

Índice

| | |
|--------------------------|----|
| Resumo..... | 4 |
| Abstract | 6 |
| Introdução..... | 8 |
| Material e métodos | 11 |
| Resultados | 13 |
| Discussão..... | 28 |
| Conclusão | 33 |
| Bibliografia..... | 34 |

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes, um agradecimento muito especial por ter sido a grande incentivadora desta tese de mestrado, por me ter transmitido o gosto pela Biofísica, pelo seu inestimável e imprescindível contributo, total disponibilidade e apoio incondicional. A ela se deve este trabalho.

Ao Dr. Ricardo Martins, pela disponibilidade demonstrada, valioso auxílio, e inúmeros conselhos dados.

Ao Professor Doutor Francisco Castro e Sousa por ter tornado possível o desenvolvimento deste estudo no seu Serviço.

Ao Mestre Rui Oliveira, pela sua ajuda preciosa e disponibilidade na avaliação das amostras anátomo-patológicas.

Ao Mestre Rafael Ferreira, pela sua valiosa ajuda e disponibilidade.

Em especial, aos 71 doentes sobre quem este trabalho incidiu. Foram eles que tornaram possível a realização desta análise e são eles a quem ela pretende servir.

Aos meus pais, irmãs e avós que sempre me souberam proporcionar um ótimo ambiente e todos os meios necessários.

À Ana Filipe, pela cumplicidade e entusiasmo.

Aos meus amigos pela companhia e solidariedade de todos os momentos, com especial e sentida homenagem ao João Alfaro e ao André Magina. Acompanhar-me-ão sempre.

Resumo

Introdução: O colangiocarcinoma (CC) é um tumor maligno com origem nas células epiteliais do tracto biliar. Segundo a localização anatómica, divide-se em Intrahepático, Klatskin (hilar) e Extrahepático. A ressecção cirúrgica é a única potencialmente curativa, no entanto, poucos são os doentes candidatos a ressecção curativa no momento do diagnóstico. Neste âmbito, urge desenvolver novas modalidades terapêuticas, que se apresentem como alternativas eficazes e que se revelem numa nova esperança para o aumento da sobrevivência destes doentes. O NIS (Natrium-Iodide Symporter) é uma glicoproteína responsável pelo transporte membranar de sódio e iodo. A descoberta da expressão do NIS em tecidos extra-tiroideus, incluindo células neoplásicas, abriu um novo paradigma de oportunidades terapêuticas permitindo a possível utilização do Iodo-131 para destruição das células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em correlacionar os dados clínicos de doentes com diferentes tipos de colangiocarcinoma com a sua sobrevivência e prognóstico. Para além disso constituiu também objetivo a avaliação a expressão do NIS em colangiocarcinoma. **Material e Métodos:** Este estudo de carácter retrospectivo incidiu sobre uma amostra de 71 doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma submetidos a intervenção cirúrgica e /ou biópsia no CHUC. Foram recolhidas, no momento do diagnóstico, informações relativas ao género, idade, diagnóstico, parâmetros bioquímicos e hematológicos, marcadores tumorais, dados anátomo-patológicos, tipo de tratamento e sobrevivência após tratamento. Para além disso foi avaliada a expressão de NIS por imunohistoquímica. **Resultados:** No grupo de doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, a sobrevivência global média ($38,14 \pm 8,66$ meses) foi superior à sobrevivência dos doentes com tumor de Klatskin ($9,24 \pm 3,97$ meses) e dos doentes com colangiocarcinoma Extrahepático ($11,29 \pm 2,81$ meses). O tratamento curativo revelou ser um importante determinante da sobrevivência, quando comparado com o paliativo. A invasão vascular e ganglionar revelaram uma correlação

negativa com a sobrevivência ($r=-0.370$; $p=0.013$ e $r=-0.460$ $p=0.006$, respectivamente), sendo que a invasão ganglionar foi o único fator capaz de influenciar a sobrevivência de forma independente ($p=0,041$). Resultados preliminares da imunohistoquímica revelaram a ausência de expressão do NIS num pequeno grupo de tumores de doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Intrahepático e Extrahepático. Contudo, em linhas celulares, a imunoexpressão do NIS revelou-se positiva, sendo mais expressiva no colangiocarcinoma Extrahepático. **Discussão:** A sobrevivência mais reduzida dos doentes quando submetidos a tratamento paliativo demonstra a falta de alternativas eficazes à cirurgia curativa. A ausência da expressão do NIS nas amostras avaliadas constitui um resultado preliminar, e a expressão deve ser avaliada num maior número de amostras, o que é reforçado pela deteção de expressão nas linhas celulares avaliadas. **Conclusão:** O colangiocarcinoma tem uma sobrevivência reduzida, especialmente quando os doentes não são candidatos a resseção cirúrgica curativa. O NIS poderá assim constituir uma opção terapêutica alternativa a ter em conta para o colangiocarcinoma, o que deve ser estudado pela avaliação de um maior número de amostras.

Abstract

Introduction: Cholangiocarcinoma (CC) is a malignant tumor arising in the epithelial cells of the biliary tract. According to the anatomical location, it is divided into Intrahepatic, Klatskin (perihilar) and Extrahepatic. Regarding therapeutic options, surgical resection is the only potentially curative approach. However, few patients are candidates for curative resection at the time of diagnosis. In this context, it is urgent to develop new therapeutic modalities that could be regarded as more effective alternatives in order to increase the survival of these patients. NIS (Sodium-Iodide symporter) is a glycoprotein responsible for membrane transport of sodium and iodine. The discovery of NIS expression in extra-thyroid tissues, including tumor cells, has opened a new paradigm of therapeutic opportunities by allowing the use of iodine-131 for tumor cells destruction. The objective of this study is to correlate the clinical data of patients with different types of cholangiocarcinoma with its survival and prognosis. Moreover, this work aims to evaluate NIS expression in cholangiocarcinoma by immunohistochemistry. **Material and Methods:** This retrospective study included 71 patients with cholangiocarcinoma diagnosis who underwent surgical intervention and / or biopsy in CHUC. The following data was collected at the time of diagnosis: gender, age, diagnosis, biochemical and hematological parameters, tumor markers, anatomical and pathological data, treatment type and survival after treatment. Furthermore, NIS expression was evaluated by immunohistochemistry. **Results:** In the group of patients diagnosed with Intrahepatic cholangiocarcinoma, overall median survival (38.14 ± 8.66 months) is greater than the survival of patients with Klatskin tumor (9.24 ± 3.97 months) and of patients with Extrahepatic cholangiocarcinoma (11.29 ± 2.81 months). Curative treatment has proved to be an important determinant of survival, when compared with palliative treatment. Vascular and lymph node invasion showed a negative correlation with survival ($r=-0,370$, $p=0.013$ and $r=0.006$, $p=-0460$, respectively), and lymph node invasion was the only factor that was proved

to influence survival independently ($p = 0.041$). Preliminary results of immunohistochemistry revealed the absence of NIS expression in a small group of tumors of patients diagnosed with Intrahepatic and Extrahepatic cholangiocarcinoma. However, in tumor cell lines, the immunoreactivity of the NIS was positive, being more significant in the Extrahepatic cholangiocarcinoma cell line. **Discussion:** The lower survival of patients when undergoing palliative treatment demonstrates the lack of effective alternatives to curative surgery. The absence of NIS expression in the analyzed samples is a preliminary result, and NIS expression must be evaluated in a larger number of samples. This need is reinforced because NIS was expressed in the cell lines evaluated. **Conclusion:** Cholangiocarcinoma has a reduced survival, especially when patients are not candidates for curative surgical resection. The NIS may well be an alternative treatment option to consider for cholangiocarcinoma, which should be studied by evaluating a larger number of samples.

Introdução

O colangiocarcinoma (CC) é um tumor maligno com origem nas células epiteliais do trato biliar¹. Conforme a sua localização anatômica (Figura 1), classifica-se em Intrahepático, Klatskin (hilar) e Extrahepático, classificação que simultaneamente é adotada aquando do estabelecimento do diagnóstico, estadiamento e terapêutica²⁻⁴. Apesar de raro, a incidência do colangiocarcinoma tem vindo a aumentar, representando cerca de 3% dos tumores gastrointestinais e 10-15% de todos os tumores hepatobiliares primários⁵. Na maioria dos casos, os sintomas surgem num estadio avançado e são inespecíficos, o que faz com que o seu diagnóstico seja tardio, dificultando a sua abordagem terapêutica⁶.

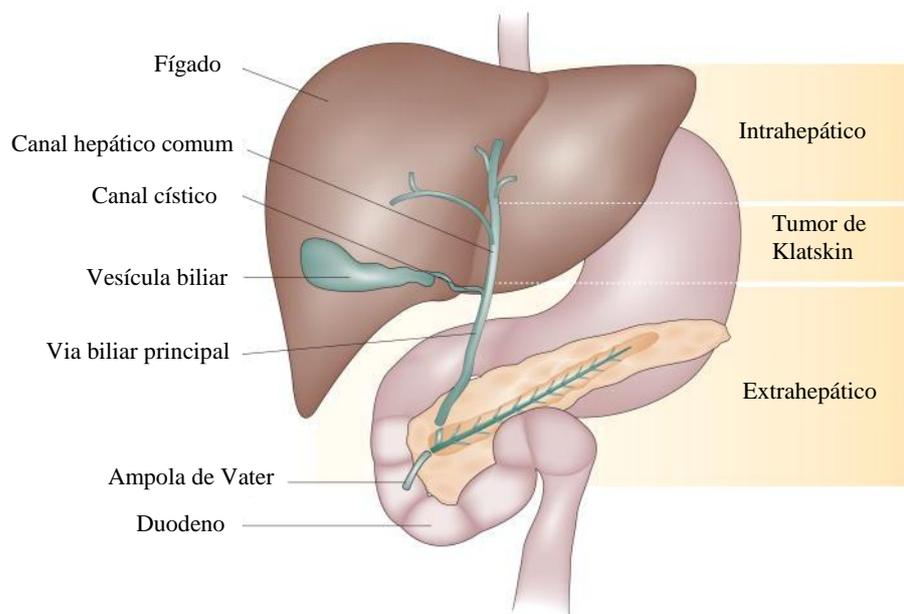


Figura 1 – Imagem representativa dos diferentes tipos de colangiocarcinoma de acordo com a sua localização. Adaptado de Blechacz et al. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012;8:512–22.

Quanto às opções terapêuticas, a resseção cirúrgica é a única potencialmente curativa³. No entanto, poucos são os doentes candidatos a resseção curativa no momento do diagnóstico⁷. A sobrevivência global aos 5 anos após resseção cirúrgica varia entre 10-50% demonstrando a elevada mortalidade subjacente⁵. A radioterapia, quimioembolização

transarterial e quimioterapia têm sido utilizados como tratamentos paliativos, apresentando pouco impacto no aumento da sobrevivência^{2,8}.

Neste âmbito, urge desenvolver novas modalidades terapêuticas, que se apresentem como alternativas eficazes no aumento da sobrevivência destes doentes⁸.

O NIS (*Sodium-Iodide Symporter*) é uma glicoproteína responsável pelo transporte membranar de sódio e iodo. A tiróide regista a maior expressão deste transportador e o seu normal funcionamento é fundamental para a incorporação de iodo pelas células e para a posterior síntese das hormonas tiroideias^{9,10}. No carcinoma da tiróide, este transportador tem sido utilizado na incorporação de iodo radioativo sendo extremamente útil para efeitos de diagnóstico e tratamento¹¹.

A descoberta da expressão do NIS em tecidos extra-tiroideus, incluindo células neoplásicas, abriu um novo paradigma de oportunidades terapêuticas. Vários estudos têm vindo a demonstrar que a expressão endógena do NIS nos tecidos não-tiroideus é superior nas células em proliferação do que nas não proliferativas^{9,12,13}.

Vários autores têm vindo a referir uma associação entre o NIS e o colangiocarcinoma, sendo a sua expressão mais elevada em células de colangiocarcinoma do que em células não neoplásicas^{12,14}. À semelhança do que acontece no carcinoma da tiróide, em que se verificou que a expressão membranar do NIS permite a incorporação celular de Iodo-131 e consequentemente a destruição de células tumorais^{10,11}, a estimulação da expressão do NIS no colangiocarcinoma pode permitir o seu tratamento com radioterapia metabólica com I-131¹⁴, existindo já resultados *in vitro* utilizando linhas celulares de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma^{15,16}.

Assim, este estudo tem como principais objetivos: correlacionar os dados clínicos de doentes com diferentes tipos de colangiocarcinoma com a sua sobrevivência e prognóstico;

avaliar a expressão do NIS em colangiocarcinoma e verificar se existe uma correlação entre a sua expressão e as características clínicas. Pretende-se assim demonstrar que esta pode ser uma estratégia diagnóstica e terapêutica válida e que possa ser possível desenvolver um cenário inovador para esta doença tão devastadora, e com um prognóstico que permanece ainda, infelizmente, muito desfavorável.

Material e métodos

1. Informação Clínica

Este estudo de carácter retrospectivo incidiu sobre uma amostra de 71 doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma submetidos a intervenção cirúrgica e/ou biópsia no Serviço de Cirurgia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), entre 1992 e 2015 após aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina (CE-64/2012). A primeira etapa consistiu na revisão individual de cada caso com recolha da informação clínica relevante no momento do diagnóstico: género, idade, diagnóstico (Intrahepático (IH), tumor de Klatskin (TK) e Extrahepático (EH)), parâmetros bioquímicos (TGO (U/L), TGP (U/L), fosfatase alcalina (FA) (U/L), gama-glutamyl-transferase (GGT) (U/L), bilirrubina (mg/dL), bilirrubina (brb) direta (mg/dL), albumina (g/dL), proteínas totais (g/dL), LDH (U/L), creatinina (mg/dL), Na⁺ (mmol/L), K⁺ (mmol/L)), hematológicos (protrombinémia (%), plaquetas (n^o/μL) e INR) e marcadores tumorais (CEA (ng/mL), CA 19,9 (U/mL) e AFP (ng/mL)), obtidos no momento do diagnóstico e dados anátomo-patológicos: (grau de diferenciação tumoral, presença ou ausência de invasão vascular e invasão das margens cirúrgicas (nos doentes submetidos a intervenção cirúrgica) e sobrevivência após tratamento/cirurgia.

2. Imunohistoquímica

Para além da informação clínica recolhida, foi avaliada a imunoexpressão do NIS em amostras de doentes com colangiocarcinoma e em duas linhas celulares de colangiocarcinoma (colangiocarcinoma Intrahepático – HuCCT1 (JCRB) e colangiocarcinoma Extrahepático – TFK-1 (DSMZ)).

As linhas celulares utilizadas foram submetidas a centrifugação numa Centrifugadora Heraeus Sepatech Labofuge Ae a 1500rpm/5min com posterior inclusão em parafina do

sobrenadante, de forma a permitir coloração por Hematoxilina & Eosina (H&E) e estudo imunohistoquímico, efetuado numa Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH.

A análise imunohistoquímica foi efectuada usando secções embebidas em parafina e fixadas em formol, com recurso ao complexo avidina-biotina peroxidase, utilizando anticorpo NIS (Anti-SLC5A5, policlonal, 1/500, Sigma Aldrich; Recuperação antigénica com Ultra CC1).

As lâminas foram visualizadas num microscópio ótico Nikon Eclipse 50i e as imagens digitais adquiridas utilizando uma câmara digital Nikon Sight DS-Fi1.

3. Análise estatística

As variáveis quantitativas com distribuição gaussiana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para comparação entre três ou mais grupos, e teste t para dois grupos. Para as variáveis quantitativas não paramétricas aplicou-se teste Kruskal Wallis na comparação entre três ou mais grupos e Mann-Whitney para dois grupos. A análise de sobrevivência foi realizada utilizando a curva de Kaplan-Meier e para avaliar as diferenças entre as curvas empregou-se o teste Logrank. Foi admitido erro alfa de 5%, considerando-se significantes valores de $p < 0,05$. Todos os dados obtidos foram analisados nos softwares IBM® SPSS® versão 23 e GraphPad Prism.

Resultados

1. Informação Clínica

1.1. Dados demográficos

A amostra sobre a qual este estudo incidiu foi constituída por um total de 71 doentes, 51 (71,8%) do sexo masculino e 20 (28,2%) do sexo feminino com idade média de 70,6 anos. Relativamente à localização 43 doentes (60,5%) apresentaram colangiocarcinoma Intrahepático, 21 doentes (29,6%) tumor de Klatskin e 7 doentes (9,9%) colangiocarcinoma Extrahepático (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização da amostra de doentes no que respeita à idade, sexo e localização

| Característica | N = 71 (%) |
|----------------------------------|---------------------|
| Idade (média da idade – anos) | 70.6 ± 11.6 (39-93) |
| Sexo | |
| Homens | 51 (71,8%) |
| Mulheres | 20 (28,2%) |
| Tipo de Colangiocarcinoma | |
| Intrahepático | 43 (60,5%) |
| Tumor de Klatskin | 21 (29,6%) |
| Extrahepático | 7 (9,9%) |

Quando dividida a amostra, observou-se que a idade era de $68,2 \pm 12$ anos para os doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, de $76 \pm 8,9$ anos para os doentes com tumor de Klatskin e de $76 \pm 8,9$ anos para os doentes com colangiocarcinoma Extrahepático, sendo a diferença entre os três significativa. Deste modo, procedeu-se à análise das diferenças intergrupos, verificando-se que os doentes com tumor de Klatskin apresentam idade mais avançada comparativamente aos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático ($p=0,0110$), sendo a diferença média de 7,8 anos.

Tabela 2 – Idade dos doentes (média ± DP) com os diferentes diagnósticos de colangiocarcinoma

| | IH | TK | EH | Valor de p |
|--------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Idade | 68,2 ± 12 (39-91) | 76 ± 8,9 (57-93) | 69 ± 11,2 (49-80) | 0,036 |

1.2. Parâmetros analíticos

No que diz respeito aos resultados analíticos (Tabela 2) quando analisada a amostra total de doentes, estes apresentaram valores médios de TGO de 62,7±48,7 (med 45) U/L, TGP de 66,9±69,6 (med 44) U/L, FA de 243,4±200, (med 189) U/L, GGT de 320,8±493,2 (med 162) U/L, bilirrubina total de 5,85±7,62 (med 1,50) mg/dL, bilirrubina direta de 5,31±5,88 (med 2,50) mg/dL, albumina de 3,77±0,72 (med 3,80 g/dL, proteínas totais de 6,75±0,88 (med 6,90) g/dL, LDH 251,7± 115 (med 213) de U/L, creatinina de 0,91±0,37 (med 0,81) mg/dL, Na⁺ de 137,4±2,88 (med 138) mmol/L, K⁺ de 4,29±0,49 (med 4,30) mmol/L, CEA de 14,5±38,6 (med 2,98) ng/mL, CA 19,9 de 735±3030,4 (med 49,5) U/mL e AFP de 4,27±5,66 (med 2,20) ng/mL, protrombinémia de 82,8±19,1 (med 83) %, plaquetas 204,5±79,3 (med 189,50) /μL e INR 1,18±0,196 (med 1,13).

Tabela 3 – Valores laboratoriais obtidos para os doentes no momento do diagnóstico – média ± DP (n)

| | Total | IH | TK | EH | Valor de p |
|----------------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------|
| TGO (U/L) | 62,7±48,7 (n=68) | 51,3±51,8 (n=43) | 84,2±41,6 (n=19) | 76,5±21,8 (n=6) | 0,0004 |
| TGP (U/L) | 66,9±69,6 (n=69) | 46,4±57,2 (n=43) | 111,2±86,8 (n=19) | 72,3±31(n=7) | <0,0001 |
| FA (U/L) | 243,4±200 (n=69) | 190,4±221,6(n=43) | 341,2±129,6 (n=19) | 303,6±110 (n=7) | <0,0001 |
| GGT (U/L) | 320,8±493 (n=69) | 214,3±247 (n=43) | 617,2±806,8 (n=19) | 170±176 (n=7) | 0,0035 |
| Bilirrubina (mg/dL) | 5,85±7,62 (n=69) | 2,18±4,5 (n=43) | 11,97±8,3(n=19) | 11,79±7,9 (n=7) | <0,0001 |
| Brb direta (mg/dL) | 5,31±5,88 (n=48) | 1,72±3,4 (n=22) | 8,3±6,3 (n=19) | 7,8±5,7 (n=7) | <0,0001 |
| Albumina (g/dL) | 3,77±0,72 (n=63) | 3,97±0,74 (n=38) | 3,6±0,59 (n=18) | 3,17±0,61(n=7) | 0,0078 |
| Prot. Totais (g/dL) | 6,75±0,88 (n=63) | 7±0,89 (n=38) | 6,4±0,76 (n=18) | 6,27±0,74 (n=7) | 0,0042 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,91±0,37 (n=68) | 0,83±0,26 (n=42) | 0,97±0,38 (n=19) | 1,21±0,71 (n=7) | 0,1267 |
| LDH (U/L) | 251,7±115 (n=63) | 274,8±133,2 (n=38) | 212,2±78 (n=19) | 230,2±57,7(n=6) | 0,0877 |
| Na+ (mmol/L) | 137,4±2,9 (n=67) | 138±2,7 (n=41) | 136,5±2,48 (n=19) | 136±4,32 (n=7) | 0,0627 |
| K+ (mmol/L) | 4,29±0,49 (n=67) | 4,31±0,5 (n=41) | 4,22±0,53 (n=19) | 4,39±0,41 (n=7) | 0,4828 |
| CEA (ng/mL) | 14,5±38,6 (n=40) | 25,64±61,8 (n=25) | 12,4±32 (n=10) | 3,08±2,36 (n=5) | 0,2341 |
| CA 19,9 (U/mL) | 735±3030 (n=46) | 892±3787 (n=29) | 274,8±407,18 (n=12) | 929,7±1970 (n=5) | 0,3179 |
| AFP (ng/mL) | 4,27±5,66 (n=38) | 5,15±6,46 (n=28) | 1,91±1,01 (n=8) | 1,45±0,35 (n=2) | 0,0323 |
| Protrombinémia (%) | 82,8±19,1 (n=67) | 85,85±13,5 (n=41) | 77,3±21,1 (n=19) | 81,43±14,3 (n=7) | 0,4585 |
| Plaquetas (n°/µL) | 204,5±79 (n=68) | 203,1±86,4 (n=42) | 191,42±56,8 (n=19) | 248,7±88,3 (n=7) | 0,1626 |
| INR | 1,18±0,2 (n=64) | 1,14±0,17 (n=38) | 1,24±0,25 (n=19) | 1,17±0,17 (n=7) | 0,5629 |

Quando dividida a amostra nos três tipos de colangiocarcinoma, verificou-se que para a amostra dos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, os valores eram: TGO de 51,3±51,8 (med 32) U/L, TGP de 46,4±57,2 (med 31) U/L, FA de 190,4±221,65 (med 129) U/L, GGT de 214,3±247 (med 134) U/L, Bilirrubina de 2,18±4,5 (med 0,8) mg/dL, bilirrubina direta de 1,72±3,4 (med 0,45) mg/dL, albumina de 3,97±0,74 (med 4,1) g/dL, proteínas totais de 7±0,89 (med 7,1) g/dL, LDH de 274,8±133,18 (med 218,5) U/L, creatinina de 0,83±0,26 mg/dL, (med 0,785) Na+ de 138±2,7 (med 138) mmol/L, K+ de 4,31±0,5 (med 4,3) mmol/L, CEA de 25,64±61,8 (med 2) ng/mL, CA 19,9 de 892±3787 (med 42) U/mL e AFP de 5,15±6,46 (med 3,45) ng/mL, protrombinémia de 85,85±13,5 (med 84) %, plaquetas

de 203,1±86,4 (med 185) / μ L e INR de 1,14±0,17 (med 1,12).

Os doentes com diagnóstico de tumor de Klatskin apresentaram os seguintes valores: TGO de 84,2±41,6 (med 82) U/L, TGP de 111,2±86,8 (med 83) U/L, FA de 341,2±129,6 (med 335) U/L, GGT de 617,2±806,8 (med 299) U/L, Bilirrubina de 11,97±8,3 (med 10,7) mg/dL, bilirrubina direta de 8,3±6,3 (med 8) mg/dL, albumina de 3,6±0,59 (med 3,75) g/dL, proteínas totais de 6,4±0,76 (med 6,5) g/dL, LDH de 212,2±78 (med 166) U/L, creatinina de 0,97±0,38 (med 0,82) mg/dL, Na⁺ de 136,5±2,48 (med 136) mmol/L, K⁺ de 4,22±0,53 (med 4,1) mmol/L, CEA de 12,4±32 (med 6,95) ng/mL, CA 19,9 de 274,8±407,18 (med 109,5) U/mL e AFP de 1,91±1,01 (med 1,85) ng/mL, protrombinemia de 77,3±21,1 (med 81) %, plaquetas de 191,42±56,8 (med 171) / μ L e INR de 1,24±0,25 (med 1,14).

Por fim os doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Extrahepático apresentaram os seguintes valores: TGO de 76,5±21,8 (med 82) U/L, TGP de 72,3±31 (med 78) U/L, FA de 303,6±110 (med 257) U/L, GGT de 170±176 (med 99) U/L, Bilirrubina de 11,79±7,9 (med 10,9) mg/dL, bilirrubina direta de 7,8±5,7 (med 6,4) mg/dL, albumina de 3,17±0,61 (med 3) g/dL, proteínas totais de 6,27±0,74 (med 6,2) g/dL, LDH de 230,2±57,7 (med 217) U/L, creatinina de 1,21±0,71 (med 0,9) mg/dL, Na⁺ de 136±4,32 (med 137) mmol/L, K⁺ de 4,39±0,41 (med 4,40) mmol/L, CEA de 3,08±2,36 (med 3) ng/mL, CA 19,9 de 929,7±1970 (med 7,2) U/mL e AFP de 1,45±0,35 (med 1,45) ng/mL, protrombinemia de 81,43±14,3 (med 80) %, plaquetas de 248,7±88,3 (med 238) / μ L e INR de 1,17±0,17 (med 1,15).

De todos os parâmetros avaliados verificou-se que existem diferenças com significado estatístico entre as diferentes localizações de colangiocarcinoma relativamente ao doseamento de TGO (p=0,0004), TGP (p<0,0001), FA (p<0,0001), GGT (p=0,0035), Bilirrubina (p<0,0001), Bilirrubina direta (p<0,0001), albumina (p=0,0078), proteínas totais (p=0,0042) e AFP (p=0,0323) encontrando-se as diferenças intergrupos apresentadas na Tabela 3.

Tabela 4 – Resultados da análise das comparações múltiplas

| | IH vs TK | TK vs. EH | EH vs. IH |
|---------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| TGO (U/L) | p<0,01 | | |
| TGP (U/L) | p<0,001 | | |
| FA (U/L) | p<0,001 | | p<0,05 |
| GGT (U/L) | p<0,01 | | |
| Bilirrubina (mg/dL) | p<0,001 | | p<0,001 |
| Brb direta (mg/dL) | p<0,001 | | p<0,01 |
| Albumina (g/dL) | | | p<0,05 |
| Prot. Totais (g/dL) | p<0,05 | | |
| AFP (ng/mL)^{a)} | | | |

a) Na análise dois a dois, não se encontrou nenhuma diferença significativa para o AFP

1.3. Parâmetros terapêuticos (Tipo de Intervenção por tipo de Colangiocarcinoma)

Após o diagnóstico a amostra de doentes foi dividida tendo em conta o tipo de colangiocarcinoma nas diferentes abordagens terapêuticas (Tabela 5): Intervenção curativa que inclui os doentes submetidos a cirurgia com intuito curativo (46 doentes (65,7%)); Intervenção paliativa que inclui todos os doentes submetidos a cirurgia com intuito paliativo e outras intervenções como CPT e CPRE (20 doentes (28,6%)); e doentes que não foram submetidos a qualquer tipo de intervenção para além de tratamento médico de suporte (4 doentes (5,7%)).

Tabela 5 – Tipo de intervenção de acordo com o tipo de diagnóstico de colangiocarcinoma

| | Total | IH | TK | EH |
|-------------------------------|--------------|------------|------------|-----------|
| Intervenção Curativa | 46 (65,7%) | 28 (65,1%) | 12 (57,1%) | 6 (85,7%) |
| Intervenção Paliativa | 20 (28,6%) | 11 (25,6%) | 9 (42,9%) | 1 (14,3%) |
| Intervenção de Suporte | 4 (5,7%) | 4 (9,3%) | | |

Observou-se que, para os doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, foi realizada uma intervenção curativa em 28 doentes (65,1%), paliativa em 11 (25,6%) e de suporte em 4 (5,7%). Nos doentes com tumor de Klatskin, foi realizada intervenção curativa em 12 doentes (57,1%) e paliativa em 9 (42,9%). Nos doentes com colangiocarcinoma Extrahepático, foi realizada intervenção curativa em 6 doentes (85,7%) e paliativa em 1 (14,3%).

1.4 Dados Anátomo-patológicos

Da amostra de doentes total (n=71) foi analisada a informação anátomo-patológica, sendo que nem todos os doentes dispunham desta informação, tendo como justificação: o tipo de intervenção realizada, ausência de uniformidade dos parâmetros anátomo-patológicos nos relatórios ou simplesmente ausência de informação. A informação anátomo-patológica foi classificada quanto à invasão vascular, ao grau de diferenciação do tumor, à presença de invasão ganglionar e à presença de invasão das margens cirúrgicas (Tabela 6). Verificou-se que 25 (56,8%) doentes apresentaram invasão das margens cirúrgicas enquanto que em 19 (43,2%) as margens estavam livres. A avaliação do grau de diferenciação do tumor revelou que, na totalidade da amostra, 7 (15,9%) doentes possuíam tumores pouco diferenciados, 20 (45,5%) moderadamente diferenciados e 17 (38,6%) bem diferenciados. A avaliação da invasão vascular revelou estar presente em 32 (72,7%) doentes e ausente em 12 (27,3%). Invasão ganglionar foi observada em 16 (47,1%) dos doentes e em 18 (52,9%) estava ausente.

Tabela 6 – Parâmetros anátomo-patológicos das amostras obtidas.

| | | Total | IH | TK | EH | Valor de p |
|--------------------------------|-----|--------------|------------|-----------|-----------|-------------------|
| Invasão das margens cirúrgicas | Sim | 25 (56,8%) | 14 (51,9%) | 7(63,6%) | 4 (66,7%) | 0,6987 |
| | Não | 19 (43,2%) | 13 (48,1%) | 4(36,4%) | 2 (33,3%) | |
| Grau de diferenciação do tumor | PD | 7 (15,9%) | 6 (20,7%) | 0 (%) | 1 (20%) | 0,6256 |
| | MD | 20 (45,5%) | 13 (44,8%) | 5 (50%) | 2 (40%) | |
| | BD | 17 (38,6%) | 10 (34,5%) | 5 (50%) | 2 (40%) | |
| Invasão Vascular | Sim | 32 (72,7%) | 21 (75%) | 7 (70%) | 4 (66,7%) | 0,8952 |
| | Não | 12 (27,3%) | 7 (25%) | 3 (30%) | 2 (33,3%) | |
| Invasão ganglionar | Sim | 16 (47,1%) | 12 (60%) | 2(22,2%) | 2 (40%) | 0,8323 |
| | Não | 18 (52,9%) | 8 (40%) | 7(77,8%) | 3 (60%) | |

PD – Pouco diferenciado; MD – Moderadamente Diferenciado, BD – Bem Diferenciado

Quando a amostra de doentes foi dividida nos três grupos verificou-se que no grupo de doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Intrahepático 14 (51,9%) apresentaram invasão das margens cirúrgicas enquanto que em 13 (48,1%) as margens estavam livres. A avaliação do grau de diferenciação do tumor revelou que, neste subgrupo, 6 (20,7%) doentes possuíam tumores pouco diferenciados, 13 (44,8%) moderadamente diferenciados e 10 (34,5%) bem diferenciados. A avaliação da invasão vascular revelou que estava presente em 21 (75%) doentes e ausente em 7 (25%). No que diz respeito à invasão ganglionar, estava presente em 12 doentes (60%) e ausente em 8 (40%). No grupo com diagnóstico de tumor de Klatskin verificou-se que 7 doentes (63,6%) apresentaram invasão das margens cirúrgicas enquanto que em 4 (36,4%) as margens estavam livres. A avaliação do grau de diferenciação do tumor revelou que, neste subgrupo, 0 doentes (0%) possuíam tumores pouco diferenciados, 5 (50%) moderadamente diferenciados e 5 doentes (50%) bem diferenciados. A avaliação da invasão vascular revelou que estava presente em 7 doentes (70%) e ausente em 3 (30%).

Relativamente à invasão ganglionar, estava presente em 2 (22,2%) e ausente em 7 doentes (77,8%). Por fim, a análise no grupo de doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Extrahepático revelou que 4 (66,7%) doentes apresentaram invasão das margens cirúrgicas enquanto que em 2 doentes (33,3%) as margens estavam livres. A avaliação do grau de diferenciação do tumor revelou que, neste subgrupo, 1 (20%) doente possuía um tumor pouco diferenciado, 2 (40%) moderadamente diferenciados e 2 doentes (40%) bem diferenciados. A avaliação da invasão vascular revelou que estava presente em 4 doentes (66,7%) doentes e ausente em 2 doentes (33,3%). A invasão ganglionar estava presente em 2 doentes (40%), e ausente em 3 (60%). Em qualquer dos parâmetros analisados ao nível da anatomia patológica não se verificaram diferenças com significado estatístico entre os grupos.

1.5. Análise de sobrevivência

A sobrevivência média da amostra total dos doentes, independentemente do tipo de colangiocarcinoma e do tipo de tratamento, foi de $30,422 \pm 6,5$ meses (med 8) (Figura 2).

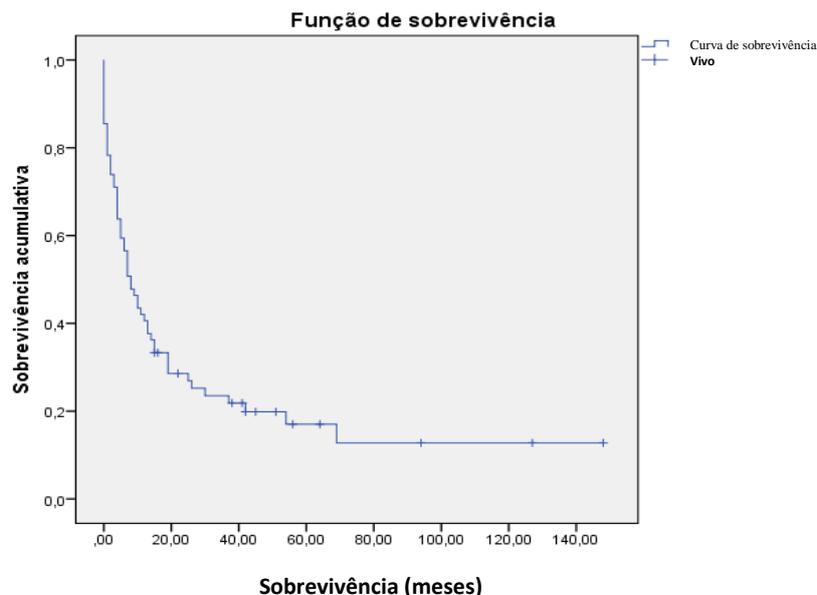


Figura 2 – Sobrevivência global de amostra total de doentes.

Apresentaram uma sobrevivência a 1, 3 e 5 anos de 40,8%, 23,9% e 19,7%, respectivamente.

Quando avaliadas as sobrevivências médias tendo em conta o tipo de localização, com representação na Figura 3, verificou-se que existem diferenças com significado estatístico ($p=0,007$) na sobrevivência média global de doentes tendo em conta o tipo de diagnóstico independentemente do tipo de intervenção realizada. Conclui-se que, no grupo de doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Intrahepático, a sobrevivência global média é de $38,14 \pm 8,66$ meses, valor que é significativamente superior ao da sobrevivência dos doentes com diagnóstico de tumor de Klatskin, de $9,24 \pm 3,97$ meses e dos doentes com diagnóstico de colangiocarcinoma Extrahepático de $11,29 \pm 2,81$ meses, quando não é feita a distinção entre os tipos de tratamento.

A sobrevivência a 1, 3 e 5 anos foi de 56,1%, 29,3% e 9,8% para os doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, de 14,3%, 9,5% e 4,8% para os doentes com tumor de Klatskin e de 42,9%, 0% e 0% para os doentes com colangiocarcinoma Extrahepático.

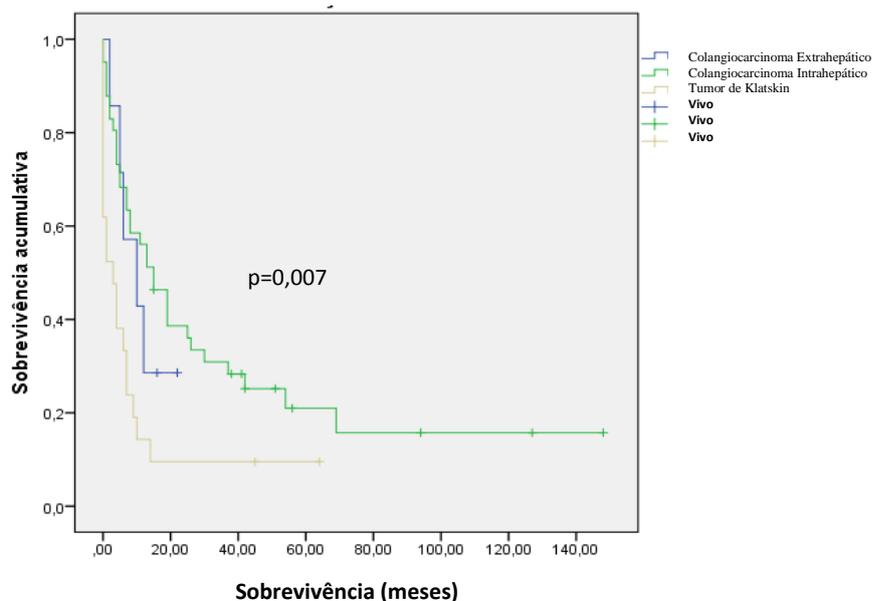


Figura 3 – Curvas de sobrevivência global tendo em conta o tipo de diagnóstico: colangiocarcinoma Intrahepático, tumor de Klatskin e colangiocarcinoma Extrahepático.

Quando analisada a sobrevivência dos doentes com Colangiocarcinoma Intrahepático, distinguindo os doentes submetidos a intervenção cirúrgica curativa e a intervenção paliativa (Figura 4), verificou-se que a diferença é significativa ($p=0,028$), sendo de $49,23 \pm 11,44$ (med 19) meses para os doentes submetidos a tratamento curativo e de $12,05 \pm 2,99$ (med 11) meses para os doentes submetidos a tratamento paliativo.

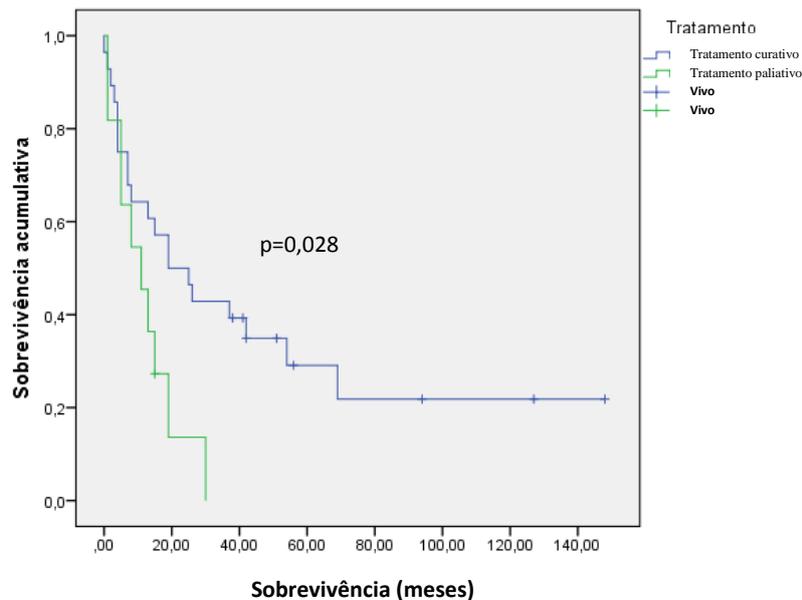


Figura 4 – Curvas de sobrevivência dos doentes com Colangiocarcinoma Intrahepático tendo em conta o tipo de intervenção: paliativa ou curativa.

Quando analisada a sobrevivência dos doentes com tumor de Klatskin, distinguindo os doentes submetidos a intervenção cirúrgica curativa e a intervenção paliativa (Figura 5), verificou-se que é maior para os doentes submetidos a tratamento curativo, de $13,33 \pm 3,78$ (med 3) meses, do que para os doentes submetidos a tratamento paliativo, que é de $3,78 \pm 1,40$ (med 1), meses. A diferença não é, no entanto, estatisticamente significativa.

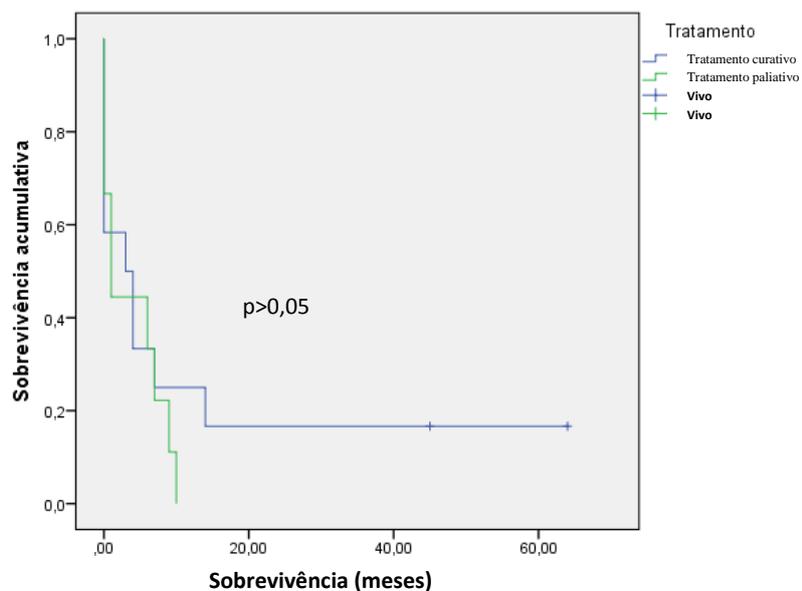


Figura 5 – Curvas de sobrevivência dos doentes com tumor de Klatskin tendo em conta o tipo de intervenção: paliativa ou curativa.

Na Figura 6, analisou-se a sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma Extrahepático, distinguindo os doentes submetidos a intervenção cirúrgica curativa dos submetidos a intervenção paliativa.

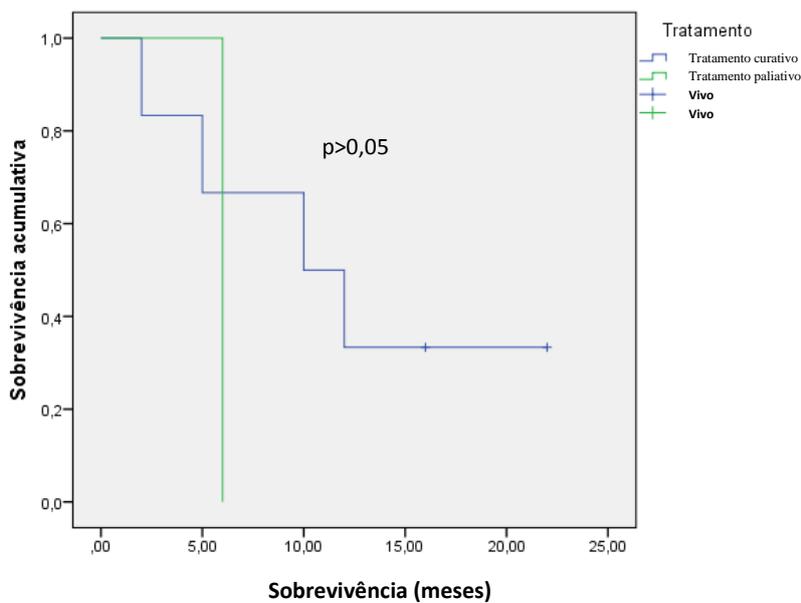


Figura 6 – Curvas de sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma Extrahepático tendo em conta o tipo de intervenção: paliativa ou curativa.

Verificou-se que é maior, apesar de não ser estatisticamente significativa, para os doentes submetidos a tratamento curativo, de $12,17 \pm 3,13$ (med 10) meses, do que para os doentes submetidos a tratamento paliativo, que é de 6 ± 0 (med 6) meses, já que neste caso é só um doente.

Foram analisados os seguintes parâmetros quanto ao impacto na sobrevivência dos doentes: Grau de diferenciação tumoral; Invasão vascular; Margens cirúrgicas; Invasão Ganglionar (N). Observou-se que a invasão vascular tem uma correlação negativa com significado estatístico ($r=-0.370$; $p=0.013$) com a sobrevivência.

Quando analisadas as curvas de sobrevivência em relação com a invasão vascular em cada tipo de colangiocarcinoma verificou-se que existem diferenças com significado estatístico ($p=0,006$), sendo que essas diferenças se observam unicamente o grupo dos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático (IH com invasão vascular: sobrevivência média (meses) 21,32 IC95 11,998; 30,66; IH sem invasão vascular: sobrevivência média (meses) 91,7 IC95 50,36; 133,07) (Figura 7). Observou-se, para os outros dois tipos de colangiocarcinoma, que também há diferenças relativamente à sobrevivência quando a invasão vascular está presente ou ausente. A sobrevivência é menor quando a invasão vascular está presente mas a diferença não é, no entanto, estatisticamente significativa.

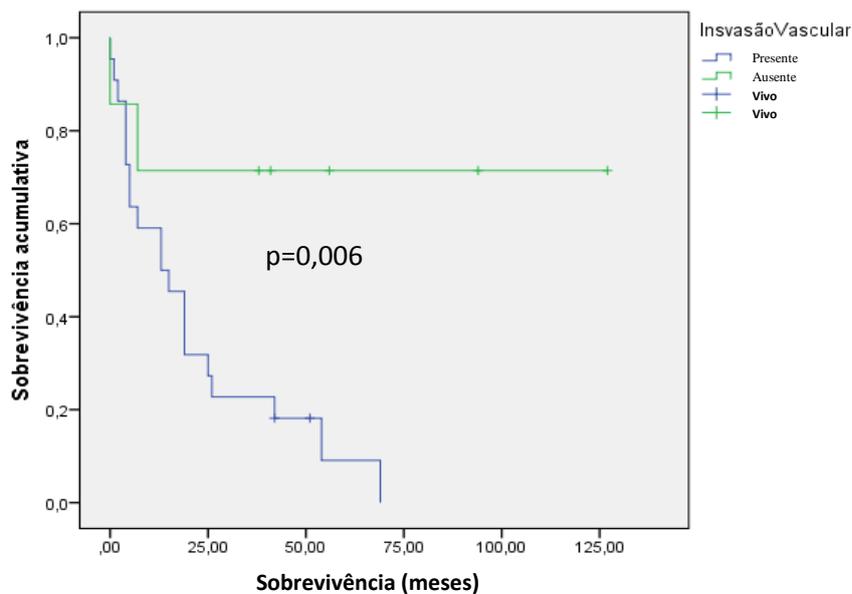


Figura 7 – Curvas de sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático tendo em conta a invasão vascular: presente ou ausente.

Observou-se que também que a invasão ganglionar (N1) possui uma correlação negativa com significado estatístico ($r=-0.460$ $p=0.006$) na sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma.

Após utilização da regressão linear somente a invasão ganglionar (N1) se apresenta como fator independente de prognóstico de sobrevivência ($p=0,041$).

2. Imunohistoquímica

Com o objetivo de avaliar a expressão de NIS foram analisadas algumas amostras de doentes com diferentes tipos de colangiocarcinoma. Assim, de acordo com a Figura 8 é possível observar que em nenhuma amostra existe imunomarcacção compatível com a expressão de NIS.

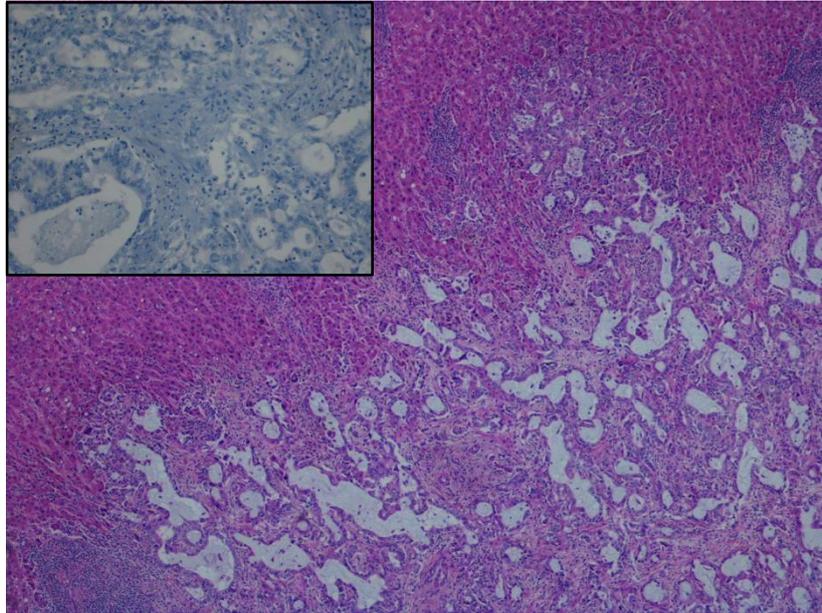


Figura 8A – Colangiocarcinoma Intrahepático, H&E 40x, sem imunoposição para NIS (imagem no canto superior esquerdo, 100x).

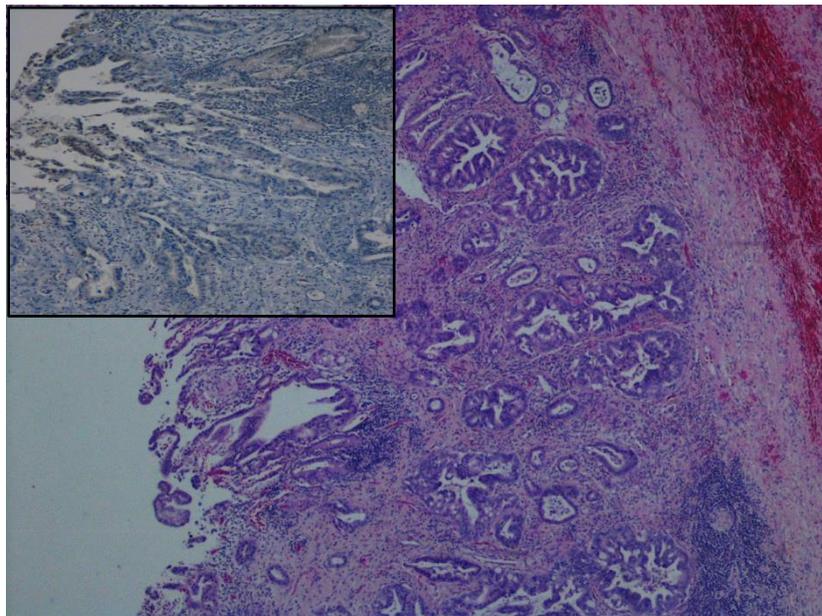


Figura 8B – Colangiocarcinoma Extrahepático, H&E 40x, sem imunoposição para NIS (imagem no canto superior esquerdo, 100x).

Tendo em conta os resultados obtidos com as amostras provenientes de doentes, foi avaliada a imunoposição de NIS em duas linhas celulares de colangiocarcinoma de diferente localização; colangiocarcinoma Intrahepático – HuCCT1 (JCRB) e colangiocarcinoma Extrahepático – TFK-1 (DSMZ). De acordo com a Figura 9 é possível observar que em ambas as linhas há imunoposição membranar, completa e incompleta, para NIS, sendo esta mais intensa na linha TFK-1 (DSMZ).

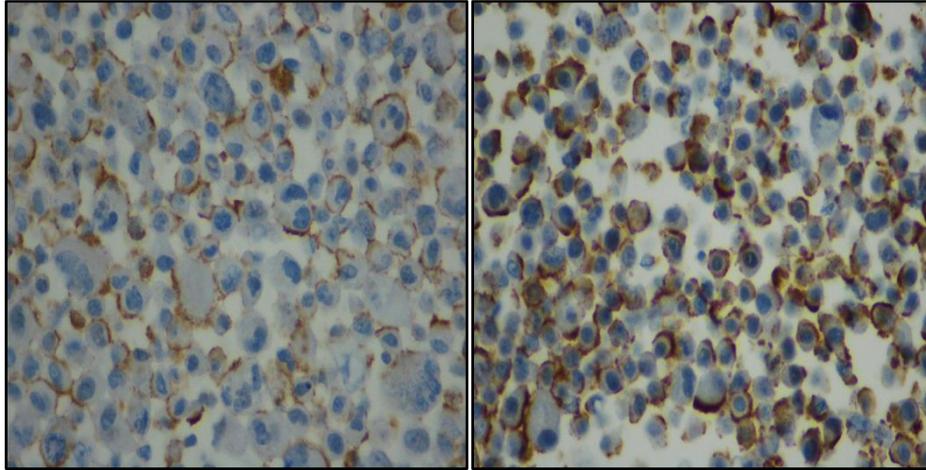


Figura 9 – Imunomarcacão para NIS nas linhas HuCCT1 (JCRB) – à esquerda; e TFK-1 (DSMZ) – à direita, 400x

Discussão

O colangiocarcinoma é o tumor maligno mais comum das vias biliares e apresenta um mau prognóstico. Poucos estudos têm relacionado os diferentes tipos de colangiocarcinoma¹⁷⁻¹⁹, e a grande maioria incide apenas num dos tipos²⁰⁻²². No que diz respeito aos dados epidemiológicos, verificou-se que a idade média da amostra é de 70,6 anos e que a maioria dos doentes é do sexo masculino. Tendo em conta as estatísticas referentes aos tumores primários do fígado, e de acordo com o encontrado, é no sexo masculino que se verifica uma maior incidência deste tipo de tumores, bem como em pessoas de idade avançada²³.

O tipo de colangiocarcinoma mais frequente nesta amostra de doentes foi o Intrahepático (60,5%), seguido do tumor de Klatskin (29,6%) e do Extrahepático (9,9%). De acordo com a bibliografia, o tumor de Klatskin é normalmente apontado como o mais frequente, seguido do Extrahepático e do Intrahepático². Tendo em conta a amostra deste estudo, a discrepância de frequências pode ser em parte explicada pelo facto de que, para os diferentes tipos de colangiocarcinoma a recolha de dados corresponde a espaços temporais diferentes, sendo que para o colangiocarcinoma Intrahepático a recolha de dados incide sobre um espaço temporal maior, o que dessa forma implica a existência de um maior número de doentes com este tipo. Para além disto, o tipo Intrahepático é muito frequentemente subdiagnosticado⁷, o que pode contribuir para a sua menor proporção noutras séries. Por outro lado, existem dados que referem um aumento da incidência do tipo Intrahepático relativamente aos restantes^{3,4}.

Relativamente aos parâmetros analíticos considerados, observou-se que existem algumas diferenças significativas nos seus valores quando comparados os três tipos de diagnóstico de colangiocarcinoma.

De acordo com o processo de carcinogénese do colangiocarcinoma Extrahepático e do tumor de Klatskin, é facilmente compreensível que estes doentes apresentem valores mais elevados de bilirrubinémia e FA na altura do diagnóstico, já que as massas tumorais provocam uma colestase mais marcada do que o colangiocarcinoma Intrahepático³. Em relação à GGT, o aumento no tumor de Klatskin em relação ao colangiocarcinoma Intrahepático também pode ser explicado pelo mesmo motivo. Relativamente aos valores de TGO e TGP, o facto de se encontrarem mais elevados nos doentes com tumor de Klatskin quando comparados com os valores dos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, poderá ser explicado pelo sofrimento hepático secundário à colestase causada pelo tumor de Klatskin, o que também poderá contribuir para o seu mau prognóstico, já que é possível que indique a existência de função hepática mais degradada aquando do diagnóstico.

Para além disto, é necessário também realçar a ausência de diferenças significativas nos restantes parâmetros analíticos quando comparados os doentes com tumor de Klatskin e colangiocarcinoma Extrahepático, o que sugere que estes dois tipos tenham um comportamento fisiopatológico semelhante, facto reforçado pelas suas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier serem praticamente sobreponíveis, não existindo diferenças com significado estatístico entre as curvas de sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma Extrahepático, comparativamente aos que têm tumor de Klatskin. No entanto, e porque a amostra de doentes com colangiocarcinoma Extrahepático é reduzida (7 doentes), provavelmente não é representativa, já que outras séries reportam diferenças entre a sobrevivência nestes 2 grupos^{18,19}.

Relativamente às características anátomo-patológicas, analisando a presença ou ausência de invasão vascular e o grau de diferenciação tumoral, não se encontram diferenças significativas entre os três tipos de colangiocarcinoma, o que pode sugerir que sejam o mesmo tumor e que o seu comportamento varie dependendo do local de origem no epitélio biliar¹.

No que diz respeito à terapêutica, ou seja, realização de cirurgia com intuito curativo ou tratamento paliativo, na amostra de doentes, 65,7 % dos casos foram submetidos a intervenção cirúrgica curativa, percentagem semelhante à descrita em vários estudos^{1,24}. Quando analisadas as sobrevivências após tratamento com intuito curativo dos doentes com os três tipos de colangiocarcinoma, verificou-se que a sobrevivência é significativamente maior para os doentes com colangiocarcinoma Intrahepático ($49,23 \pm 11,44$ meses) comparativamente com os doentes com tumor de Klatskin, ($13,33 \pm 3,78$), e com colangiocarcinoma Extrahepático, ($12,17 \pm 3,13$), o que vai de encontro aos resultados de dois grandes estudos retrospectivos, elaborados por DeOliveira et al.¹⁸ e por Nakeeb et al.¹⁹, que reportam sobrevivências maiores para os doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, apesar das diferenças não serem tão marcadas. Tal facto pode dever-se a estes doentes apresentarem mais frequentemente uma resseção R0 do que os outros tipos, como descrito por Ercolani et al., num largo estudo retrospectivo que englobou 479 doentes com colangiocarcinoma, já que este tipo de colangiocarcinoma parece ter uma probabilidade mais baixa de metastizar para os gânglios linfáticos e de invasão perineural quando comparado com os outros dois tipos, comportamento que poderá ser explicado por alterações biomoleculares que até ao momento não se encontram caracterizadas¹.

Ao analisar as curvas de sobrevivência tendo em conta o tipo de intervenção terapêutica (curativa *versus* paliativa), verificou-se que para o colangiocarcinoma Intrahepático existe diferença significativa entre as sobrevivências do grupo de doentes submetido a tratamento paliativo e do grupo de doentes submetido a tratamento curativo. A cirurgia com intuito curativo pode assim ser considerada um fator que influencia a sobrevivência dos doentes com colangiocarcinoma Intrahepático, o que vai de encontro aos resultados publicados por Castro e Sousa et al.²⁵.

Nos outros tipos de colangiocarcinoma, a partir da análise das curvas de sobrevivência, observa-se também que os doentes vivem substancialmente mais tempo se sujeitos a intervenção com intuito curativo, como descrito por Hu et al.²⁴, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas. O facto de o número de casos de doentes com tumor de Klatskin e de colangiocarcinoma Extrahepático ser reduzido nesta série pode também dificultar a obtenção de resultados significativos.

A invasão vascular ($p=0,013$) e a invasão ganglionar (N1) ($p=0,006$) podem ser consideradas, de acordo com os resultados deste trabalho, como fatores com influência na sobrevivência para o colangiocarcinoma Intrahepático, como descrito por Castro e Sousa et al.²⁵ e por Murakami et al.¹⁷, respectivamente. É mesmo referido por Ercolani et al. que a presença de invasão microvascular é o fator que tem mais impacto na sobrevivência dos três tipos de colangiocarcinoma, impacto esse que também se verificou no nosso trabalho quando foi analisada a amostra total que inclui os três tipos de doentes¹. No entanto, quando se avaliou cada tipo individualmente, apenas se obteve significância estatística para o grupo do colangiocarcinoma Intrahepático, podendo ser uma consequência do facto de a amostra para o tumor de Klatskin e colangiocarcinoma Extrahepático ser reduzida.

Os resultados deste estudo, relativamente à sobrevivência geral (sobrevivência geral cumulativa aos 5 anos de 19,7%), e a sobrevivência reduzida nos doentes que não são submetidos a terapêutica cirúrgica curativa sustentam a necessidade crescente de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas alternativas ao tratamento cirúrgico curativo para o colangiocarcinoma. O NIS surge como uma opção para radioterapia metabólica utilizando o Iodo-131. Até ao momento existem poucos estudos que relatem a expressão de NIS em colangiocarcinoma^{12,14}. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, nenhuma amostra dos doentes com diferente diagnóstico de colangiocarcinoma, Intrahepático e Extrahepático, revelou expressão de NIS, contrariamente aos resultados

encontrados para as linhas celulares de colangiocarcinoma. Num estudo desenvolvido por Kim et al²⁶, a expressão de NIS verifica-se somente em parte das amostras estudadas de colangiocarcinoma Intrahepático, sendo que a expressão detetada foi na sua maioria citoplasmática. No entanto 33,3% da amostra estudada revelou simultaneamente expressão ao nível membranar. Desta forma e de acordo com os resultados obtidos, é imperativo o aumento da amostra.

Conclusão

Com este trabalho, foi posto em evidência que o tratamento cirúrgico com intuito curativo, sendo a única opção potencialmente curativa, tem resultados significativamente superiores ao tratamento com intuito paliativo no aumento da sobrevivência dos doentes com os três tipos de colangiocarcinoma. O colangiocarcinoma Intrahepático é aquele em que se verificaram resultados mais satisfatórios do tratamento cirúrgico com intuito curativo no aumento da sobrevivência. Os fatores com influência na sobrevivência foram a invasão ganglionar (N1) e a invasão vascular. O único capaz de influenciar o prognóstico de forma independente foi a invasão ganglionar.

A sobrevivência reduzida dos doentes submetidos a tratamento paliativo quando comparada com a sobrevivência nos doentes submetidos a tratamento cirúrgico curativo demonstra a falta de alternativas terapêuticas eficazes à cirurgia com intuito curativo.

Deste modo, numa perspetiva de dar continuidade a este trabalho, apesar de neste estudo não se ter detetado expressão membranar do NIS num pequeno grupo de doentes, afigura-se necessário alargar o número de casos analisados para a expressão do NIS.

É importante compreender se o NIS pode, de facto, constituir uma base para uma terapêutica de futuro e ser encarado como uma opção alternativa a considerar.

Bibliografia

1. 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;41:1162–9.
2. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2014;383:2168–79.
3. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;8:512–22.
4. Eckel F, Brunner T, Jelic S. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22:vi40–4.
5. Loehrer AP, House MG, Nakeeb A, Kilbane EM, Pitt HA. Cholangiocarcinoma: are North American surgical outcomes optimal? *J Am Coll Surg* 2013;216:192–200.
6. Francis H, Alpini G, DeMorrow S. Recent advances in the regulation of cholangiocarcinoma growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G1–9.
7. Patel T. Cholangiocarcinoma—controversies and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:189–200.
8. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005;41:5–15.
9. Micali S, Bulotta S, Puppini C, Territo A, Navarra M, Bianchi G, et al. Sodium iodide symporter (NIS) in extrathyroidal malignancies: focus on breast and urological cancer. *BMC Cancer* 2014;14:303.
10. Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact. *Endocr Rev* 2014;35:106–49.

11. Kogai T, Brent G a. The Sodium Iodide Symporter (NIS): Regulation and Approaches to Targeting for Cancer Therapeutics. *Pharmacol Ther* 2013;135:355–70.
12. Guerrieri F, Piconese S, Lacoste C, Schinzari V, Testoni B, Valogne Y, et al. The sodium/iodide symporter NIS is a transcriptional target of the p53-family members in liver cancer cells. *Cell Death Dis* 2013;4:e807.
13. Boelaert K, Franklyn J a. Sodium iodide symporter: A novel strategy to target breast, prostate, and other cancers? *Lancet* 2003;361:796–7.
14. Liu B, Hervé J, Bioulac-Sage P, Valogne Y, Roux J, Yilmaz F, et al. Sodium iodide symporter is expressed at the preneoplastic stages of liver carcinogenesis and in human cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2007;132:1495–503.
15. Knoop K, Kolokythas M, Klutz K, Willhauck MJ, Wunderlich N, Draganovici D, et al. Image-guided, Tumor Stroma-targeted (131)I Therapy of Hepatocellular Cancer After Systemic Mesenchymal Stem Cell-mediated NIS Gene Delivery. *Mol Ther* 2011;19:1704–13.
16. Fernandes AI, Ribeiro AC, Brito AF, Abrantes AM, Santos K, Gonçalves AC, et al. 746: Metabolic radiotherapy in cholangiocarcinoma: An option in the future? *Eur J Cancer* 2014;50:S179.
17. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Kondo N, et al. Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011;18:651–8.
18. 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;245:755–62.

19. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, et al. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg* 1996;224:463–73; discussion 473–5.
20. Farley DR, Weaver AL, Nagorney DM. “Natural history” of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. *Mayo Clin Proc* 1995;70:425–9.
21. Cameron JL, Pitt HA, Zinner MJ, Kaufman SL, Coleman J. Management of proximal cholangiocarcinomas by surgical resection and radiotherapy. *Am J Surg* 1990;159:91–7; discussion 97–8.
22. Kelley ST, Bloomston M, Serafini F, Carey LC, Karl RC, Zervos E, et al. Cholangiocarcinoma: advocate an aggressive operative approach with adjuvant chemotherapy. *Am Surg* 2004;70:743–8; discussion 748–9.
23. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5–29.
24. Hu H-J, Mao H, Shrestha A, Tan Y-Q, Ma W-J, Yang Q, et al. Prognostic factors and long-term outcomes of hilar cholangiocarcinoma: A single-institution experience in China. *World J Gastroenterol* 2016;22:2601–10.
25. Sousa FC, Silva ET da, Tralhão JG, Costa B, Martins M, Serôdio M, et al. Colangiocarcinoma Intra-Hepático. *Rev. Port. Cir.*2012;33–42.
26. Kim JH, Han SY, Lee SW, Baek YH, Kim HY, Jeong JS, et al. Sodium iodide symporter and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten expression in cholangiocarcinoma analysis with clinicopathological parameters. *Gut Liver* 2012;6:374–80.

