intra-hepáticas e falha de enchimento na região da confluência dos ductos hepáticos direito e esquerdo (seta). **(b, c)** Proliferação dos ductos com arquitetura predominantemente tubular (HE). **(d)** Expressão fraca do EGFR na imuno-histoquímica..... **41**

**Figura 11.** CCA polipóide do colédoco distal. **(a)** Aspecto macroscópico do tumor que apresenta crescimento exofítico (seta). **(b)** Observa-se tumor com arquitetura papilífera ocupando o lúmen do ducto (HE). **(c)** Detalhe da arquitetura papilífera (HE). **(d)** Metástase em linfonodo retrocoledociano (seta) (HE). ..... **42**

**Figura 12.** Curva de sobrevida geral, pelo método de kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinomas. .... **45**

- Figura 13.** Curva de sobrevivência pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, de acordo com a expressão positiva ou negativa de EGFR. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,007$ , Wilcoxon  $p=0,010$ . ..... **45**
- Figura 14.** Curva de sobrevivência pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, segundo a classificação anatômica. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,034$ , Wilcoxon  $p=0,139$ . ..... **46**
- Figura 15.** Curva de sobrevivência pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, segundo os níveis séricos de bilirrubinas. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,002$ , Wilcoxon  $p=0,008$ . ..... **46**
- Figura 16.** Curva de sobrevivência pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, estádios I e II versus III e IV (TNM, AJCC). Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,098$ , Wilcoxon  $p=0,078$ . ..... **47**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Frequências absolutas e relativas das características demográficas, clínicas, marcadores biológicos e oncológicos dos pacientes com colangiocarcinoma.....	<b>28</b>
<b>Tabela 2.</b> Frequências absolutas e relativas das características anatomoclínicas dos colangiocarcinomas.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3.</b> Expressão do EGFR em relação às variáveis clinicopatológicas. ....	<b>38</b>
<b>Tabela 4.</b> Sobrevida dos pacientes de acordo com as variáveis que tiveram impacto na sobrevida. ....	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCA	Colangiocarcinoma
CCAIH	Colangiocarcinoma Intra-hepático
CCAPH	Colangiocarcinoma Peri-hilar
CCAD	Colangiocarcinoma Distal
EGFR	“Epidermal Growth Factor Receptor”
EGF	“Epidermal Growth Fator”
HB-EGF	“Heparin-Binding EGF-like Growth Factor”
DAB	Diaminobenzidina
AJCC	“American Joint Committee on Cancer”
TNM	Sistema TNM de classificação de tumores malignos
IIQ	Intervalo Interquartílico
DP	Desvio Padrão
HE	Hematoxilina e Eosina
HER2	“Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”
VEGF-A	“Vascular Endotelial Growth Factor”

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODO</b> .....	<b>22</b>
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	22
4.2	PACIENTES .....	22
4.3	COLETA DOS DADOS CLÍNICOS.....	22
4.4	AMOSTRAS .....	23
4.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	24
4.5.1	<i>Preparação das lâminas</i> .....	24
4.5.2	<i>Análise imuno-histoquímica</i> .....	24
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E LABORATORIAIS .....	27
5.2	EXPRESSÃO DO EGFR PELA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	30
5.3	EXPRESSÃO DO EGFR EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS.....	37
5.4	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA .....	43
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O colangiocarcinoma (CCA) é a segunda neoplasia maligna primária mais frequente no fígado e representa cerca de 3% de todos os cânceres gastrointestinais(1). Tem origem do epitélio dos ductos biliares intra ou extra-hepáticos. Foi descrito pela primeira vez por Durand-Fardel em 1840 e pode ser dividido de acordo com sua localização em: intra-hepáticos (CCAIH), peri-hilares (tumores de Klatskin - CCAPH) e distais (CCAD)(2). Na histologia, geralmente, são adenocarcinomas e se apresentam com graus de diferenciação e fenótipos variáveis(3). 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 genéticas(4). A incidência do CCA vem crescendo nos últimos anos, principalmente, na América do Sul e Ásia. O número de casos novos diagnosticados por ano, chega a 16.000 no Japão e 5.000 na América(5).

Uma maior atenção tem sido dedicada ao CCA, devido ao mau prognóstico, somado à pouca eficácia das modalidades terapêuticas, especialmente, para pacientes com doença avançada(6). O estadiamento, tamanho e grau de diferenciação do tumor, margens de ressecção e invasão angiolinfática e perineural tem sido descritos como fatores prognósticos(7). Entre os fatores que contribuem para o mau prognóstico, destaca-se o diagnóstico em fase avançada da doença, que diminui a chance de cura pelo tratamento cirúrgico(8). Mais de 50% dos casos são diagnosticados em fase avançada, levando a uma sobrevida média geral de,

aproximadamente, 7 a 8 meses(9). Pacientes que são submetidos à ressecção cirúrgica apresentam melhor prognóstico, com índice de sobrevida em 5 anos em torno de 30% e sobrevida média de 30 meses(7, 10).

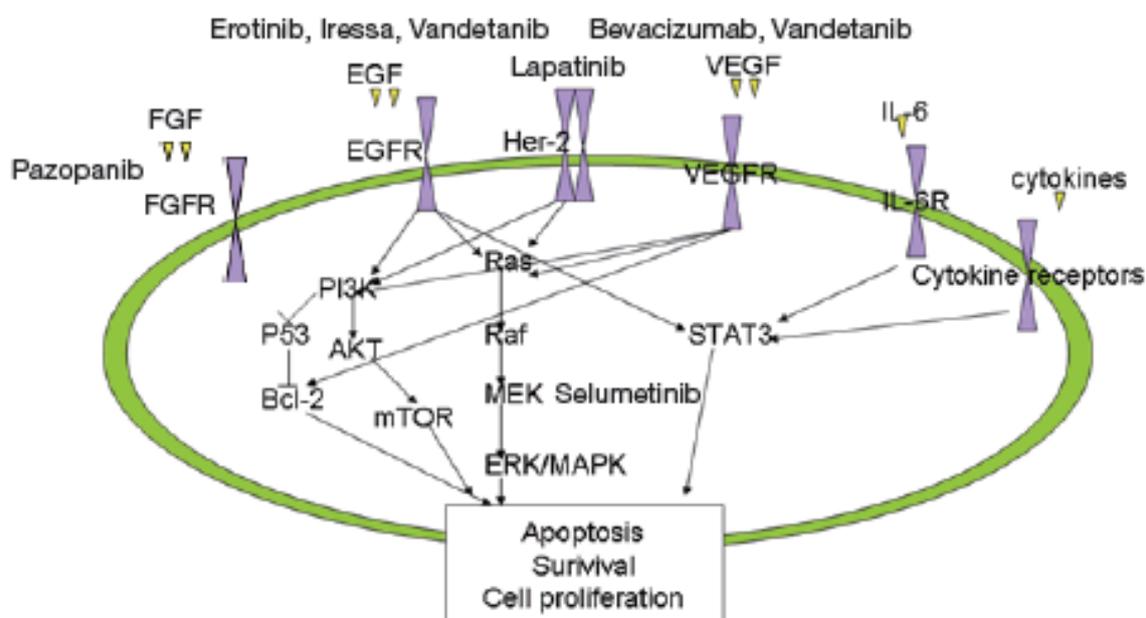
O tipo histológico do CCA também pode influenciar no prognóstico. Dois tipos de colangiocarcinomas são, atualmente descritos, os de crescimento intraepitelial e os de crescimento intraductal, sendo que esses últimos são menos comuns e apresentam prognóstico mais favorável. As neoplasias intraductais macroscopicamente podem ter crescimento exofítico ou polipóide, e têm padrão predominantemente papilífero no exame histológico, podendo também apresentar padrão tubular(11).

A quimioterapia é largamente utilizada, mas com baixas taxas de resposta, sendo difícil a realização de ensaios clínicos randomizados e controlados devido à baixa incidência desses tumores e pequena quantidade de pacientes em um único centro. 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.

Alguns inibidores de fator de crescimento epidérmico (EGF), anticorpos e outras moléculas, como o erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, trastuzumab e lapatinib, vem sendo utilizados no tratamento dos cânceres colorretais, de mama, pulmão e de cabeça e pescoço, com resultados promissores, tendo como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER 2)(9).

O 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, que leva ao aumento do potencial de proliferação celular, de angiogênese, resistência a apoptose e migração (Figura 1), decorrente da ativação da transição epitélio-mesenquimal. Embora a transição epitélio-mesenquimal seja essencial para a embriogênese normal e para processos de cicatrização, sua desregulação pode induzir células cancerígenas a desenvolverem metástases. Ela pode ser induzida por processos moleculares distintos, sendo um deles a ativação de receptores celulares, como o EGFR. No câncer de mama, já foi mostrado que a ativação do EGFR altera a expressão da E-caderina e da vimentina. A ativação do EGFR suprime a expressão da E-caderina, e, como consequência, as células mudam do fenótipo epitelial para o mesenquimal. As cascatas de sinalização mais comuns ativadas pelo EGFR são PI3K/Akt, Ras/Raf/Mek e DAG/IP3 e sinalização CaM, que afetam o ciclo de progressão celular, capacidade de apoptose, angiogênese e motilidade tumoral(31, 32).



**Figura 1.** Terapia-alvo em colangiocarcinoma. *Chin J Cancer Res* 2015(5).

A superexpressão do EGFR em células tumorais esteve relacionada a pior prognóstico em alguns estudos e é encontrada em até 80% dos colangiocarcinomas, fazendo com que esse receptor seja um potencial alvo terapêutico nos portadores desse tipo de neoplasia(12-14).

No presente trabalho analisou-se, por meio de imuno-histoquímica, a expressão do EGFR em peças de ressecção cirúrgica ou biópsias de pacientes com colangiocarcinoma.

## 2 RELEVÂNCIA

Apesar do progresso no entendimento da fisiopatologia dos colangiocarcinomas nos últimos anos, esse conhecimento não refletiu em melhora significativa na sobrevida dos pacientes, principalmente, nos casos de tumores irresssecáveis(15).

O estudo da biologia molecular dos CCA, com identificação de potenciais alvos para o tratamento quimioterápico, é essencial para tornar possível a seleção de pacientes que poderiam se beneficiar do tratamento com fármacos específicos.

Além disso, ainda não existem estudos sobre a expressão do EGFR em CCA na população brasileira. É importante sabermos se em nossa população o comportamento biológico desses tumores é semelhante ao de outros países, nos quais já foram melhor estudados.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar o grau de expressão imuno-histoquímica do EGFR em colangiocarcinomas e verificar seu impacto na sobrevida dos pacientes.

## **4 MÉTODO**

### **4.1 Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP - UFMG). O número de referência do projeto é: CAAE – 37156714.6.0000.5149 (Anexo 5).

### **4.2 Pacientes**

Foram selecionados todos os pacientes com diagnóstico histológico de colangiocarcinoma, que foram submetidos a tratamento cirúrgico no Serviço de Cirurgia do Fígado, Vias biliares, Pâncreas e Baço, do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2015, gerando um total de 41 pacientes, sendo 19 homens e 22 mulheres.

### **4.3 Coleta dos dados clínicos**

Foi realizada coleta retrospectiva entre 2008 e 2010. A partir de 2010 a coleta foi prospectiva conforme protocolo de pesquisa do Serviço. Foram coletados os seguintes dados dos prontuários 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 dados referentes à sobrevida foram obtidos pela consulta nos

prontuários ou por contato telefônico com os familiares, quando as consultas foram interrompidas sem notificação do óbito .

Foram coletados dados referentes aos exames laboratoriais (bilirrubinas, Ca19.9 e CEA). 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, foram revisadas para obter-se a classificação histológica (Tipo de crescimento) em polipóide e não polipóide. A classificação e estadiamento seguiram o padrão TNM da AJCC/UICC (American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer Control – 7ª edição)(16, 17). A classificação TNM, detalhada de acordo com a classificação anatômica, pode ser vista nos anexos 1, 2 e 3.

#### **4.4 Amostras**

As amostras de tecido foram obtidas de peças de ressecção cirúrgica ou de biópsias cirúrgicas de colangiocarcinomas, processadas no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG. Amostras de câncer de vesícula biliar e da ampola hepatopancreática (de Vater) não foram incluídas nesse estudo. Todas as amostras foram fixadas em formaldeído a 10%, embebidas em parafina, cortadas em fragmentos com espessura de 4 micrômetros e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Por apresentarem material insuficiente para análise, dos 41 pacientes com CCA, seis casos, nos quais as biópsias foram obtidas de metástases, tiveram que ser excluídos da análise imuno-histoquímica, que foi realizada em 35 casos. Em

todos esses pacientes, a análise histológica e imuno-histoquímica foi realizada em tecido representativo do sítio primário do tumor, constituídos por 30 peças de ressecção cirúrgica e 5 biópsias.

## **4.5 Imuno-histoquímica**

### **4.5.1 Preparação das lâminas**

As lâminas foram, inicialmente, processadas com pepsina e ácido clorídrico a 37 °C por 30 minutos para a recuperação antigênica e, após, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e o 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*).

Em seguida, o anticorpo foi retirado, colocado o polímero e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. Feita a retirada do polímero, prosseguiu-se com a adição do cromógeno DAB, que foi retirado após ocorrida 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. O protocolo detalhado da imuno-histoquímica pode ser visto no anexo 4.

### **4.5.2 Análise imuno-histoquímica**

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* (17):

- **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(18).

#### **4.6 Análises estatísticas**

A análise descritiva dos dados foi feita por meio de medidas de tendência central, dispersão e amplitude para variáveis contínuas, quais sejam: média e desvio padrão; mediana (percentil 50) e intervalo interquartílico (percentis 25 e 75); valores mínimo e máximo. A análise descritiva para as variáveis categóricas foi feita por meio de distribuição das frequências absolutas e relativas em cada categoria.

Ainda na análise descritiva, com a finalidade de testar a homogeneidade nas categorias de cada variável estudada, foi efetuado um teste de Qui-quadrado ( $n > 4$ ) ou teste exato de Fisher ( $n < 5$ ), considerando a existência de igualdade nas categorias das variáveis como hipótese nula ( $H_0$ ). Assim, para variáveis com duas categorias, a hipótese nula considerada foi que haveria proporção ( $p_r$ ) igual a 50%

em cada categoria (Ho:  $pr=0,5$ ); para três categorias, Ho:  $pr=0,33$ ; para quatro categorias, Ho:  $pr=0,25$ .

Para comparar a distribuição das categorias das variáveis de estudo segundo níveis de EGFR (negativo e positivo) foi feito o teste t de *Student* para as variáveis contínuas, com distribuição gaussiana, e o teste do Qui-quadrado para as variáveis categóricas ( $n>4$ ) ou teste de Fisher ( $n<5$ ).

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 e o teste de Wilcoxon. Foram obtidos, ainda, para os pacientes em geral e por categorias: tempo médio de sobrevivência média com o respectivo intervalo de 95% de confiança; o tempo mediano de sobrevivência e respectivo intervalo interquartilico; e sobrevida (percentual de sobreviventes) aos 12, 24 e 36 meses. Foram obtidos a densidade de incidência do óbito (taxa instantânea de mortalidade), geral, e por categorias das variáveis de interesse.

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5% ( $p<0,05$ ). No caso das análises segundo EGFR, apenas variáveis com completude superior a 70% foram analisadas. Em se tratando das análises de sobrevida, apenas resultados cujas diferenças entre curvas de Kaplan Meier foram significativas foram mostradas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais

A Tabela 1 mostra as características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com CCA. Não houve diferença significativa na proporção entre homens (n=22) e mulheres (n=19). A idade média dos pacientes foi de 58 anos, variando de 28 a 83 anos. Houve menor proporção de tabagistas, de etilistas e de presença de cálculos biliares.

Trinta pacientes foram submetidos a ressecção cirúrgica com intenção curativa e os outros onze foram submetidos a cirurgia paliativa ou apenas biópsia. Foram realizadas 8 (26,66%) hepatectomias direitas, 2 (6,66%) trisegmentectomias direitas e 9 (30%) hepatectomias esquerdas, associadas à ressecção do segmento um, 4 (13,33%) bissegmentectomias (três incluindo os segmentos 2 e 3 e uma dos segmentos 6 e 7). Foram realizadas ainda, 6 (20%) duodenopancreatetectomias e uma (3,33%) ressecção isolada da via biliar extra-hepática.

A Tabela 2 mostra as características anatomoclínicas dos CCA. De um total de 41 casos de colangiocarcinomas, 11 (26,8%) eram intra-hepáticos, 22 (53,7%) peri-hilares e 8 (19,5%) distais. Em relação ao estadiamento TNM, T igual a um foi significativamente inferior a 25% e T igual a quatro foi superior a 25%. Ao iniciarem o tratamento, 5 (12,2%) pacientes estavam com doença no estágio I, 11 (26,8%) no estágio II, 8 (19,5%) no estágio III e 17 (41,5%) no estágio IV. Entre esses, 17 eram polipóides e 18 não-polipóides. Margens cirúrgicas livres de neoplasia foram observadas em 17 (56,7%) pacientes. Linfonodos positivos foram identificados em 10 (33,3%) pacientes. O EGFR foi positivo em 10 (28,6%) e negativo em 25 (71,4%) pacientes.

**Tabela 1.** Frequências absolutas e relativas das características demográficas, clínicas, marcadores biológicos e oncológicos dos pacientes com colangiocarcinoma.

Variáveis	Total (n=41)	Valores de p
<b>Idade</b> Média (DP) Mediana (IIQ) Mínimo; Máximo	58,8 (12,6) 59 (52; 68) 28; 83	NA
<b>Gênero</b> (n; %) Masculino Feminino	22 (53,7) 19 (46,3)	0,755
<b>Tabagismo</b> (n; %) Não Sim	26 (72,2) 10 (27,8)	<b>0,008</b>
<b>Etilismo</b> (n; %) Não Sim	30 (83,3) 6 (16,7)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Comorbidades</b> (n; %) Não Sim	21 (56,8) 16 (46,2)	0,511
<b>Medicamentos</b> (n; %) Não Sim	7 (38,9) 11 (61,1)	0,481
<b>História familiar para câncer</b> (n; %) Não Sim	17 (58,6) 12 (41,4)	0,353
<b>Cálculos biliares</b> (n; %) Não Sim	29 (80,6) 7 (19,4)	<b>&lt;0,001</b>
<b>CA 19.9 U/mL</b> Média (DP) Mediana (IIQ) Mínimo; Máximo	666,4 (1232,7) 113 (12; 931) 1,4; 5430	NA
<b>CEA ng/mL</b> Média (DP) Mediana (IIQ) Mínimo; Máximo	2,7 (1,8) 2,6 (1,3; 3,5) 0,5; 8,0	NA
<b>Bilirrubina mg/dL</b> Média (DP) Mediana (IIQ) Mínimo; Máximo	6,7 (6,6) 5,0 (0,6; 10,1) 0,2; 23,5	NA
<b>Bilirrubina mg/dL</b> 0 a 4 mg/dL 4 a 10 mg/dL ≥ 10 mg/dL	16 (47,1) 9 (26,5) 9 (26,5)	<b>0,089</b> 0,398 0,398
<b>CA199 &gt; 37</b> (n; %) Não Sim	9 (34,6) 17 (65,4)	0,168
<b>Tratamento</b> (n; %) Paliativo Ressecção	11 (26,8) 30 (73,2)	<b>0,004</b>

Notas: as somas nas categorias das variáveis são diferentes devido à ocorrência de valores não encontrados (*missing*), NA: não se aplica.

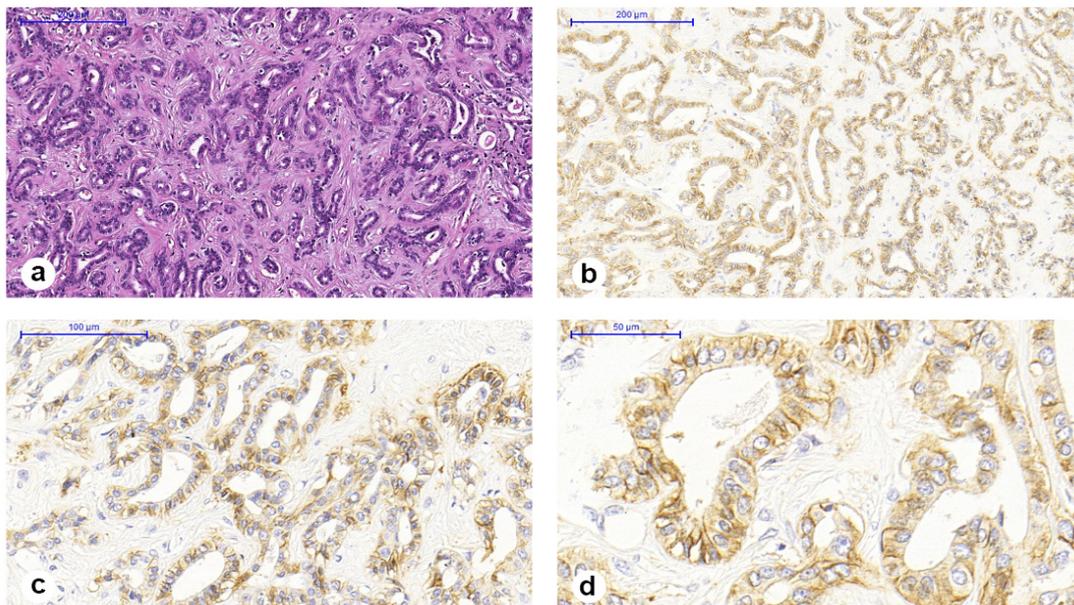
**Tabela 2.** Frequências absolutas e relativas das características anatomoclínicas dos colangiocarcinomas.

Variáveis	Total (n=41)	Valores de p
<b>Classificação Anatômica</b> (n; %)		
Intra-hepático	11 (26,8)	0,069
Peri-hilar	22 (53,7)	0,078
Distal	8 (19,5)	0,062
<b>T</b> (n; %)		
1	4 (9,8)	<b>0,024</b>
2	14 (34,2)	0,176
3	4 (9,8)	<b>0,024</b>
4	19 (46,3)	<b>0,002</b>
<b>Estadiamento</b> (n; %)		
I	5 (12,2)	<b>0,058</b>
II	11 (26,8)	0,790
III	8 (19,5)	0,416
IV	17 (41,5)	<b>&lt;0,015</b>
<b>T &lt; 3</b> (n; %)		
1 e 2	18 (43,9)	0,532
3 e 4	23 (56,1)	
<b>Estadiamento &lt; 3</b> (n; %)		
I e II	16 (39,0)	0,211
III e IV	25 (61,0)	
<b>Margens</b> (n; %)		
Negativas	17 (56,7)	0,585
Positivas	13 (43,3)	
<b>Tipo de crescimento</b> (n; %)		
Polipóide	17 (48,6)	0,856
Não-polipóide	18 (51,4)	
<b>N</b> (n; %)		
Negativos	20 (66,7)	0,067
Positivos	10 (33,3)	
<b>EGFR</b> (n; %)		
Negativo	25 (71,4)	<b>0,017</b>
Positivo	10 (28,6)	

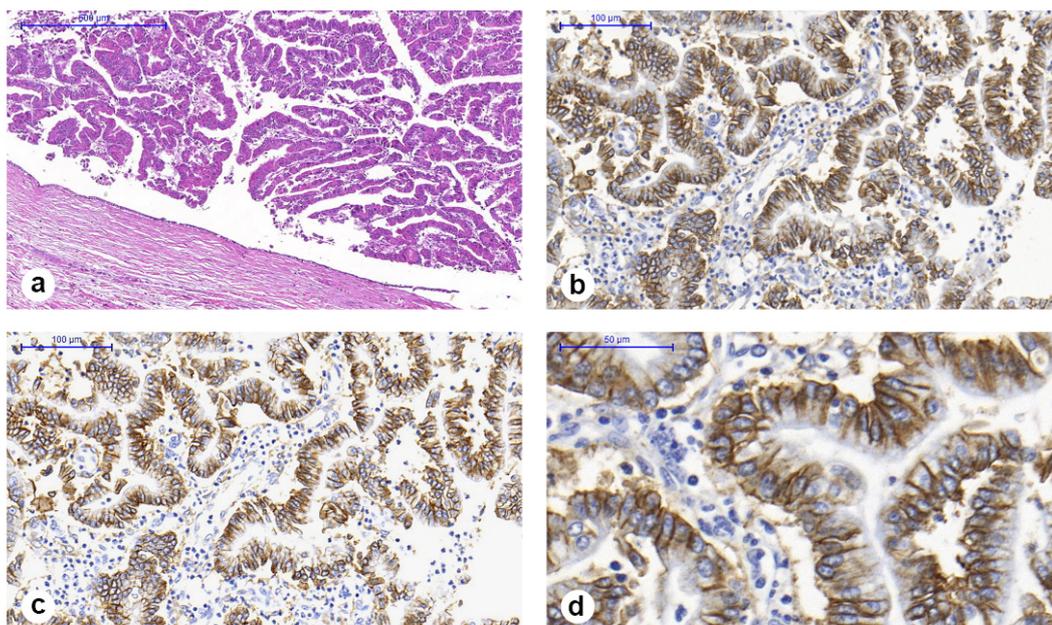
Notas: as somas nas categorias das variáveis são diferentes devido à ocorrência de valores não encontrados (*missing*)

## **5.2 Expressão do EGFR pela imuno-histoquímica**

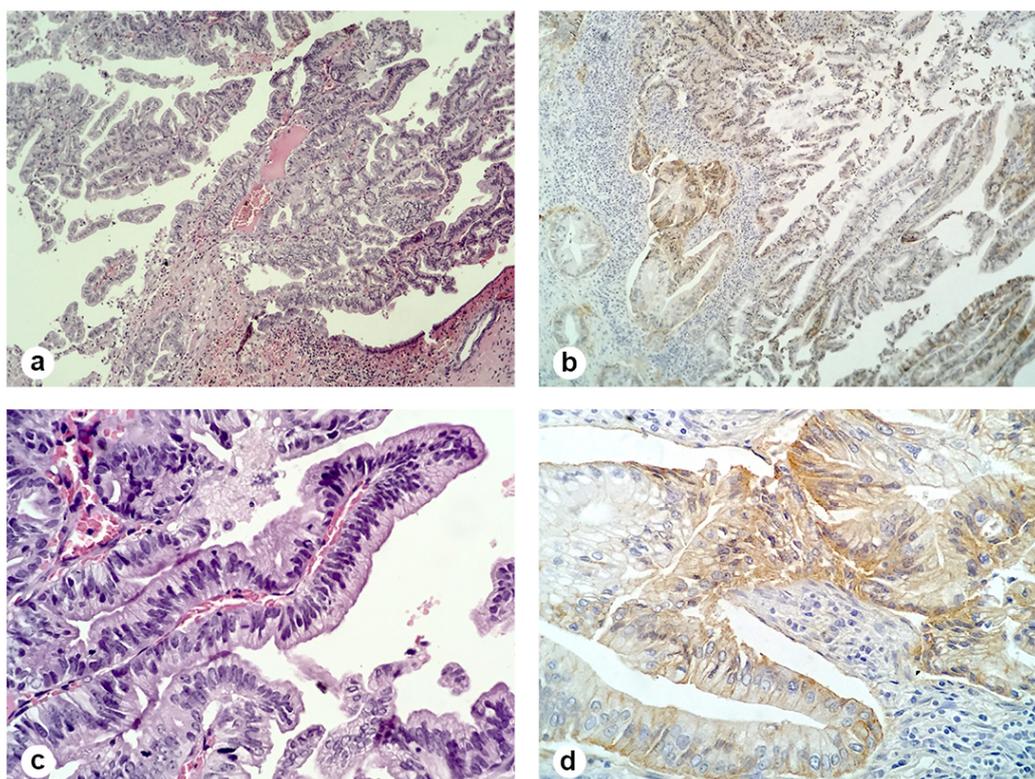
Houve expressão significativa do EGFR em 10 (28,6%) dos 35 colangiocarcinomas, sendo escore 3 em oito pacientes (Figuras 2, 3) e escore 2 em dois pacientes (Figura 4). Em 25 pacientes (71,4%) a expressão do EGFR foi negativa, sendo escore 1 em cinco pacientes (Figura 5) e escore zero em 20 pacientes (Figura 6). A figura 7 mostra, em conjunto, as intensidades e escores atribuídos aos CCA.



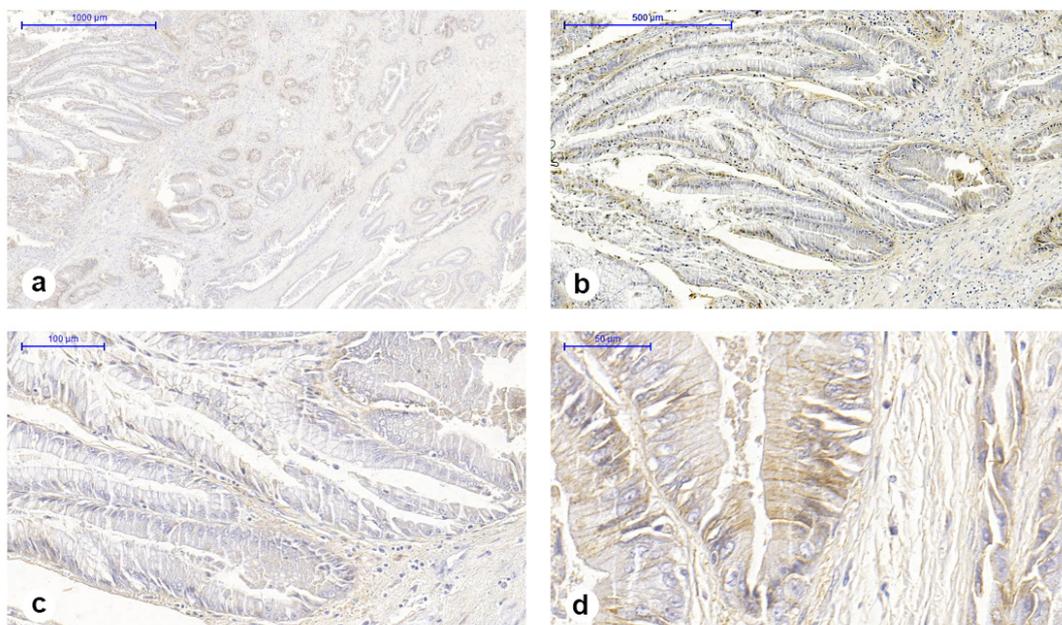
**Figura 2.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA intra-hepático nodular. **(a)** Coloração pela HE mostrando proliferação intensa dos ductos. **(b)** Expressão uniforme do EGFR em mais de 50% do tumor. **(c, d)** Detalhes da expressão do EGFR que é forte e com membrana completa, escore 3.



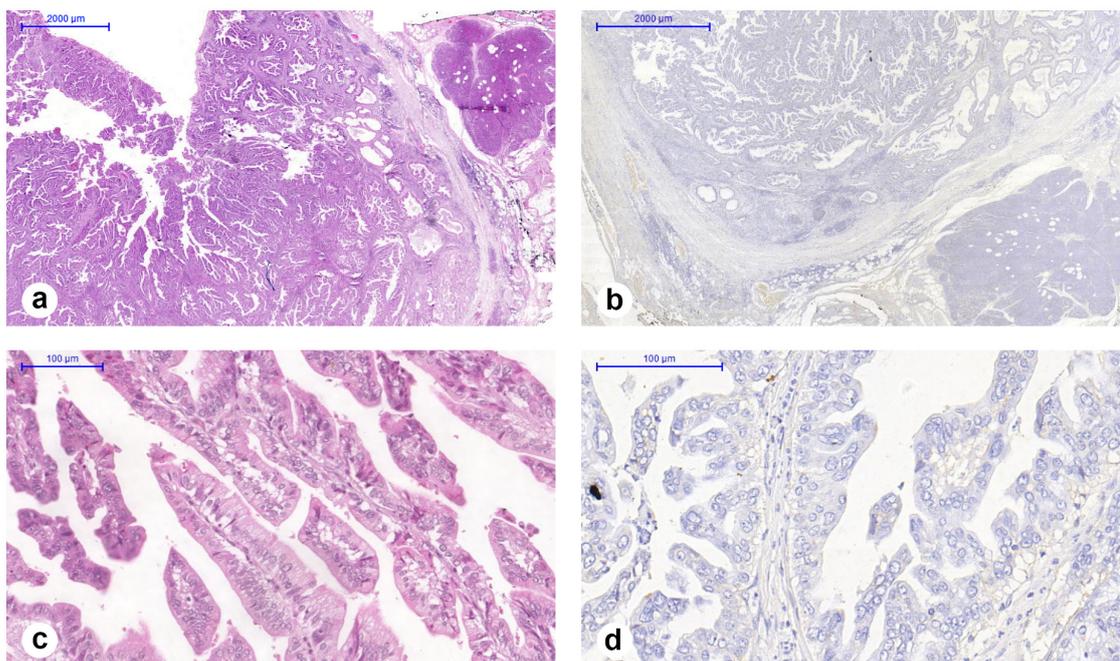
**Figura 3.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA intra-hepático polipóide. **(a)** Coloração pela HE mostrando crescimento intraductal do tumor com arquitetura papilifera. **(b, c)** Expressão membranar difusa do EGFR em mais de 50% do tumor. **(d)** Expressão forte, membrana completa do EGFR, escore 3.



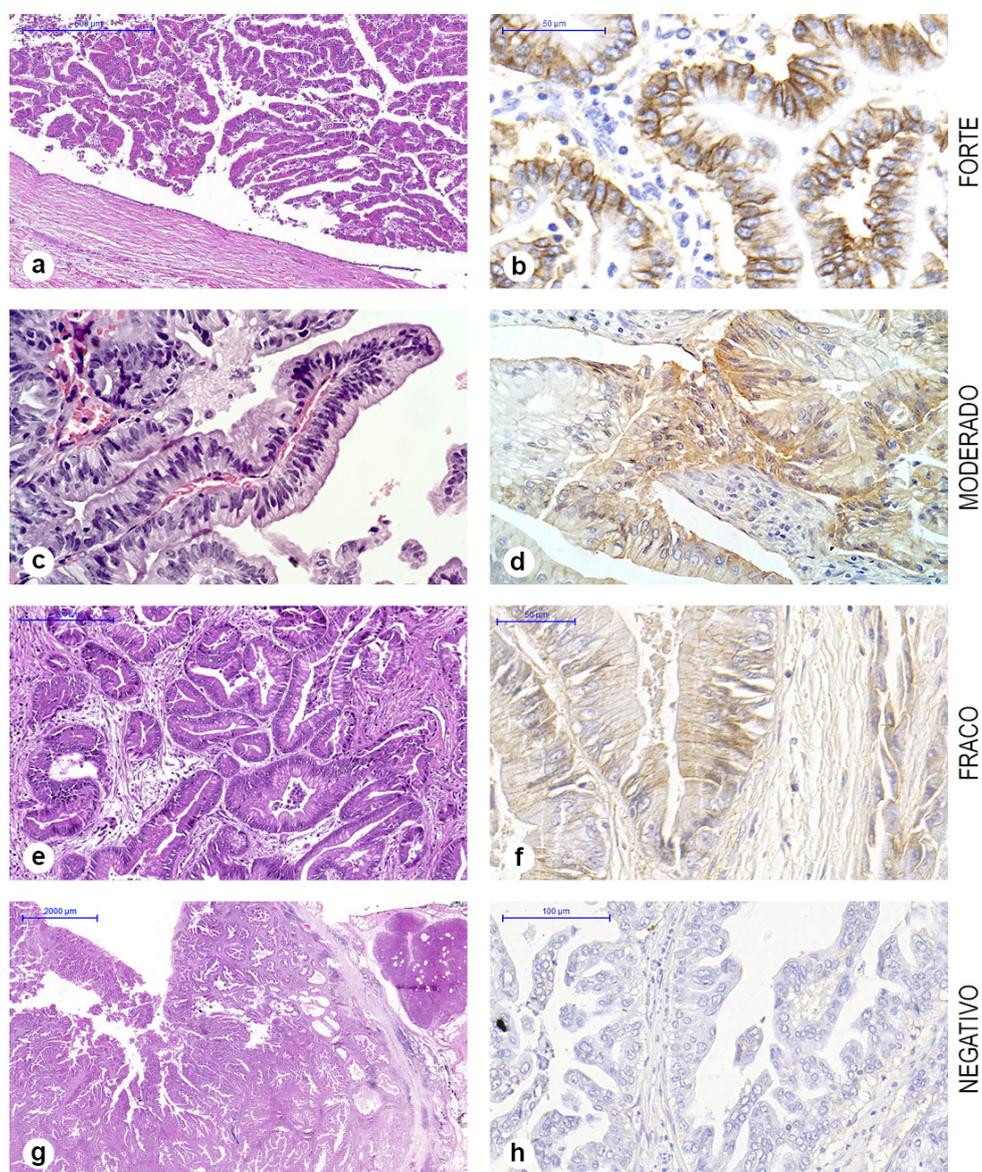
**Figura 4.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA no colédoco distal. **(a)** Coloração pela HE mostrando crescimento exofítico polipóide com arquitetura papilífera. **(b)** Expressão difusa em mais de 50% do tumor, de intensidade moderada. **(c)** Detalhe de uma papila na qual observa-se um eixo central e células cilíndricas com núcleos alongados e hiper cromáticos dispostos em fila na região basal da célula, o citoplasma é abundante e rico em mucina (HE). **(d)** Moderada expressão do EGFR, membrana completa, escore 2.



**Figura 5.** (a) Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA peri-hilar. (a) Fraca expressão em mais de 50% do tumor. (b, c) Áreas tubulopapilíferas com fraca expressão do EGFR. (d) Membrana incompleta, escore 1.



**Figura 6.** Imuno-histoquímica para o EGFR em CCA distal. **(a)** Coloração pela HE mostrando lesão ocupando o lúmen do ducto. Observar a parede do ducto e tecido pancreático. **(b)** Expressão negativa de EGFR em 100% do tumor. **(c)** Detalhe da arquitetura papilífera (HE). **(d)** Expressão negativa do EGFR, escore zero.



**Figura 7.** Intensidade de expressão do EGFR em CCA. Cortes corados pela HE à esquerda (a,c,e,g) e imuno-histoquímica para o EGFR à direita (b,d,f,h). **(b)** Membrana completa, forte, escore 3. **(d)** Membrana completa, moderada, escore 2. **(f)** Membrana incompleta, fraco, escore 1. **(h)** Negativo, escore zero.

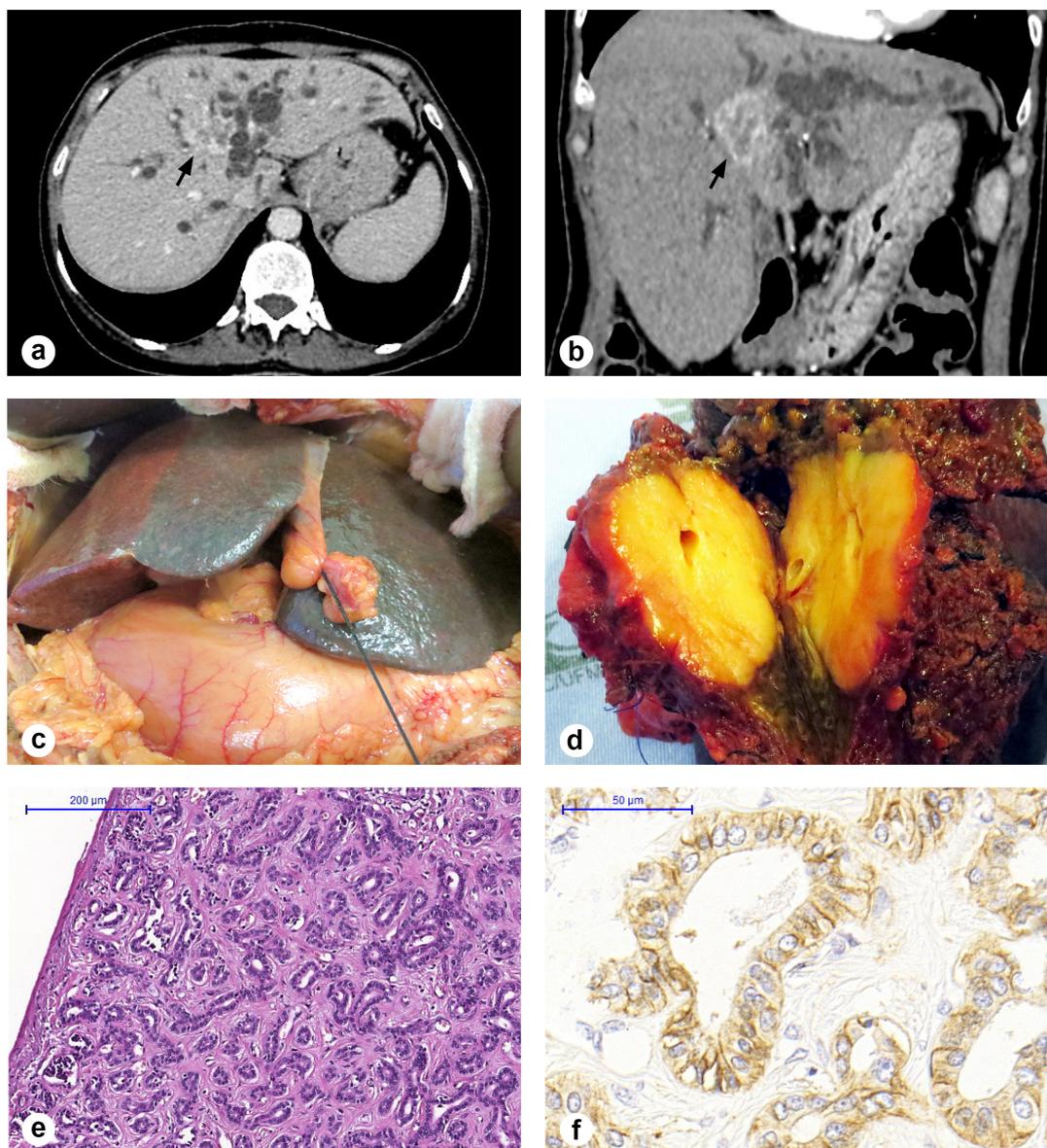
### **5.3 Expressão do EGFR em relação às variáveis clinicopatológicas**

A tabela 3 mostra a expressão do EGFR em relação às variáveis de interesse em 35 casos de colangiocarcinoma. As características clínicas dos pacientes que tiveram maior associação com a expressão positiva foram sexo feminino ( $p = 0,06$ ) e ausência de comorbidades ( $p = 0,07$ ).

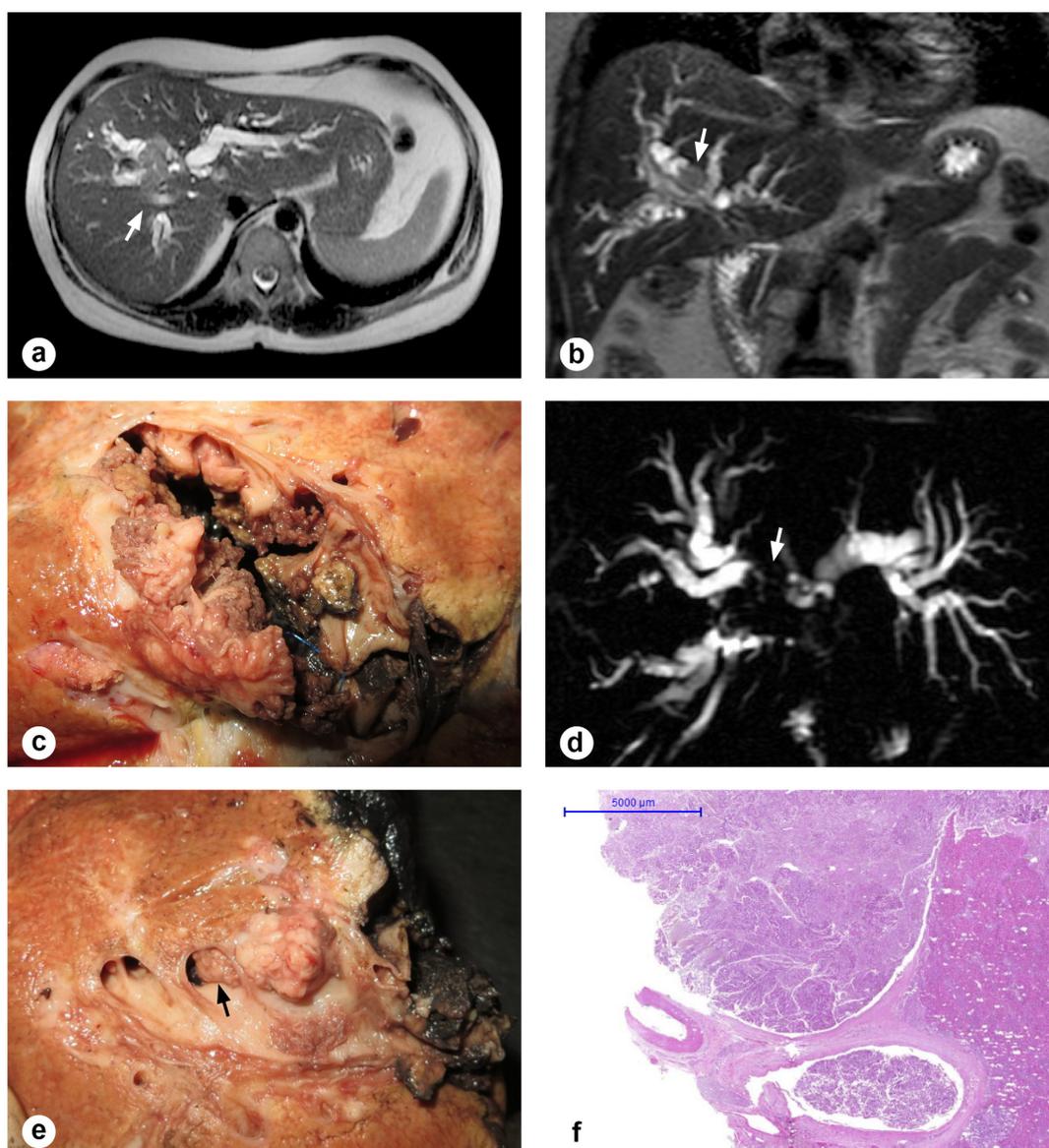
Em relação ao CCA, a expressão de EGFR não esteve associada à classificação anatômica intra-hepática (Figuras 8 e 9), peri-hilar (Figura 10) ou extra-hepática (Figura 11), nem ao tipo de crescimento polipóide (Figuras 9 e 11) ou não-polipóide (Figuras 8 e 10). Entre os 17 casos de colangiocarcinomas polipóides, 5 (29,4%) foram positivos para o EGFR e 12 (70,6%) foram negativos. Entre os casos polipóides, 5 eram papilomatose e, desses, quatro eram negativos e um positivo para EGFR. Quanto ao estadiamento TNM, aqueles com CCA em estádios mais avançados III e IV tiveram maior expressão do EGFR ( $p = 0,071$ ). O Acometimento linfonodal (Figura 11 d) não esteve associado à expressão desse biomarcador.

**Tabela 3.** Expressão do EGFR em relação às variáveis clinicopatológicas.

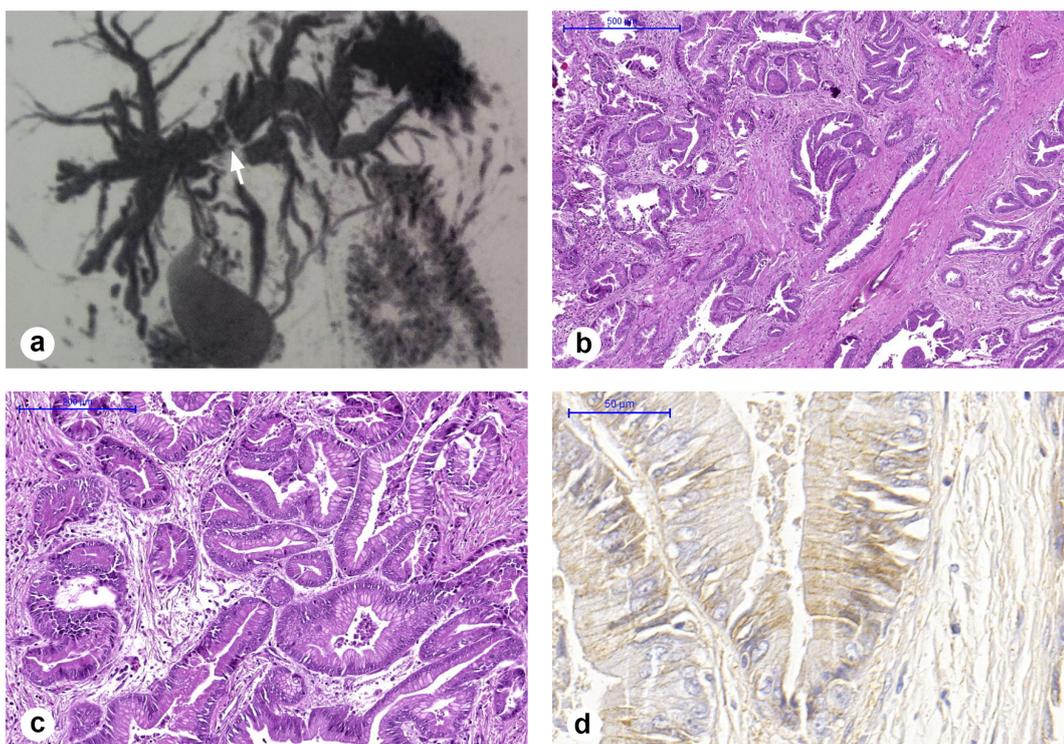
Variáveis	EGFR		Total	Valor p
	Negativo (n=25; 71,4%)	Positivo (n=10; 28,6%)		
			<b>35 (100,0)</b>	<b>0,017</b>
<b>Idade</b> (média; DP) (n=35)	59,5 (12,6)	56,2 (13,7)		0,496
<b>Gênero</b> (n; %)				<b>0,060</b>
Masculino	15 (88,2)	2 ( 11,8)	17 (100,0)	
Feminino	10 (55,6)	8 (44,4)	18 (100,0)	
<b>Tabagismo</b> (n; %)				0,440
Não	14 (63,6)	8 (36,4)	22 (100,0)	
Sim	8 (80,0)	2 (20,0)	10 (100,0)	
<b>Etilismo</b> (n; %)				0,637
Não	17 (65,4)	9 (34,6)	26 (100,0)	
Sim	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100,0)	
<b>Comorbidades</b> (n; %)				<b>0,070</b>
Não	10 (55,5)	8 (44,5)	18 (100,0)	
Sim	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (100,0)	
<b>História familiar</b> (n; %)				0,683
Não	10 (71,4)	4 (28,6)	14 (100,0)	
Sim	7 (58,3)	5 (41,7)	12 (100,0)	
<b>Cálculos</b> (n; %)				0,637
Não	17 (65,4)	9 (34,6)	26 (100,0)	
Sim	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100,0)	
<b>Classificação anatômica</b> (n; %)				0,185
Intra-hepático			10 (100,0)	
Peri-hilar	6 (60,0)	4 (40,0)	10 (100,0)	
Distal	15 (83,3)	3 (16,7)	18 (100,0)	
	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (100,0)	
<b>CA199</b> (n; %)				0,999
≥ 37 U/mL	5 (55,5)	4 (44,4)	9 (100,0)	
< 37 U/mL	8 (61,5)	5 (38,5)	13 (100,0)	
<b>Bilirrubina</b> (n; %)				0,151
0 a 4 mg/dL	8 (57,1)	6 (42,9)	14 (100,0)	
4 a 10 mg/dL	5 (71,4)	2 (28,6)	7 (100,0)	
> 10 mg/dL	8 (88,8)	1 (11,1)	9 (100,0)	
<b>Tratamento</b> (n; %)				0,999
Paliativo	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (100,0)	
Ressecção	21 (70,0)	9 (30,0)	30 (100,0)	
<b>T</b> (n; %)				0,146
1 e 2	15 (83,3)	3 (16,7)	18 (100,0)	
3 e 4	10 (58,8)	7 (41,2)	17 (100,0)	
<b>N</b>				0,331
Negativo	15 (75)	5 (25)	20 (100)	
Positivo	6 (60)	4 (40)	10 (100)	
<b>Estadiamento</b> (n; %)				<b>0,071</b>
I e II	14 (87,5)	2 (12,5)	16 (100,0)	
III e IV	11 (57,9)	8 (42,1)	19 (100,0)	
<b>Tipo de crescimento</b> (n; %)				0,999
Polipóide	12 (70,6)	5(29,4)	17 (100,0)	
Não-polipóide	13 (72,2)	5 (27,7)	18 (100,0)	



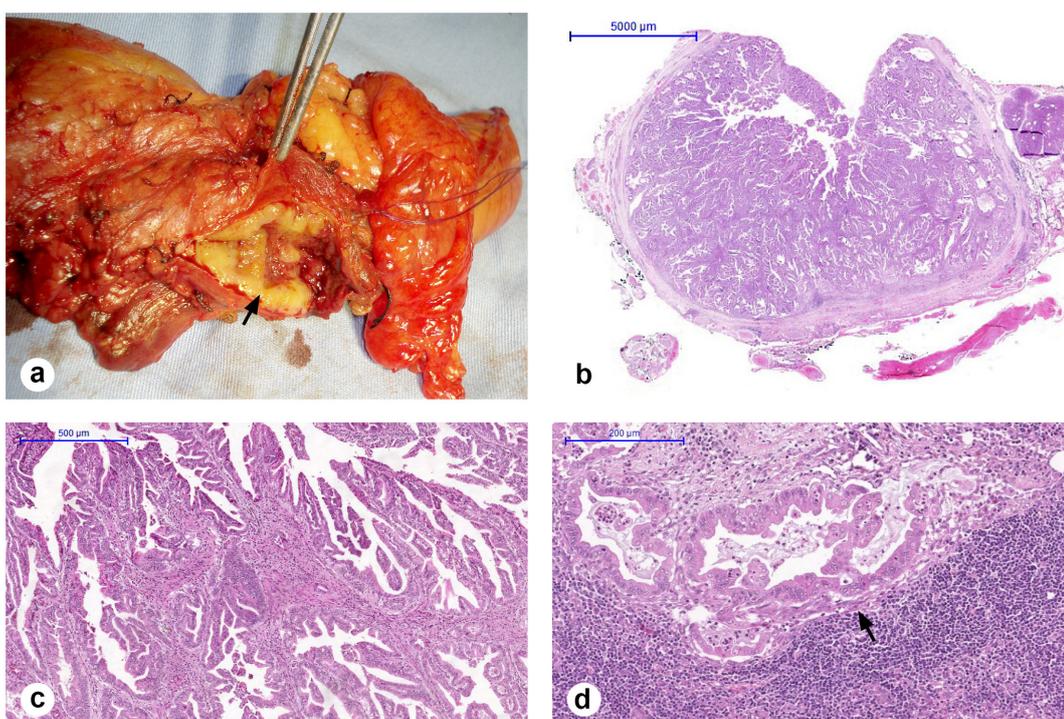
**Figura 8.** Colangiocarcinoma intra-hepático não-polipóide. Tomografia computadorizada do fígado em corte axial (a) e coronal (b), mostrando CCA nos segmentos 4a e 4b (setas). Observa-se dilatação das vias biliares à esquerda. Delimitação do fígado esquerdo de cor escura (c), devido à isquemia pelo acometimento circunferencial do ramo esquerdo da veia porta pelo tumor, que tem aparência nodular (d). Aspecto microscópico do CCA corado pela HE (e), mostrando intensa proliferação dos ductos, que expressam forte marcação de membrana pelo EGFR na imuno-histoquímica (f).



**Figura 9.** Colangiocarcinoma intra-hepático polipóide. **(a)** Ressonância Magnética em corte axial do fígado mostrando lesão nos ductos intra-hepáticos segmentares à direita (seta). **(b)** Corte coronal mostrando tumor que preenche o lúmen dos ductos segmentares e se estende até a região proximal do ducto hepático direito (seta). **(c)** Aspecto macroscópico da lesão com crescimento exofítico e polipóide, ocupando grande extensão intraductal. **(d)** Colangiorressonância evidenciando interrupção do fluxo biliar e dilatação das vias biliares, em local correspondente à lesão vista em c. **(e)** visão ampliada do tumor ocupando o lúmen de ductos segmentares menores (seta). **(f)** Aspecto microscópico mostrando o tumor ocupando o lúmen dos ductos (HE).



**Figura 10.** Colangiocarcinoma peri-hilar não-polipóide. **(a)** Colangiorressonância magnética mostrando dilatação das vias biliares intra-hepáticas e falha de enchimento na região da confluência dos ductos hepáticos direito e esquerdo (seta). **(b, c)** Proliferação dos ductos com arquitetura predominantemente tubular (HE). **(d)** Expressão fraca do EGFR na imuno-histoquímica.



**Figura 11.** CCA polipóide do colédoco distal. **(a)** Aspecto macroscópico do tumor que apresenta crescimento exofítico (seta). **(b)** Observa-se tumor com arquitetura papilífera ocupando o lúmen do ducto (HE). **(c)** Detalhe da arquitetura papilífera (HE). **(d)** Metástase em linfonodo retrocoledociano (seta) (HE).

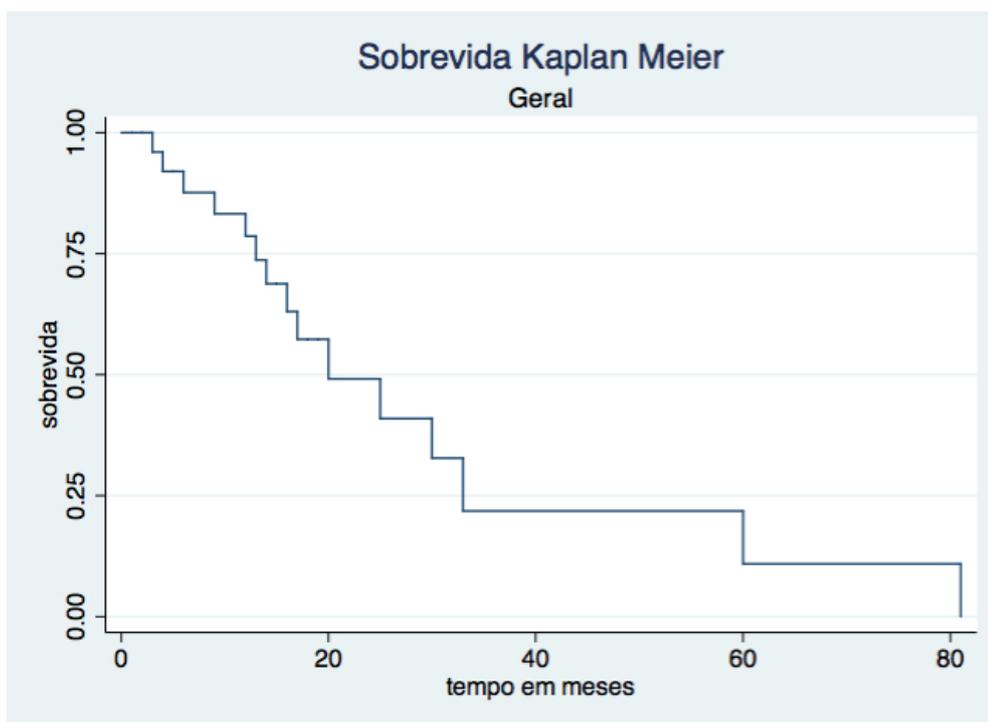
## 5.4 Análise de Sobrevida

Ocorreram 8 óbitos (19,5%) nos 30 primeiros dias do pós-operatório. Ao final do tempo de acompanhamento, 15 (40,5%) pacientes estavam vivos e 22 (59,5%) mortos. A média de sobrevida foi de 29,9 meses (DP=17,2) e a mediana (IIQ) foi de 20 meses (13, 33) (mínimo 2; máximo 81).

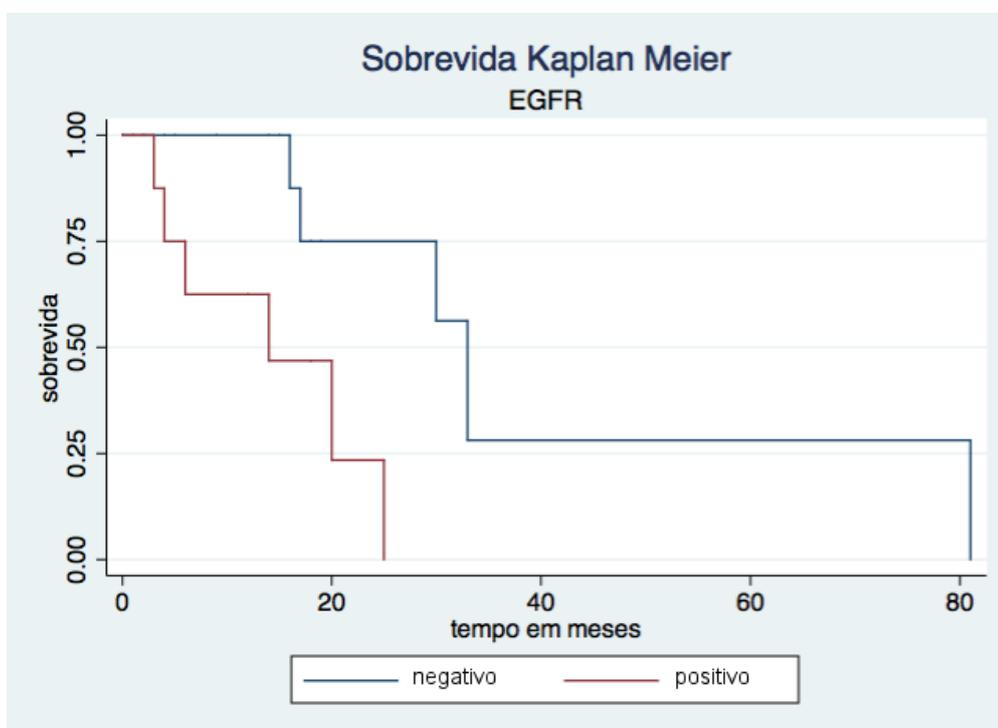
A tabela 4 mostra a sobrevida dos pacientes de acordo com as variáveis que tiveram impacto na sobrevida. A sobrevida global foi de 30,5 meses e a sobrevida em 12, 24 e 36 meses foi de 78,3%, 48,9% e 21,1%, respectivamente (Tabela 4 e Figura 12). A expressão positiva para o EGFR foi relacionada a menor sobrevida média (14,4 meses X 41,8 meses) (Tabela 4 e Figura 13). Menor sobrevida foi observada para os pacientes com tumores intra-hepáticos e maior para os distais (Tabela 4 e Figura 14). Os níveis menos elevados de bilirrubinas se relacionaram a menor tempo de sobrevida (Tabela 4, Figura 15). Estadiamentos mais avançados (III e IV) tiveram tendência significativa quanto à menor sobrevida (Tabela 4, Figura 16).

**Tabela 4.** Sobrevida dos pacientes de acordo com as variáveis que tiveram impacto na sobrevida.

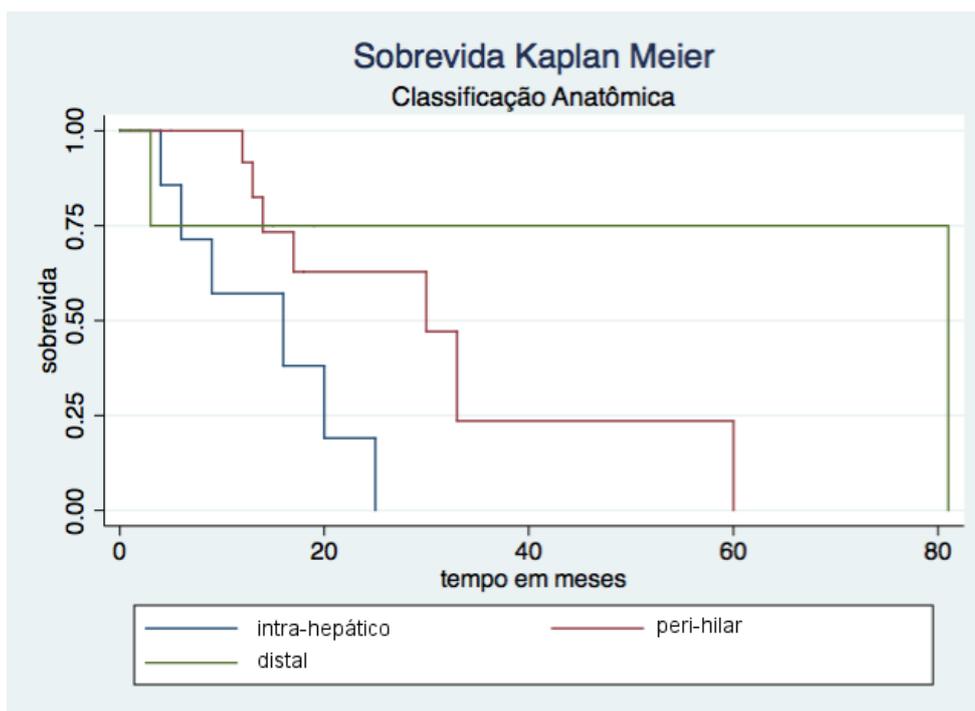
CCA	Densidade de incidência do óbito/Taxa de mortalidade (por mil pessoas-meses)	Sobrevivência (tempo em meses)		Percentual de Sobreviventes meses		
		Média (IC 95%)	Mediana (IIQ)	12	24	36
<b>Total</b>	30,5	29,9 (17,2)	20 (13; 33)	78,3	48,9	21,1
<b>Classificação Anatômica</b>						
Intra-hepático	67,4	14,3 (8,1; 20,5)	16 (6; 20)	55,6	18,5	0,0
Peri-hilar	24,6	31,9 (18,5; 45,3)	30 (14; 33)	91,3	62,2	22,2
Distal	16,9	61,5 (23,3; 99,7)	81 (3; 81)	75,0	75,0	75,0
<b>Estadiamento</b>						
I e II	21,6	40,6 (16,1; 65,1)	33 (17; 81)	100,0	71,4	25,5
III e IV	38,6	23,0 (9,9; 36,0)	20 (12; 25)	68,2	35,0	17,5
<b>EGFR</b>						
negativo	16,9	41,8 (17,3; 66,3)	33 (17; 81)	100,0	75,0	26,8
positivo	58,8	14,4 (7,9; 20,9)	14 (4; 20)	62,5	16,4	0,0
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>						
0 a 4	69,6	12,2 (8,2; 16,2)	12 (6; 17)	49,1	0,0	0,0
4 a 10	29,9	30,7 (14,4; 47,1)	25 (14; 33)	100,0	66,7	22,2
> 10	11,1	64,0 (30,9; 97,3)	81 (30; 81)	100,0	100,0	60,0



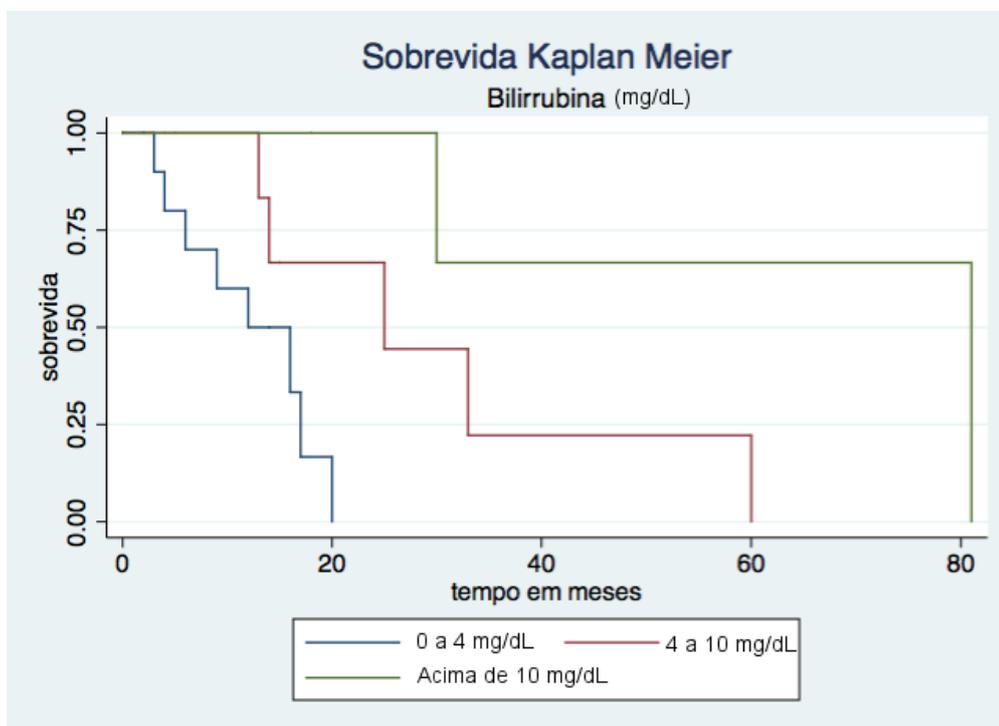
**Figura 12.** Curva de sobrevida geral, pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinomas.



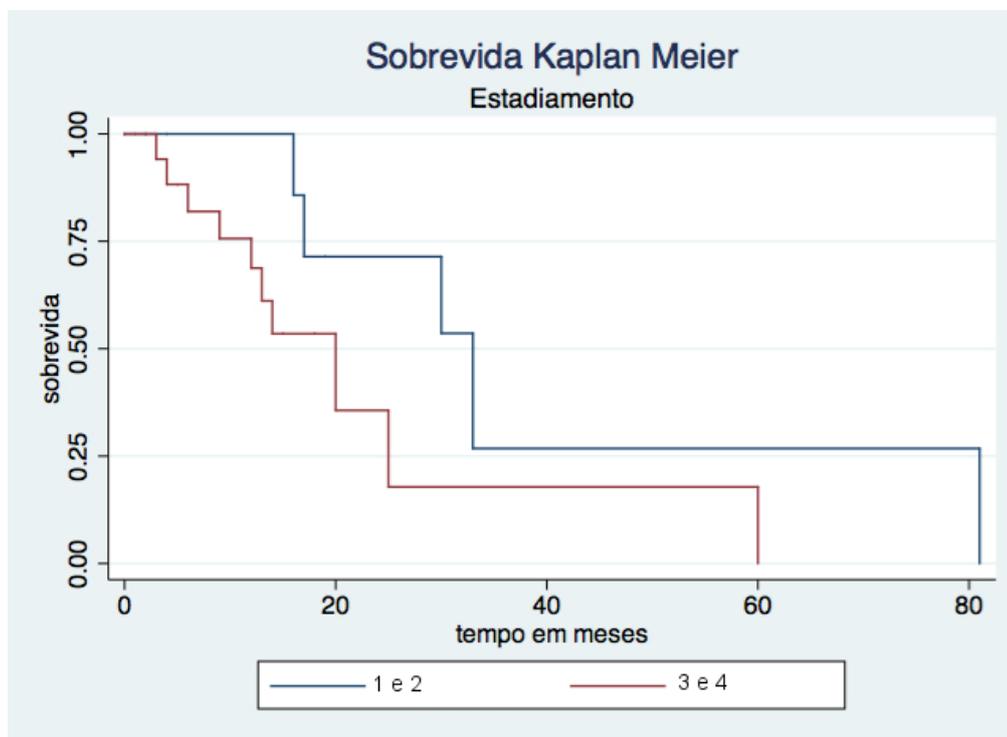
**Figura 13.** Curva de sobrevida pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, de acordo com a expressão positiva ou negativa de EGFR. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,007$ , Wilcoxon  $p=0,010$ .



**Figura 14.** Curva de sobrevivida pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, segundo a classificação anatômica. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,034$ , Wilcoxon  $p=0,139$ .



**Figura 15.** Curva de sobrevivida pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, segundo os níveis séricos de bilirrubinas. Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,002$ , Wilcoxon  $p=0,008$ .



**Figura 16.** Curva de sobrevivida pelo método de Kaplan Meier, em pacientes com colangiocarcinoma, estádios I e II versus III e IV (TNM, AJCC). Teste de igualdade de curvas: Log-Rank  $p=0,098$ , Wilcoxon  $p=0,078$ .

## 6 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, de mama, pulmão e de cabeça e pescoço. Até o momento, a utilização de anticorpos monoclonais e inibidores da tirosina quinase, tal como cetuximab, trastuzumab, erlotinib, gefitinib, ainda está sendo pesquisada em outros tipos de cânceres. 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 uma coorte de 236 casos de câncer do trato biliar ressecados (18). Harder *et al* estudaram a expressão de EGFR e de HER2 em um grande 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 promissor (9).

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 tumores(19).

A expressão do EGFR, em estudos prévios, ocorreu em até 80% dos casos de câncer do trato biliar, e tem sido associada com a maior agressividade desses tumores(5, 9, 18). 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 mais avançados,

ocorrendo em 42,1% dos tumores em estágio III/IV versus 12,5% dos tumores em estágio I/II ( $p = 0,071$ ), traduzindo característica de fenótipo agressivo em vigência de doença invasiva. Uma hipótese é de que o tumor passe a expressar mais o EGFR ao atingir estádios mais 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 significativamente menor sobrevida em relação aos negativos (14,4 vs 41,8 meses de sobrevida média).

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 com a progressão do colangiocarcinoma (9). Sabe-se que a ativação do EGFR interfere na adesão intercelular, desestabilizando o complexo E-caderina/beta-catenina, promovendo a transição epitélio-mesenquimal, que contribui para aumentar a capacidade de migração e invasão e a resistência à apoptose(20, 21).

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 uma média de sobrevida maior do que três anos(13). 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 EFGR, em nosso estudo, teve como referência o trabalho de Yoshikawa *et al*, que considerou marcação completa ou incompleta da membrana citoplasmática (18). Harder *et al* utilizaram uma outra forma para a obtenção do escore e obtiveram uma porcentagem maior de superexpressão do EGFR (9). Segundo Harder *et al*, os tumores foram considerados

negativos quando menos que 10% de células cancerosas foram marcadas, independente da intensidade na membrana (9). No trabalho desses autores, a expressão de EGFR esteve ausente em 39,3% (22/56) dos pacientes, enquanto que a expressão fraca (+) foi observada em 21,5% (12/56), a expressão moderada (++) em 23,2% (13/56) e intensa (+++) em e 16% (9/56). Talvez o fato de termos utilizado uma forma diferente para a obtenção do escore, possa ser a razão de termos obtido resultados inferiores (28,6%) aos desses autores. Além disso, Harder et al. (9) realizaram a pesquisa em biópsias de casos avançados e irresssecáveis de carcinoma do trato biliar, sem fazer distinção entre carcinoma da vesícula biliar e colangiocarcinoma dos ductos biliares, enquanto 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-hepáticos(18). Em nosso estudo, o carcinoma perihilar foi considerado separadamente e a expressão de EGFR foi de apenas 16,7% nesse grupo, menor do que nos demais. Harder *et al* encontraram uma taxa de 57,9% nos extra-hepáticos e de 25% nos intra-hepáticos(9). 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 da World Health Organization (WHO) incluir os colangiocarcinomas peri-hilares e distais na modalidade extra-hepática, sabe-se que possuem diferentes comportamentos biológicos e respondem de forma distinta à quimioterapia e, talvez,

por essa razão, devessem ser classificados separadamente. Em uma revisão sistemática, Wiggers *et al* mostraram diferenças significativas na expressão de biomarcadores entre os colangiocarcinomas intra-hepáticos e os 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 distintos(22). Já Ercolani *et al* classificaram os CCA em três subgrupos (CCAIH, CCAPH e CCAD) e concluíram que os colangiocarcinomas parecem ser o mesmo tipo de tumor, mas dependendo da localização, apresentam diferentes propriedades para invadir estruturas adjacentes, o que também pode influenciar no prognóstico(23). 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.

Em relação à bilirrubina, os níveis séricos mais baixos foram relacionados à menor sobrevida, provavelmente, devido ao fato de os CCAIH em fases iniciais, não cursarem com icterícia, por não obstruírem a via biliar principal e nem o hilo hepático. O fato de, geralmente, serem assintomáticos nos estágios iniciais, por não obstruírem a via biliar principal, pode ter contribuído para o diagnóstico tardio e, conseqüentemente, pior prognóstico (24).

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 farmacêutica (15).

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. A alta mortalidade pós-operatória no tratamento do colangiocarcinoma, prejudicou a análise de sobrevida. E a falta de informações nos prontuários dos pacientes admitidos entre 2008 e 2010 também prejudicou a análise de alguns dados.

Estudos multicêntricos, 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.

Sabe-se que existem outros fatores que podem influenciar no potencial de agressividade desses tumores e no prognóstico dos pacientes, como, por exemplo, o tipo histológico. Os colangiocarcinomas apresentam tipos histológicos variados e podem ser do tipo nodular e/ou esclerosante, ou se apresentar com crescimento predominantemente intraductal polipóide com diferentes fenótipos, sendo que cada subtipo apresenta comportamento biológico distinto. Com isso, pretende-se dar continuidade a essa pesquisa, classificando os diferentes tipos histológicos, por meio de imuno-histoquímica, assim como aprofundar em outros potenciais marcadores biomoleculares no CCA. E, dessa forma, adquirir melhor conhecimento sobre essa enfermidade (11, 25-28).

Pesquisas também estão sendo feitas para se obter uma melhor caracterização gênica desses tumores. Tecnologias avançadas tem sido utilizadas para fornecer maior compreensão sobre sua patogênese, contribuindo para o desenvolvimento de modalidades diagnósticas e terapêuticas (29, 30).

## **7 CONCLUSÃO**

A expressão do EGFR ocorreu em 28,6% dos colangiocarcinomas estudados e esteve associada à menor sobrevida dos pacientes. Outros fatores que também tiveram impacto negativo na sobrevida dos portadores de colangiocarcinoma, foram a localização intra-hepática do tumor e o estadiamento avançado.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2005;366(9493):1303-14.
2. Castellano-Megias VM, Ibarrola-de Andres C, Colina-Ruizdelgado F. Pathological aspects of so called "hilar cholangiocarcinoma". *World J Gastrointest Oncol*. 2013;5(7):159-70.
3. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(2):277-93.
4. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
5. Huang Y, Li X, Zhao Y. Progression of targeted therapy in advanced cholangiocarcinoma. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(2):122-7.
6. Thomas MB. Biological characteristics of cancers in the gallbladder and biliary tract and targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;61(1):44-51.
7. Ruys AT, Groot Koerkamp B, Wiggers JK, Klumpen 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.
8. Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, Maranki JL, Camp ER, Denlinger CS. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2016.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. 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.
17. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(9):512-22.
18. 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.
19. 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.
20. Claperon A, Mergey M, Nguyen Ho-Boulidoires 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.
21. Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, Strazzabosco M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Invasiveness: What Can We Learn from Cholangiocarcinoma? *J Clin Med.* 2015;4(12):2028-41.
22. 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.
23. 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.
24. Dodson RM, Weiss MJ, Cosgrove D, Herman JM, Kamel I, Anders R, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: management options and emerging therapies. *J Am Coll Surg.* 2013;217(4):736-50 e4.
25. Schlitter AM, Born D, Bettstetter M, Specht K, Kim-Fuchs C, Riener MO, et al. Intraductal papillary neoplasms of the bile duct: stepwise progression to carcinoma involves common molecular pathways. *Mod Pathol.* 2014;27(1):73-86.
26. Nakanuma Y, Sato Y, Ojima H, Kanai Y, Aishima S, Yamamoto M, et al. Clinicopathological characterization of so-called "cholangiocarcinoma with intraductal papillary growth" with respect to "intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB)". *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(6):3112-22.
27. Mo A, Brat G, Spolverato G, Pawlik TM. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the liver: GI image. *J Gastrointest Surg.* 2015;19(4):792-4.

28. 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.
29. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology.* 2012;142(4):1021-31 e15.
30. Brandi G, Farioli A, Astolfi A, Biasco G, Tavolari S. Genetic heterogeneity in cholangiocarcinoma: a major challenge for targeted therapies. *Oncotarget.* 2015;6(17):14744-53.
31. Choudhary KS, Rohatgi N, Halldorsson S, Briem E, Gudjonsson T, Gudmundsson S, et al. EGFR Signal-Network Reconstruction Demonstrates Metabolic Crosstalk in EMT. *PLoS Comput Biol* 12(6): e1004924. Doi:10.1371/journal.Pcbi.1004924.
32. Jakobsen RJ, Demuth C, Sorensen BS, Nielsen AL. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(2):172-182

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1

#### ESTADIAMENTO TNM/AJCC PARA COLANGIOCARCINOMA INTRA-HEPÁTICO

##### Tumor primário (T)c:

- TX Tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Sem evidência de tumor primário
- Tis Carcinoma *in situ* (tumor intraductal)
- T1 Tumor solitário sem invasão vascular
- T2a Tumor solitário com invasão vascular
- T2b Múltiplos tumores, com ou sem invasão vascular
- T3 Tumores penetrando o peritônio visceral OU acometendo estruturas hepáticas locais por invasão direta
- T4 Tumor com invasão periductal

##### Linfonodos regionais (N):

- NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 Ausência de metástases em linfonodos regionais
- N1 Presença de metástases em linfonodos regionais

##### Metástases a distância (M):

- M0 Ausência de metástases a distância
- M1 Presença de metástases a distância

##### Estádio:

- Estádio 0 - Tis N0 M0
- Estádio I - T1 N0 M0
- Estádio II - T2 N0 M0
- Estádio III - T3 N0 M0
- Estádio IVA - T4 N0 M0 / Qualquer T N1 M0
- Estádio IVB - Qualquer T Qualquer N M1

## ANEXO 2

### ESTADIAMENTO TNM/AJCC PARA COLANGIOMATOSIS PERI-HILAR

#### Tumor primário (T)c:

- Tx Tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Sem evidência de tumor primário
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor confinado ao ducto biliar, com extensão até a camada muscular ou tecido fibroso
- T2a Tumor ultrapassa a parede do ducto biliar até o tecido adiposo adjacente
- T2b Tumor invade o parênquima hepático adjacente
- T3 Tumor invade ramo unilateral da veia porta ou da artéria hepática
- T4 Tumor invade a veia porta ou seus ramos bilateralmente; ou artéria hepática comum; ou ramo biliar secundário bilateral; ou ramo biliar secundário unilateral com acometimento contralateral da veia porta ou da artéria hepática

#### Linfonodos regionais (N):

- NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 Ausência de metástases em linfonodos regionais
- N1 Presença de metástases em linfonodos regionais (linfonodos ao longo do ducto cístico, ducto biliar comum, artéria hepática e veia porta)
- N2 Metástases em linfonodos periaórticos, pericavais, da artéria mesentérica superior e/ou tronco celíaco

#### Metástases a distância (M):

- M0 Ausência de metástases a distância
- M1 Presença de metástases a distância

#### Estádio:

- Estádio 0 - Tis N0 M0
- Estádio I - T1 N0 M0
- Estádio II - T2A-B N0 M0
- Estádio IIIA - T3 N0 M0
- Estádio IIIB - T1-3 N1 M0
- Estádio IVA - T4 N0-1 M0
- Estádio IVB - Qualquer T N2 M0 / Qualquer T Qualquer N M1

## ANEXO 3

### ESTADIAMENTO TNM/AJCC PARA COLANGIOPCARCINOMA EXTRA-HEPÁTICO

#### Tumor primário (T)c:

- TX Tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Sem evidência de tumor primário
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor confinado ao ducto biliar
- T2 Tumor ultrapassa a parede do ducto biliar
- T3 Tumor invade a vesícula biliar, pâncreas, duodeno ou outros órgãos adjacentes, sem acometer o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior
- T4 Tumor invade o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior

#### Linfonodos regionais (N):

- NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 Ausência de metástases em linfonodos regionais
- N1 Presença de metástases em linfonodos regionais

#### Metástases a distância (M):

- M0 Ausência de metástases a distância
- M1 Presença de metástases a distância

#### Estádio:

- Estádio 0 - Tis N0 M0
- Estádio IA - T1 N0 M0
- Estádio IB - T2 N0 M0
- Estádio IIA - T3 N0 M0
- Estádio IIB - T1 N1 M0 / T2 N1 M0 / T3 N1 M0
- Estádio III - T4 Qualquer N M0
- Estádio IV - Qualquer T Qualquer N M1

**ANEXO 4****ROTEIRO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (EGFR)**

1. Colocar as lâminas em Xilol 01 por 15 minutos. (desparafinizar).
2. Colocar as lâminas em Xilol 02 por 15 minutos.
3. Colocar as lâminas em álcool absoluto 01 por 5 minutos. (hidratar)
4. Colocar as lâminas em álcool absoluto 02 por 5 minutos.
5. Colocar as lâminas em Álcool 90 por 5 minutos.
6. Colocar as lâminas em Álcool 80 por 5 minutos.
7. Lavar as lâminas em água corrente por 10 minutos.
8. Colocar as lâminas na solução de pepsina+HCl\* (cuvete) em estufa 37°C por 30 minutos.

\*100 mL de água destilada + 1 mL HCl + 100mg de pepsina

9. Colocar as lâminas em PBS (pH 7-7,5) por 5 minutos.
12. Colocar as lâminas em PBS por 5 minutos.
13. Colocar as lâminas no bloqueio da Peroxidase endógena [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 Vol.) / CH<sub>3</sub>OH na proporção 1/10] por 5 minutos. Procedimento realizado três vezes;
14. Colocar as lâminas em PBS por 5 minutos.
15. Colocar as lâminas em PBS por 5 minutos.
16. Enxugar delicadamente as lâminas com papel higiênico e contornar os cortes com a caneta DAKO PEN;
17. Colocar as lâminas na câmara úmida e cobrir os cortes com gotas de soro normal\*. Em seguida, tampar a câmara e deixar por 10 minutos;

\*Large volume ultra V Block – Ref.: TA 015 VB – Lot.: AUB 60719 – Lab Vision.

18. Escorrer o soro e enxugar as lâminas delicadamente com papel higiênico;
19. Pipetar o anticorpo primário (EGFR – clone 3G7 - Invitrogen – diluição 1:100) e incubar as lâminas na câmara úmida por 16 a 18 horas (incubação overnight);
20. Retirar o anticorpo primário e lavar as lâminas com PBS por 5 minutos;
21. Colocar as lâminas em PBS por 5 minutos;
22. Colocar 50µL de Advance™ HRP Link e incubar na câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente;

23. Colocar as lâminas na câmara úmida e cobrir os cortes com 50 µL do polímero\*. Tampar a câmara úmida e deixar por 30 minutos.

\*(Advance HRP Polymer – Ref.: K406889).

24. Retirar o Polímero e colocar as lâminas em PBS por 5 minutos.

25. Colocar as lâminas em PBS por 5 minutos.

26. Dentro da capela de fluxo laminar, cobrir as lâminas com DAB utilizando uma micropipeta. Retirar o DAB após a reação (tecido amarronzado). Tempo de incubação de 1 a 2 minutos;

OBS.: O DAB é diluído com solução de peróxido (1 ml de solução + 1 gota de DAB).

27. Descartar o DAB no local apropriado;

28. Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos;

29. Colocar as lâminas em hematoxilina filtrada por 3 segundos;

30. Lavar as lâminas em água corrente por 10 minutos;

31. Colocar as lâminas em Álcool 80 por 5 minutos (Desidratação da amostra);

32. Colocar as lâminas em Álcool 90 por 5 minutos;

33. Colocar as lâminas em álcool absoluto 02 por 10 minutos;

34. Colocar as lâminas em álcool absoluto 01 por 10 minutos;

35. Colocar as lâminas em Xilol 01 por 2 minutos;

36. Colocar as lâminas em Xilol 02 por 2 minutos;

37. Montar a lâmina com meio de montagem ERV-Mount/Entellan;

## ANEXO 5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 37156714.6.0000.5149

Interessado(a): Prof<sup>a</sup>. Vivian Resende  
Departamento de Cirurgia  
Faculdade de Medicina-UFMG

## DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de novembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise imunoistoquímica e perfil gênico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no colangiocarcinoma**" bem como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 6

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA	<b>UFMG</b> ■
---	---	------------------

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO RODRIGO VIEIRA GOMES

Realizou-se, no dia 09 de maio de 2016, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) COMO FATOR PROGNÓSTICO NO COLANGIOCARCINOMA*, apresentada por RODRIGO VIEIRA GOMES, número de registro 2014659693, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Vivian Resende - Orientador (UFMG), Prof(a). Marcos Bettini Pitombo (UERJ), Prof(a). Cristiano Xavier Lima (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

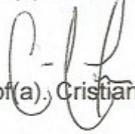
Aprovada

Reprovada

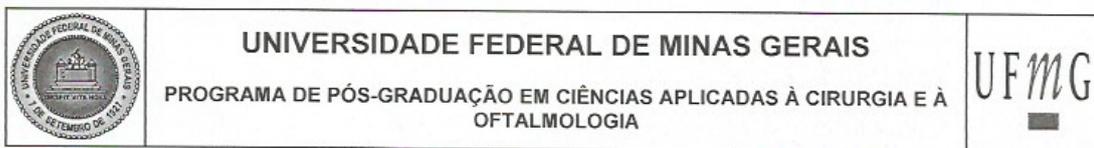
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 09 de maio de 2016.

  
Prof(a). Vivian Resende ( Doutora )

  
Prof(a). Marcos Bettini Pitombo ( Doutor )

  
Prof(a). Cristiano Xavier Lima ( Doutor )

## ANEXO 7



## FOLHA DE APROVAÇÃO

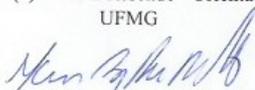
**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO  
(EGFR) COMO FATOR PROGNÓSTICO NO COLANGIOCARCINOMA**

**RODRIGO VIEIRA GOMES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração ANATOMOFISIOPATOGENIA CIRÚRGICA,

Aprovada em 09 de maio de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Vivian Resende - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Marcos Bettini Pitombo  
UERJ

  
Prof(a). Cristiano Xavier Lima  
UFMG

Belo Horizonte, 9 de maio de 2016.