

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E VALOR
PROGNÓSTICO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS NANOG, DPPA4 E CCND2 EM
TUMORES TESTICULARES NÃO SEMINOMATOSOS**

RAVENDRA RYAN MONIZ

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Moniz, Ravendra Ryan

Expressão imunoistoquímica e valor prognóstico dos marcadores de células-tronco tumorais NANOG, DPPA4 e CCND2 em tumores testiculares não seminomatosos / Ravendra Ryan Moniz, 2011.

112p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. PROGNÓSTICO 2. CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS
3. NEOPLASIAS TESTICULARES 4. IMUNOISTOQUÍMICA 5. CICLINA D2.

DEDICATÓRIA

A Camila, minha esposa, pelo amor, incentivo e parceria ao dividir as dificuldades e angústias da vida de um médico. Sua companhia é vital.

A meus amados pais, Egídio e Valéria, por dedicarem suas vidas aos seus filhos. Apoio irrestrito em todos os momentos, faço das minhas conquistas suas vitórias.

Ao meu irmão e sua esposa, Nilesh e Giovana, pela amizade e carinho

Aos avós, Helena e Riário Moniz (i.m.), Lilia (i.m.) e Joaquim Lobo (i.m.), pelo carinho apesar da distância que nos separou durante a minha infância.

Aos meus sogros e cunhado, Carlos, Solange e Marcelo, pelo apoio e amizade em todos os momentos.

.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, meu orientador e grande incentivador, pela confiança depositada, dedicação, eficiência e ensinamentos fundamentais para a elaboração desta dissertação. Um exemplo a ser seguido.

A Profa. Dra. Isabela Werneck da Cunha, minha co-orientadora, pela dedicação e eficiência na avaliação patológica dos casos que compõe o estudo. Além da disponibilidade constante para orientação e elaboração desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica e da Pós-Graduação, pela receptividade e apoio fundamental para conclusão do estudo .

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C. Camargo pelo apoio que tornou possível este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, Diretor do Núcleo de Urologia do Hospital A.C. Camargo, pela amizade, ajuda, ensinamentos e incentivo desde o início até o final desta realização, principalmente na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Francisco Paulo da Fonseca, médico Titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pelos constantes ensinamentos e pelo exemplo de dedicação.

Ao colega Prof. Dr. Carlos Sacomani pela receptividade e incentivo.

Ao Hospital A.C. Camargo, excelência em ensino e pesquisa, instituição que prima não apenas pela docência, mas também pelo alto nível das suas publicações.

Ao Prof. Dr. Marjo Perez, Chefe do Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio e confiança ao longo da minha formação.

Ao Dr. Moacyr Fucs, Professor de Urologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela fundamental participação na minha formação como médico e urologista, exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Roni de Carvalho Fernandes, Assistente do Serviço de Urologia da Disciplina de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pela competência e dedicação admirável. Foi fundamental na minha formação urológica, incentivando e apoiando as escolhas durante a residência. Pelo elo com os médicos do Hospital do Câncer que me possibilitaram essa realização.

A Santa Casa de São Paulo, seus professores e preceptores, onde desde 2005, fui calorosamente acolhido, um hospital de características únicas. Muito obrigado por me ensinar a arte da cirurgia.

Ao Dr. José Gonzaga Teixeira de Camargo, Diretor Adjunto do Centro de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelo incentivo quando optei em seguir a carreira cirúrgica e pela orientação científica desde o início da formação médica.

Ao Dr. Odorino Kagohara, Professor da Disciplina de Bases e Técnicas Operatórias da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelo incentivo quando optei por seguir a carreira cirúrgica.

A Pontifícia Universidade Católica de Campinas, seus professores e preceptores, uma escola médica completa, em termos éticos, técnicos e principalmente, sociais. Muito obrigado por me ensinar o valor da medicina humanizada.

Aos grandes e velhos amigos Clayton da Silva, Gustavo Roderio, Guilherme Moraes e José Augusto Xavier pela amizade desde a adolescência.

Aos amigos companheiros de faculdade, Dr. Daniel Simões, Dr. Henrique Gobbo, Dr. Luis Antonio Bonetti Jr, Dr. Mauro Avanzi, Dr. Paulo Alcantara, Dr. Renato dos Santos Borega, Dr. Renato Almeida Rosa de Oliveira, Dr. Ricardo Pires da Silva, Dr. Roberto Martins Mattos, Dr. Tiago Dini, Dr. Thiago Agostini Braga e Dr. Thiago da Silveira Manzione, por compartilhar as alegrias e dificuldades durante a formação médica.

Ao colega e amigo Dr. André Costa Matos, pelo companheirismo, amizade, desde a residência de cirurgia geral até os dias atuais.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Dr. Fernando Korkes, Dr. Artur Ramos Moreno, Dr. Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto, Dr. Moacir Rafael Radaelli, Dr. Hallison Costa, Dr. Mauricio Akira, Dr. Rui Wanderley Mascarenhas, Dr. Mario Luis Casellas, Dr. Lino Cerveira, Dr. Milton Cuppoloni, Dr. Alexandre Simões, Dr. Rodrigo Guerra, Prof.Dr. Daniel Seabra, Dr. Fabio de Souza pelo apoio e amizade.

Aos preceptores durante a residência de urologia: Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Celso de Oliveira, Dr. Silvio da Ressurreição Pires, Dr. Christian Fuhro, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Luis Gustavo de Morato Toledo, Dr. Adalberto Andriolo Junior, Dr. Alex Menezes, Dr. Marcos Bróglia, Dr. Rodrigo Wilson Andrade, Dr. Antonio João de Aquino e Dr. Gilvan Ferreira pelos ensinamentos fundamentais .

Aos colegas de pós graduação, Dr. Álvaro Bosco, Dr. Gustavo Cuck, Dr. Walter da Costa, Dr. Luiz Renato Guidoni, Dr. Ricardo De La Roca, Dr. Rodrigo Madeira Campos, Dr. Victor Fani e Dr. Marcelo Iwamoto pela amizade e apoio nesses dois anos de novos desafios.

Ao Dr. André Nicolau Pinto Jorge, pelo apoio e amizade. Urologista de valores éticos e profissionais exemplares .

Ao Dr. Adriano Pinto, pelo apoio e incentivo no início da carreira acadêmica como Professor da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina do Centro Universitário São Camilo.

Ao Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha e a Sra. Suely Nonogaki do laboratório de imunoistoquímica do Hospital AC Camargo, pela amizade e fundamental colaboração na realização desse trabalho.

A Sra. Ana Hidalgo e Sr. Cesar Torres, pela colaboração, dedicação primorosa e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

A Sra. Inês Nishimoto pelo apoio na realização da análise estatística.

A biblioteca do Hospital do Câncer e todos os funcionários, em especial a Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital A.C. Camargo, pelas sugestões, orientações e revisão desta dissertação

A Sra. Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kuninari da pós graduação do Hospital A.C. Camargo, pelo cuidado, organização e competência.

RESUMO

Moniz RM. **Expressão imunoistoquímica e valor prognóstico dos marcadores de células-tronco tumorais NANOG, DPPA4 e CCND2 em tumores testiculares não seminomatosos.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente]

Introdução: O câncer de testículo é uma neoplasia que perfaz 1 a 2% de todos tumores malignos que acometem homens. No entanto, é uma doença de extrema importância por ser o tumor maligno mais prevalente entre homens jovens de 15 a 34 anos e ser potencialmente curável mesmo na vigência de doença metastática extensa. Recentemente, foi introduzido o conceito de células-tronco tumorais que são definidas como células derivadas de neoplasias malignas, com a característica de promover a regeneração neoplásica de forma integral. **Objetivos:** Estudar a expressão imunoistoquímica dos marcadores de células-tronco tumorais CCND2, DPPA4 e NANOG em tumor de células germinativas não seminomatoso primário de testículo e sua correlação com prognóstico. **Método:** Foram coletados os dados de 27 pacientes com diagnóstico de tumor de células germinativas do testículo não seminomatoso que foram submetidos a orquiectomia radical e ulterior linfadenectomia retroperitoneal, entre 1982 e 2007. A avaliação da expressão imunoistoquímica de CCND2, DPPA4 e NANOG foi feita de forma não automatizada em cada componente tumoral isoladamente. **Resultados:** A baixa expressão dos marcadores esteve associada a melhores taxas de sobrevida, mas sem significância estatística. Na presença de expressão elevada de NANOG a probabilidade de SG em 5 anos foi de 90,5% e se a expressão estava reduzida de 81,8% ($p=0,659$). Quando houve expressão elevada de CCND2 a probabilidade de SG em 5 anos foi de 80,5% e se a expressão estava diminuída a taxa foi de 100,0% ($p=0,158$). Na alta expressão de DPPA4 a probabilidade de SG em 5 anos foi de 85,9% e se a expressão estava reduzida a taxa foi de 100,0% ($p=0,430$). Na expressão reduzida de CCND2 ou de DPPA4 houve tendência de ganho na SG uma vez que a probabilidade de SG em 5 anos nesse grupo foi de 100% e a SG geral foi

de 88,4%. A expressão dos marcadores relacionou-se com a diferenciação do tecido tumoral. Tecidos indiferenciados como a neoplasia intratubular, o componente seminomatoso e o carcinoma embrionário apresentaram expressão elevada. Tecidos especializados, como teratoma e coriocarcinoma apresentaram menor expressão ou ausência dos marcadores estudados. **Conclusões:** A expressão imunoistoquímica dos marcadores seguiu um padrão específico de acordo com a diferenciação tumoral. Os tumores do subtipo coriocarcinoma não expressaram CCND2 e NANOG. Os tumores do subtipo teratoma maduro ou imaturo não expressaram NANOG. A expressão dos marcadores não conseguiu predizer a presença de metástases linfonodais retroperitoneais e não teve impacto sobre a SLD, SCE e SG.

SUMMARY

Moniz RM. **Immunohistochemical expression and prognostic value of tumoral stem cells markers NANOG, DPPA4 and CCND2 in nonseminomatous testicular tumors.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente]

Introduction: Testicular cancer is a neoplasia that accounts for 1 to 2% of all malignant tumors that affect males. However, this disease is very important as it is the most prevalent malignancy in young men between the ages of 15 to 34 years and potentially curable even when metastasis is extensive. Recently, a concept was introduced that tumoral stem cells defined as cells derived from malignant neoplasias that have the characteristic of promoting total neoplastic regeneration. **Objectives:** To study the immunohistochemical expression of CCND2, DPPA4 and NANOG stem cell markers in primary nonseminomatous germ cell testicular tumors and correlation with the prognosis. **Method:** Data was collected regarding 27 patients diagnosed with nonseminomatous germ cell testicular tumors, who underwent radical orchiectomy followed by retroperitoneal lymphadenectomy, during the years of 1982 to 2007. A non-automated assessment performed of the immunohistochemical expression of CCND2, DPPA4 and NANOG individually in each tumoral component. **Results:** Low expression of the markers was associated with improved survival rates but with no statistical significance. In the presence of an elevated expression of NANOG, the probability of overall survival (OS) in 05 years was 90.5% and if the expression was reduced was 81.8% ($p=0.659$). When the CCND2 expression was elevated, the probability of OS in 05 years was 80.5% and if the expression was reduced, the rate was 100.0% ($p=0.158$). In the case of an elevated expression of DPPA4, the probability of OS in 05 years was 85.9% and when reduced, the rate was 100.0% ($p=0.430$). Reduced CCND2 or DPPA4 expressions revealed a tendency to increase OS since the probability in 05 years for this group was 100.0% and the general OS was 88.4%. The expression of the markers was related to tumoral tissue differentiation. The undifferentiated tissues such as

intratubular neoplasia, seminomatous component and the embryonic carcinoma presented elevated expressions. Specialized tissues such as teratoma and coriocarcinoma present low or absent expression of the studied markers.

Conclusion: The immunohistochemical expression of the markers follows a specific pattern that is related to tumor differentiation. Coriocarcinoma tumors did not express CCND2 and NANOG. The teratoma subtype, mature and immature, did not express NANOG. The expression of the markers did not predict the presence of retroperitoneal lymph node metastasis and had no impact on disease free survival (DFS), cancer specific survival (CSS) and OS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da teoria das células-tronco tumorais germinativas.....	24
Figura 2	Fotomicrografia de NITCG em HE.....	48
Figura 3	Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de CCND2.....	49
Figura 4	Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de DPPA4.....	49
Figura 5	Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de NANOG.....	50
Figura 6	Fotomicrografia de Carcinoma embrionário em HE.....	50
Figura 7	Fotomicrografia de Carcinoma embrionário com expressão elevada de CCND2.....	51
Figura 8	Fotomicrografia de Carcinoma embrionário com expressão elevada de DPPA4.....	51
Figura 9	Fotomicrografia de Carcinoma embrionário com expressão elevada de NANOG.....	52
Figura 10	Fotomicrografia de componente seminomatoso em HE.....	52
Figura 11	Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de CCND2.....	53
Figura 12	Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de DPPA4.....	53

Figura 13	Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de NANOG.....	54
Figura 14	Fotomicrografia de Teratoma maduro em HE.....	54
Figura 15	Fotomicrografia de Teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de CCND2.....	55
Figura 16	Fotomicrografia de Teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de DPPA4.....	55
Figura 17	Fotomicrografia de Teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de NANOG.....	56
Figura 18	Fotomicrografia de Teratoma imaturo em HE.....	56
Figura 19	Fotomicrografia de Teratoma imaturo com expressão nuclear reduzida de CCND2.....	57
Figura 20	Fotomicrografia de Teratoma imaturo com expressão elevada de DPPA4.....	57
Figura 21	Fotomicrografia de Teratoma imaturo com expressão ausente de NANOG.....	58
Figura 22	Fotomicrografia de Tumor de seio endodérmico em HE.....	58
Figura 23	Fotomicrografia de Tumor de seio endodérmico com expressão elevada de CCND2.....	59
Figura 24	Fotomicrografia de Tumor de seio endodérmico com expressão elevada de DPPA4.....	59

Figura 25	Fotomicrografia de Tumor de seio endodérmico com expressão nuclear reduzida de NANOG.....	60
Figura 26	Fotomicrografia de Coriocarcinoma em HE.....	60
Figura 27	Fotomicrografia de Coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de CCND2.....	61
Figura 28	Fotomicrografia de Coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de DPPA4.....	61
Figura 29	Fotomicrografia de Coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de NANOG.....	62
Figura 30	Curva de sobrevida livre de doença nos 27 casos de TCGTNS.....	65
Figura 31	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunoistoquímica elevada de CCND2.....	66
Figura 32	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunoistoquímica de DPPA4.....	67
Figura 33	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunoistoquímica de DPPA4.....	68
Figura 34	Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS.....	69
Figura 35	Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de CCND2.....	70
Figura 36	Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de DPPA4.....	71

Figura 37	Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de NANOG.....	72
Figura 38	Modelo comparativo do desenvolvimento normal e tumoral da célula germinativa.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas nos pacientes submetidos a LNRP primária.....	42
Tabela 2	Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas nos pacientes submetidos à LNRP pós-quimioterapia.....	43
Tabela 3	Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador CCND2.....	45
Tabela 4	Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador DPPA4.....	46
Tabela 5	Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador NANOG.....	47
Tabela 6	A expressão imunoistoquímica dos marcadores de CSC, através da descrição do valor de medianas, nos diferentes componentes tumorais das TCGTNS.....	48
Tabela 7	Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas de acordo com achado anatomopatológico da LNRP primária.....	63
Tabela 8	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas, patológicas e imunoistoquímicas de acordo com achado anatomopatológico da LNRP pós-quimioterapia.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação histológica dos tumores de células germinativas do testículo.....	8
Quadro 2	Classificação clínica de tumores de testículo.....	9
Quadro 3	Classificação patológica de tumores de testículo.....	10
Quadro 4	Estadiamento dos tumores de testículo.....	11
Quadro 5	Classificação prognóstica de TCGTNS.....	20
Quadro 6	Marcadores biomoleculares teciduais em tumores testiculares.....	21
Quadro 7	Marcadores de CSC em tecidos tumorais.....	23
Quadro 8	Lista de anticorpos primários utilizados com respectivos clones, títulos, códigos e nomes de fabricantes.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	Alfa-fetoproteína
AJCC	‘American Joint Committee on Cancer’
β-HCG	Gonadotrofina coriônica humana fração β
CCND2	Ciclina D2
CD 34	“Cluster de diferenciação 34”
CD 38	“Cluster de diferenciação 38”
CSC	‘Cancer stem cells’ (Células-tronco tumorais)
DHL	Desidrogenase láctica
DPPA4	‘Developmental pluripotency associated 4’
EP	Etoposide – Cisplatina
HE	Hematoxilina – Eosina
IGCCCG	‘International Germ Cell Cancer Collaborative Group’
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LNRP	Linfadenectomia retroperitoneal
NITCG	Neoplasia intratubular de células germinativas
OCT4	‘Octamer-binding transcription factor 4’
PEB	Cisplatina – Etoposide – Bleomicina
PLAP	Fosfatase Alcalina Placentária
PET-CT	Tomografia por emissão de pósitrons, associada a tomografia computadorizada
QT	Quimioterapia
RB	Via do Retinoblastoma
RT-PCR	Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
SCE	Sobrevida câncer específica
SEER	‘Surveillance, Epidemiology and End Results’
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TCGT	Tumor de células germinativas do testículo
TCGTS	Tumor de células germinativas do testículo seminoma

TCGTNS	Tumor de células germinativas do testículo não seminoma
UICC	Union for International Cancer Control
TIP	Taxol – Ifosfamida – Cisplatina
VIP	Vinblastina – Ifosfamida – Cisplatina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Razões do Estudo	1
1.	Revisão da Literatura	3
1.2.	Epidemiologia	3
1.2.2	Classificação e Estadiamento.....	7
1.2.3	Tratamento	11
1.3	Fatores Prognósticos	18
1.3.1	Fatores Clínicos e Patológicos	18
1.3.2	Fatores Biomoleculares.....	21
1.4	A Teoria das Células-tronco Tumorais	22
1.5	CICLINA D2.....	25
1.6	DPPA4	26
1.7	NANOG	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Principal	29
2.2	Objetivos Secundários.....	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	30
3.1	População do Estudo.....	30
3.1.1	CrITÉRIOS de Inclusão	30
3.1.2	CrITÉRIOS de Exclusão	30
3.2	Metodologia	31
3.2.1	Diagnóstico e Estadiamento.....	32
3.2.2	Tratamento Cirúrgico	33
3.2.3	Seguimento dos Pacientes	33
3.2.4	Técnica de Imunoistoquímica	34
3.2.5	Avaliação das Reações de Imunoistoquímica	37
3.2.6	Análise Estatística	38

3.2.7	Análise de Riscos e Aspectos Éticos.....	39
3.3	Casuística	40
3.3.1	Aspectos Demográficos e Clínicos	40
3.3.2	Aspectos Anatomopatológicos.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1.1	LNRP Primária.....	42
4.1.2	LNRP Pós-Quimioterapia	43
4.2	Expressão Imunoistoquímica	44
4.2.1	CCND2.....	44
4.2.2	DPPA4	45
4.2.3	NANOG	46
4.2.4	Risco de Metástases em Linfonodos	62
4.3	Análise de Sobrevida	64
4.3.1	Sobrevida Livre de Doença.....	64
4.3.2	CCND2.....	65
4.3.3	DPPA4	66
4.3.4	NANOG	67
4.3.5	Sobrevida Global e Câncer Específica.....	68
4.3.6	CCND2.....	69
4.3.7	DPPA4	70
4.3.8	NANOG	71
5	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Aspectos Gerais.....	73
5.2	Aspectos Histológicos.....	77
5.2.1	NITCG	81
5.2.2	Componente Seminomatoso	81
5.2.3	Carcinoma Embrionário	83
5.2.4	Tumor de Seio Endodérmico, Teratomas e Coriocarcinoma.....	84
5.3	Análise de Risco de Metástase Linfonodal	86
5.4	Análise de Sobrevida	88

5.4.1	Sobrevida Livre de Doença.....	88
5.4.2	Sobrevida Global e Câncer Específica.....	89
6	CONCLUSÕES.....	91
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de levantamento de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAZÕES DO ESTUDO

O câncer de testículo é uma neoplasia que perfaz 1 a 2% de todos tumores malignos que acometem homens norte-americanos. No entanto, é uma doença de extrema importância por ser o tumor maligno mais prevalente entre homens jovens de 15 a 34 anos (BOSL e MOTZER 1997) e ser potencialmente de curável mesmo na vigência de doença metastática extensa.

O tumor de células germinativas do testículo (TCGT) é dividido em dois subgrupos: o grupo de tumores de células germinativas do testículo seminoma (TCGTS), que corresponde a 60% dos casos e o doravante denominado tumor de células germinativas do testículo não seminomatoso (TCGTNS) que será objeto de nosso estudo. Neoplasias testiculares não germinativas, extremamente raras, não foram avaliadas.

O TCGTNS apresenta um padrão de disseminação previsível, acomete a princípio os linfonodos retroperitoneais, seguido pelos linfonodos mediastinais, supraclaviculares e cervicais. Metástases hematogênicas com foco principal no pulmão (STEPHENSON E KLEIN 2009), são mais comuns na doença tardia, mas podem ocorrer sincronicamente.

O padrão de disseminação contribui para o manejo cirúrgico do TCGTNS. A linfadenectomia retroperitoneal (LNRP) está indicada em duas situações clínicas nos pacientes com TCGTNS: no estágio clínico I de alto risco para recidiva ou

progressão retroperitoneal e nos estádios clínicos II e III com tumor retroperitoneal residual após realização de quimioterapia adjuvante. Na primeira situação, estágio clínico I de alto risco, a chance do paciente apresentar metástases retroperitoneais “ocultas” é de 26 a 30% (PREINER e JEWETT 1999). Quando optado pela linfadenectomia retroperitoneal se obteve estadiamento adequado e alta taxa de cura às custas da exposição desnecessária de cerca de 70% dos pacientes à morbidade de uma cirurgia abdominal de grande porte. Na segunda situação, a de estágio clínico avançado, a LNRP está indicada pela presença de tumor retroperitoneal viável residual após quimioterapia adjuvante em 10 a 20 % dos casos e pela persistência de teratoma em 40% dos indivíduos (PREINER e JEWETT 1999). Em 40% destes encontra-se apenas necrose ou fibrose submetendo-os a exposição desnecessária da linfadenectomia retroperitoneal.

Fatores prognósticos clínicos e patológicos com elevada acurácia e para determinação dos achados anatomopatológicos retroperitoneais são escassos. Além de informações a respeito do tamanho tumoral histologia e ocorrência de infiltração linfovascular, poucos estudos avaliam a expressão de marcadores biomoleculares nos tumores testiculares primários.

Os autores tem objetivo de avaliar a expressão imunoistoquímica e o valor prognóstico de marcadores de células-tronco tumorais em pacientes portadores TCGTNS buscando encontrar um marcador prognóstico com potencial impacto na terapêutica.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Epidemiologia

Nos últimos quarenta anos, houve um aumento da incidência de câncer testicular em países ocidentais. A maior incidência de câncer de testículo está entre homens nórdicos, enquanto a menor incidência está em homens de países do Oriente médio e da Ásia (PARKIN 2005; CURADO 2007).

A faixa etária acometida por neoplasia do tipo seminoma está entre os 30 a 40 anos de idade, já os tumores do tipo não seminoma atingem principalmente homens dos vinte aos trinta anos (STONE et al. 1992).

O câncer de testículo constitui 1 a 2% de todos tumores malignos. A sua importância está no fato de que é o tumor maligno mais prevalente entre homens, de 15 a 34 anos, jovens em idade produtiva da vida sob aspectos profissional, sexual, afetiva, entre outros. (BOSL e MOTZER 1997).

No sentido contrário a tendência de aumento da incidência do TCGT, a taxa de mortalidade tem apresentado declínio (BRAY et al. 2006), fato atribuído ao advento dos protocolos de quimioterapia (QT) baseada em platina.

Até o presente momento, não existem estudos nacionais sobre a incidência de neoplasia maligna dos testículos. O Instituto Nacional do Câncer – INCA, publicou o registro de 257 mortes no ano de 2007 e uma estimativa de 11.593 novos casos em 2009.

A associação entre alguns fatores de risco, como a criptorquidia, antecedentes pessoais ou familiares de TCGT e a incidência de neoplasia de células germinativas do testículo está amplamente descrita na literatura (CHILVERS et al. 1986;

GIWERCMAN et al. 1987; BENSON et al. 1991; PINCZOWSKI et al. 1991; BOYLE e ZARIDZE 1993; SWERDLOW et al. 1997; MOLLER et al. 1998; HERRINTON et al. 2003; MANECKSHA e FITZPATRICK 2009).

A criptorquidia é um importante fator de risco para TCGT. A literatura mostra risco de cerca de 4 a 8 vezes maior que a população geral (CHILVERS et al. 1986; GIWERCMAN et al. 1987; SWERDLOW et al. 1997; MOLLER et al. 1998). O mecanismo pelo qual a criptorquidia colabora para o desenvolvimento de neoplasia germinativa não é claro. Existem duas teorias: de que tanto a criptorquidia quanto o câncer de testículo teriam uma causa comum e outra teoria de que a ectopia testicular submete o testículo a fatores ambientais que favorecem o desenvolvimento de TCGT.

Meta-análise recente demonstrou um risco 6 vezes maior de desenvolvimento de TCGT em pacientes que a orquidopexia foi realizada somente após os treze anos de idade quando comparados aos que foram operados em fase pré-púbere (WALSH et al. 2007) corroborando a teoria de que a ectopia testicular e os fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento de câncer testicular.

No contexto do paciente criptorquídeo, ambas as teorias são válidas e a ação combinada das mesmas é plausível. Propõe-se que de maneira similar a teoria de Knudson onde a presença de dois eventos seriam necessários para dar início a carcinogênese, a associação entre a anomalia do desenvolvimento testicular e a exposição a fatores ambientais desfavoráveis pode coexistir (KNUDSON 1996; MANECKSHA e FITZPATRICK 2009).

A história prévia de câncer testicular também é um importante fator de risco para o desenvolvimento, metacrônico contralateral, de neoplasia testicular. O risco

para o desenvolvimento de TCGT na presença de histórico de câncer testicular varia entre 12 a 27 vezes o risco da população geral segundo estudos na população da Dinamarca, Nova Zelândia, França e Estados Unidos da América (OSTERLIND et al. 1991; COLLS et al. 1996; THEODORE et al. 2004; FOSSA et al. 2005). FOSSA et al. (2005) avaliaram 29515 homens, entre os anos de 1973 a 2001, destes um total de 462 pacientes apresentaram TCGT bilateral, sendo em 175 pacientes um tumor de apresentação sincrônica e em 287 de apresentação metacrônica (FOSSA et al. 2005).

O histórico familiar de câncer testicular é um fator de risco para TCGT. Estudos baseados em bases de dados internacionais demonstraram um aumento no risco em quatro vezes para filhos de pacientes com câncer testicular e de oito vezes para irmãos de pacientes com câncer testicular (WESTERGAARD et al. 1996; SONNEVELD et al. 1999; HEMMINKI e CHEN 2006). Estudos de migração entre populações de países nórdicos, especialmente Finlândia, Suécia e Dinamarca onde a incidência de câncer testicular nesses países é baixa, média e alta respectivamente demonstraram a provável influência de genes relacionados ao câncer e pouca interferência dos fatores ambientais. Homens finlandeses que migraram para a Suécia mantiveram uma baixa incidência de TCGT e homens suecos que migraram para Finlândia continuaram com alta incidência de câncer testicular (HEMMINKI e LI 2002; EKBOM et al. 2003).

RAPLEY et al. em 2000, publicaram o achado de um gene relacionado ao câncer testicular, o TGCT1, locado no braço longo do cromossomo X (Xq27) (RAPLEY et al. 2000). Acredita-se que existam vários loci que contribuem para susceptibilidade ao câncer de testículo e que nenhum gene explica isoladamente o risco familiar (RAPLEY et al. 2003).

Os TCGT apresentam uma grande plasticidade genômica comparável a outros tumores de órgãos sólidos. A lesão característica é a presença de cópias do braço curto do cromossomo 12, devido ao aparecimento de um isocromossomo, i(12p), descrita inicialmente em 1982 por ATKIN e BAKER. A presença desta alteração cromossômica está presente em cerca de 80% dos casos de neoplasia de células germinativas, sendo utilizada como marcador diagnóstico em tumores pouco diferenciados com sítio primário desconhecido (ATKIN e BAKER 1982; MOTZER et al. 1995).

Ao câncer de testículo associa-se também a disgenesia gonadal e a infertilidade masculina. Diversos estudos demonstraram a relação entre a infertilidade ou subfertilidade masculina e os TCGT em homens de países ocidentais (CARLSEN et al. 1992). Há relato de incremento de 20 vezes no risco para câncer testicular em homens inférteis com análise seminal anormal quando comparados a população geral (RAMAN et al. 2005). Os mecanismos envolvidos nesta associação ainda não estão devidamente esclarecidos. Acredita-se que a exposição intrauterina aumentada a estrógenos afetaria o desenvolvimento adequado das gônadas determinando maior incidência de neoplasia testicular, criptorquidia e hipospádia (SHARPE 2003). A relação entre a teoria da exposição estrogênica e a síndrome da disgenesia testicular parece ser consistente, no entanto há necessidade de estudos epidemiológicos para confirmar esta hipótese (MARTIN et al. 2008).

A microlitíase testicular foi amplamente estudada no contexto da neoplasia de células germinativas do testículo. A microlitíase testicular é caracterizada pela presença de imagem de microcalcificações decorrentes de precipitados protéicos no interior dos túbulos seminíferos. Sua etiologia é desconhecida e sua relevância

clínica é controversa. Estudos com homens assintomáticos e sem outros fatores de risco para câncer testicular relataram alta prevalência de microlitíase, porém sem associação com a presença ou desenvolvimento de TCGT (PETERSON et al. 2001; DECASTRO et al. 2008). Metanálise recente concluiu que na presença de fatores de risco para TCGT (infertilidade, criptorquidia, atrofia testicular e TCGT contralateral), o achado de microlitíase testicular apresenta risco elevado para diagnóstico concomitante de TCGT e neoplasia intratubular de células germinativas (NITCG) (TAN et al. 2010).

Diversos fatores, como a vasectomia, o trauma escrotal, a hérnia inguinal, o tabagismo materno durante a gestação e os hábitos alimentares, foram inicialmente relacionados ao câncer testicular mas após investigação adequada foram descartados ou não apresentam evidencia suficiente que os suporte (MOLLER et al. 1994; MERZENICH et al. 2000; GANMAA et al. 2002; GARNER et al. 2003; DIECKMANN e PICHLMEIER 2004; MANECKSHA e FITZPATRICK 2009; TUOMISTO et al. 2009).

1.2.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTADIAMENTO

O testículo apesar de seu tamanho pequeno apresenta uma miríade de neoplasias. Cerca de 95% desses tumores, são neoplasias de células germinativas. Tumores não germinativos derivados de células estromais, compõe a minoria dos casos. Os tipos histológicos de neoplasias germinativas do testículo de acordo com a classificação proposta pela OMS são representadas no Quadro 1 (EBLE 2004).

Quadro 1 - Classificação histológica dos tumores de células germinativas do testículo.

Tumores de células germinativas
Neoplasia de células germinativas intratubular
Tumores Puros
Seminoma
Seminoma com células do sinciciotrofoblasto
Seminoma espermatocítico
Carcinoma embrionário
Tumor do seio endodérmico (Saco vitelino)
Coriocarcinoma
Neoplasias trofoblásticas não coriocarcinoma
Teratoma
Cisto dermóide
Teratoma monodérmico
Teratoma com componente maligno
Tumores mistos
Teratoma / Carcinoma embrionário
Teratoma / Seminoma
Coriocarcinoma e Teratoma / Carcinoma embrionário
Outros

O estadiamento clínico e patológico de uma neoplasia consiste em avaliar a extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância. Representa um tempo fundamental para o prognóstico e definição da terapêutica a ser instituída. O estadiamento mais utilizado, descrito nos Quadros 2-4, foi atualizado em 2010 pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) e pela Union for International Cancer Control (UICC).

Quadro 2 - Classificação clínica de tumores de testículo, AJCC / UICC, 2010.

TNM - Classificação Clínica	
T – Tumor primário	
Exceto para pTis e pT4, onde a orquiectomia radical nem sempre é necessária para a classificação, a extensão do tumor primário é classificada após a orquiectomia radical.	
N – Linfonodos regionais	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em massa linfonodal com 2 cm ou menos em sua maior dimensão, ou linfonodos múltiplos, nenhum com mais de 2 cm em sua maior dimensão.
N2	Metástase em massa linfonodal com mais de 2 cm até 5 cm em sua maior dimensão, ou linfonodos múltiplos, qualquer um com massa maior de 2 cm até 5 cm em sua maior dimensão.
N3	Metástase em uma massa linfonodal com mais de 5cm em sua maior dimensão
M – Metástase à distância	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1a	Metástase em linfonodo não regional ou metástase pulmonar
M1b	Metástase à distância para outras localizações

Quadro 3 - Classificação patológica de tumores de testículo, AJCC / UICC, 2010.

TNM – Classificação Patológica	
pT – Tumor primário	
pTx	O tumor primário não pode ser avaliado
pT0	Não há evidência de tumor primário
pTis	Neoplasia intratubular de células germinativas (carcinoma in situ)
pT1	Tumor limitado ao testículo e epidídimo sem invasão vascular/linfática; o tumor pode invadir a túnica albugínea, mas não a túnica vaginalis
pT2	Tumor limitado ao testículo e epidídimo com invasão vascular/linfática, ou tumor que se estende através da túnica albugínea com envolvimento da túnica vaginalis
pT3	Tumor que invade o cordão espermático com ou sem invasão vascular e/ou linfática
pT4	Tumor que invade o escroto com ou sem invasão vascular/linfática
pN – Linfonodos regionais	
pNx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Ausência de metástase em linfonodo regional
pN1	Metástase em massa de linfonodos com 2 cm ou menos em sua maior dimensão e 5 ou menos linfonodos positivos, nenhum com mais de 2 cm em sua maior dimensão
pN2	Metástase em massa de linfonodos com 2 cm ou mais, até 5 cm em sua maior dimensão; ou mais de 5 linfonodos positivos, nenhum com mais de 5 cm; ou evidência de extensão tumoral extranodal
pN3	Metástase em massa de linfonodos com mais de 5cm em sua maior dimensão
pM – Metástase à distância	
pMx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
pM0	Ausência de metástase à distância
pM1a	Metástase em linfonodo não regional ou metástase pulmonar
pM1b	Metástase à distância para outras localizações
S – Marcadores tumorais	
Sx	Os marcadores tumorais não estão disponíveis ou não foram realizados
S0	Marcadores tumorais séricos dentro dos limites normais
S1	DHL < 1,5 x VR, HCG < 5.000 mUI/ml e AFP < 1.000 ng/ml
S2	DHL 1,5 - 10 x VR, HCG 5.000 - 50.000 mUI/ml ou AFP 1.000 - 10.000 ng/ml
S3	DHL > 10 x VR , HCG > 50.000 mUI/ml ou AFP > 10.000 ng/ml

Quadro 4 - Estadiamento dos tumores de testículo, AJCC / UICC , 2010.

Grupamento por estádios	
ESTÁDIO 0	pTis N0 M0 S0, SX
ESTÁDIO I	pT1-4 N0 M0 SX
ESTÁDIO IA	pT1 N0 M0 S0
ESTÁDIO IB	pT2-4 N0 M0 S0
ESTÁDIO IS	Qualquer pT/TX N0 M0 S1-3
ESTÁDIO II	Qualquer pT/TX N1-3 M0 SX
ESTÁDIO IIA	Qualquer pT/TX N1 M0 S0-1
ESTÁDIO IIB	Qualquer pT/TX N2 M0 S0-1
ESTÁDIO IIC	Qualquer pT/TX N3 M0 S0-1
ESTÁDIO III	Qualquer pT/TX Qualquer N M1 SX
ESTÁDIO IIIA	Qualquer pT/TX Qualquer N M1a S0-1
ESTÁDIO IIIB	Qualquer pT N1-3 M0 S2
	Qualquer pT Qualquer N M1a S2
ESTÁDIO IIIC	Qualquer pT N1-3 M0 S3
	Qualquer pT Qualquer N M1a S3
	Qualquer pT Qualquer N M1b Qualquer S

1.2.3 Tratamento

O tratamento dos TCGT é baseado, entre outros fatores, no tipo histológico, estadiamento e capacidade do paciente de aderir ao tratamento. A abordagem terapêutica inicial é a orquiectomia radical, que é constituída pela extirpação por via inguinal do testículo, do epidídimo e do cordão inguinal envoltos pela túnica vaginal.

A dissertação aborda, exclusivamente, o tratamento de tumores de células germinativas do testículo do tipo não seminomatoso. O tratamento dos TCGTNS divide-se entre os tumores de estágio I e os tumores nos demais estádios.

O tratamento dos tumores de estágio I após a orquiectomia radical é composto de três alternativas : a linfadenectomia retroperitoneal, a quimioterapia adjuvante ou vigilância clínica ativa (ALBERS et al. 2005).

Estádio I

Quando optado pela LNRP, de 26 a 30% dos pacientes apresentam metástases linfonodais ocultas que determinam o subestadiamento clínico (WARSZAWSKI e SCHMUCKING 1997; HENDRY et al. 2000; SPERMON et al. 2002).

Quando se encontram até seis linfonodos comprometidos, com menos de 2,0 cm cada e sem a ocorrência de extravasamento linfonodal, cerca de 70%(DONOHUE et al. 1995) a 90% (STEPHENSON e SHEINFELD 2004) são curados com a LNRP como monoterapia. Aqueles que progridem podem ser resgatados com quimioterapia, preservando taxas de sobrevida próximas a 100%.

Ademais, após a realização de uma LNRP adequada, a ocorrência de recidiva no retroperitônio é menor que 2% (RICHIE e KANTOFF 1991; DONOHUE et al. 1995; FOSTER e ROTH 1998). O que reduz a necessidade da realização de exames de imagem abdominal no seguimento terapêutico, como tomografias, reduzindo a exposição a irradiação.

O risco de recidiva nesse grupo de pacientes está diretamente relacionado ao volume de doença retroperitoneal ressecada (PIZZOCARO e MONFARDINI 1984; DONOHUE et al. 1995). Os pacientes com estágio clínico I e estágio patológico II após a LNRP, apresentam cerca de 10 a 30% de recidiva, em sítios fora da região abdominal e pélvica. A realização de pelo menos dois ciclos de QT baseada em platina, após a LNRP, pode reduzir a ocorrência de recidivas, porém pode ser desnecessário para alguns indivíduos que seriam curados apenas com cirurgia (WILLIAMS et al. 1987; KLEPP et al. 1990; FOSTER e ROTH 1998).

Críticas a realização da LNRP são a respeito da morbidade do ato cirurgia, e da ocorrência de ejaculação seca ou retrógrada, e fenômenos vasomotores de membros inferiores, devido a lesões neurológicas simpáticas. Hoje com modernas técnicas de preservação do sistema nervoso autônomo simpático retroperitoneal, sem a dissecação acima dos hilos renais e com preservação do plexo pélvico e hipogástrico ao nível da emergência da a. mesentérica inferior, em mais de 90% das vezes a ejaculação anterógrada é preservada (BECK et al. 2010).

A linfadenectomia retroperitoneal laparoscópica surge como uma alternativa ao estadiamento por cirurgia aberta, no entanto ainda não pode ser recomendado como o acesso padrão, uma vez que se trata de procedimento de alta complexidade, na qual a maioria das séries iniciais empregou QT adjuvante em todos os casos de linfonodos positivos, não sendo possível comprovar sua real eficácia, outra crítica é que nesses estudos não se acessou áreas de dificuldade técnica, como a região retroaortica e retrocaval, por exemplo, permanecendo investigacional (BIANCHI et al. 1998; LEBLANC et al. 2001). Recentes estudos tem mostrado um número maior de linfonodos removidos, menos conversões a cirurgia aberta e menor emprego da QT para pacientes com linfonodos positivos (NIELSEN et al. 2007).

A vigilância após a realização de LNRP quando comparada a vigilância primária é mais simples e econômica (FOSTER e ROTH 1998). Entretanto, estudo de modelo comparativo de custos gerais entre a LNRP, a QT adjuvante e a vigilância primária foi favorável a vigilância primária ou QT como alternativas menos custosas (LINK et al. 2005). No Brasil avaliações destes custos inexistem.

A vigilância primária é definida pelo seguimento ativo de pacientes em pós-operatório de orquiectomia radical. Os avanços do exames de imagem e a

possibilidade de realização de quimioterapia de resgate efetiva e linfadenectomia após a quimioterapia quando necessário permitem a realização da vigilância com segurança em pacientes com TCGTNS de estágio I.

Quando optado pela vigilância primária em pacientes com TCGTNS estágio I sem estratificação de risco, a taxa de recidiva é cerca de 30%. Aproximadamente 80% das recidivas ocorrem dentro do primeiro ano de pós-operatório, 12% durante o segundo ano, 6% durante o terceiro ano de seguimento e somente 2 % das recidivas ocorrem após este período (FREEDMAN et al. 1987; READ et al. 1992; COLLS et al. 1999; OLIVER et al. 2004). Importante salientar que cerca de 11% dos pacientes podem evoluir com recidiva volumosa da neoplasia apesar do seguimento ativo intenso (SOGANI et al. 1998). As taxas de sobrevida câncer específica (SCE) variam na literatura entre 95-100%, em pacientes acompanhados por período de 30 a 136 meses na média. O regime de vigilância ativa primária pode ser oferecido a pacientes com TCGTNS estágio I sem estratificação de risco desde que o paciente compreenda os riscos e seja capaz de aderir ao programa. Atualmente há a tendência reduzir exames de imagem para diminuir os riscos oncológicos da radiação ionizante a longo prazo, sem comprometimento das taxas de controle da neoplasia (RUSTIN et al. 2007).

A QT com dois ciclos de Cisplatina, Etoposide e Bleomicina (PEB) é uma alternativa terapêutica principalmente para pacientes com fatores de risco. A utilização de QT como primeira escolha para pacientes com TCGTNS estágio I de alto risco reduz em cerca de 90% a taxa de recidiva quando comparada a vigilância (STUDER et al. 1993; CULLEN et al. 1996; PONT et al. 1996; BOHLEN et al. 1999; CHEVREAU et al. 2004; OLIVER et al. 2004; TANDSTAD et al. 2010). Na

tentativa de diminuir toxicidade da exposição a QT baseada em platina, instituições estudaram a possibilidade de realização de ciclo único com resultados conflitantes na literatura, sendo necessário maior investigação (STUDER et al. 1993; ALBERS et al. 2008; WESTERMANN et al. 2008; TANDSTAD et al. 2010).

Estádios II-III

O tratamento dos TCGTNS metastáticos é dividido em doença metastática de baixo volume (II A-B) e doença metastática avançada (IIC/ III A-C). O tratamento dos TCGTNS metastáticos tem como escolha inicial a quimioterapia com três ciclos de PEB ou quatro ciclos de Etoposide e Cisplatina (EP). Nos pacientes com tumor de estágio IIA S0 e eventualmente IIB até 3,0 cm podem ser tratados, alternativamente, com a LNRP com preservação de nervos (WEISSBACH et al. 2000). Nesta situação as duas alternativas terapêuticas oferecem uma taxa de cura próxima de 98% (LOGOTHETIS et al. 1987; STERNBERG 1993; HORWICH et al. 1994; DONOHUE et al. 1995; MOTZER et al. 1995).

Os pacientes com tumores metastáticos são estratificados em bom prognóstico, prognóstico intermediário e mau prognóstico por critérios da *International Germ Cell Cancer Collaborative Group-IGCCCG*, como demonstrado no Quadro 5 (Anonymous 1997).

O tratamento dos tumores de bom prognóstico são submetidos a QT com três ciclos PEB ou quatro ciclos de EP, quando houver contra-indicação para o uso de Bleomicina, apresentando cerca de 96% de sobrevida global (CULINE et al. 2007).

Nos tumores de intermediário ou mau prognóstico o tratamento inicial são quatro ciclos de PEB. Nos pacientes com tumores de prognóstico intermediário a

sobrevida em cinco anos de acompanhamento é de cerca de 80% (DE WIT et al. 1998). Já nos pacientes com tumores de mau prognóstico, a taxa de sobrevida livre de progressão em cinco anos é de 45-50% (MOTZER et al. 2007).

No contexto de doença residual retroperitoneal associada a marcadores séricos normais está indicada a LNRP com preservação de nervos quando possível (STENNING et al. 1998; KUCZYK et al. 1999). Nesta situação somente em 7 a 20% dos casos encontramos tumor viável, em 40% encontramos teratomas e 40% apresentam tecido necrótico ou fibrose (FOSSA et al. 1989; TONER et al. 1990; STENNING et al. 1998).

Nos casos de TCGTNS viável em retroperitônio ou teratoma, a LNRP tem valor terapêutico, sendo plenamente justificável, a despeito de seu grande porte. A remoção cirúrgica do teratoma é mister, uma vez que se trata de lesão sabidamente quimio-resistente e radio-resistente que pode proliferar e passar a invadir estruturas adjacentes ou até mesmo tornar-se irressecável; além disso, pode sofrer transformação maligna para carcinomas ou sarcomas, de péssimo prognóstico. A remoção de tumor viável, por sua vez, pode propiciar a cura ou indicar a necessidade de esquemas de QT adicionais.

Porém naqueles 30 a 40%, portadores de fibrose, a cirurgia constitui apenas um procedimento diagnóstico, sem efeito terapêutico; situação na qual seria muito interessante termos fatores preditivos pré-tratamento que permitissem poupar os pacientes da morbidade de cirurgia dessa monta.

Atualmente não dispomos de exame de imagem, incluindo a tomografia por emissão de pósitrons associada a tomografia computadorizada (PET-CT), ou de modelos prognósticos que possam prever o tipo histológico das massas residuais

pós-quimioterapia em TCGTNS, sendo ainda fundamental a realização da LNRP. Mesmo em tomografias com linfonodos retroperitoneais menores que 1,5cm são encontrados teratoma ou neoplasia viável a LNRP.(FOSSA et al. 1989)

Recente estudo de THOMPSON et al. (2011) demonstrou que a remoção de um maior número de linfonodos retroperitoneais, está associada a maiores índices de controle de doença, tanto nos estádios I, como nos estádios II e III.

Pacientes com progressão da doença e elevação de marcadores séricos tumorais devem ser submetidos a terapia sistêmica de resgate com ciclos de Taxol, Ifosfamida e Cisplatina (TIP) ou Vinblastina, Ifosfamida e Cisplatina (VIP), a realização de esquemas com mais de três agentes em dose convencional ou quimioterapia de alta dose, ainda é controversa (KAYE et al. 1998; PICO et al. 2005).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS

A despeito das vantagens da realização da LNRP, ainda assim há um considerável contingente de pacientes do estágio I que são operados de modo desnecessário por não apresentarem metástases linfonodais, bem como cerca de 40% dos indivíduos, que após QT apresentam apenas necrose ou fibrose retroperitoneal. Seria interessante dispormos de ferramentas prognósticas adequadas que pudessem selecionar, com precisão, os pacientes que pudessem ser poupados da LNRP, em ambas as situações.

Devido a baixa acurácia dos métodos disponíveis para estadiamento clínico dos TCGTNS, a pesquisa focando a descoberta de fatores prognósticos é de grande valia para definição de conduta na prática clínica. Nas duas décadas passadas pesquisadores estudaram o valor prognóstico de diversos fatores nos TCGTNS de estágio I e nos estádios avançados.

1.3.1 Fatores Clínicos e Patológicos

Podemos dividir os fatores prognósticos em clínicos e patológicos. Os fatores clínicos são relacionados ao paciente, compostos pelo estágio clínico, seus sinais e sintomas, performance e parâmetros laboratoriais da desidrogenase láctica (DHL), da gonadotrofina coriônica humana (β -HCG) e da alfa-feto proteína (AFP). Os fatores patológicos são inerentes ao próprio tumor, como estágio patológico, tamanho, grau de diferenciação, invasão vascular e linfática, tipo histológico e demais achados anatomopatológicos.

Vários sistemas foram propostos para estratificação de pacientes com TCGT de

acordo com prognóstico, entre eles o Indiana University Staging System (BIRCH et al. 1986); a classificação modificada de Samuel (M.D. Anderson Cancer Center) (LOGOTHETIS et al. 1986); o modelo matemático do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (BOSL et al. 1983) e o *Tumour-Node-Metastasis* (TNM) (EDGE 2010). Os fatores clínicos de maior relevância estão agrupados na estratificação pelo TNM (UICC/AJCC), sistema desenvolvido entre 1943 e 1952 pelo Prof. Pierre Denoix no *Institute Gustave-Roussyem*, o TNM é o sistema prognóstico mais amplamente utilizado no estadiamento de neoplasias malignas. Os parâmetros avaliados no TNM, o grau de invasão do tumor primário, o volume de doença neoplásica linfonodal, a presença de metástase, presença de metástase em sítio extra-pulmonar e a dosagem de marcadores tumorais. O TNM para TCGT se encontra atualmente na sua sétima edição, atualizado em 2010, é o sistema prognóstico mais estudado e submetido a frequentes revisões pela própria AJCC / UICC, constituindo ferramenta importante na estratificação de pacientes portadores de TCGT.

Os tumores metastáticos possuem um classificação prognóstica específica, proposta em 1997 pela *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (ANONYMOUS 1997) com intuito, de além de prever a evolução dos pacientes, permitir a comparação entre resultados de grupos diferentes, demonstrada no Quadro 5.

Estudos recentes baseados em dados da *Surveillance, Epidemiology and End Results* – SEER, descrevem como fatores clínicos que isoladamente estão associados a pior prognóstico: o diagnóstico após os 40 anos, os pacientes não caucasianos, os pacientes de classe sócio econômica inferior e os pacientes solteiros (ABERN et al. 2010; FOSSA et al. 2011).

Quadro 5 - Classificação prognóstica de TCGTNS.

International Germ Cell Cancer Colaborative Group			
PROGNÓSTICO	PACIENTES (%)	SOBREVIDA EM 5 ANOS (%)	CRITÉRIOS
Bom	56	90	AFP < 1000 ng/ml β-HCG < 5000 mUI/ml DHL < 1,5 X Normal Metástase não-pulmonar ausente
Intermediário	28	80	AFP 1000-10000 ng/ml β-HCG 5000-50000 mUI/ml DHL 1,5-10 X Normal Metástase não-pulmonar ausente.
Mau	16	50	AFP > 10000 ng/ml β-HCG > 50000 mUI/ml DHL > 10 X Normal Metástase visceral não-pulmonar (fígado, cérebro, ossos, intestino)

Fonte: ANONYMOUS (1997)

Os fatores prognósticos patológicos relevantes para pacientes com TCGTNS de estágio I são a invasão vascular e linfática peri-tumoral, a taxa de proliferação celular maior que 70%, aferida com MIB-1, o volume de carcinoma embrionários entre os componentes tumorais (usualmente mais que 50%) e ausência de tumor de seio endodérmico (FREEDMAN et al. 1987; ALBERS et al. 1995; ALBERS et al. 1997). READ et al., em 1992, validaram em estudo multicêntrico com 373 pacientes, o sistema de estratificação de risco proposto em 1987 por FREEDMAN et al.. Este sistema valoriza 4 fatores preditores de recidiva: invasão linfática, invasão vascular, presença de carcinoma embrionário e ausência de tumor do seio endodérmico. Estudos com marcadores imunoistoquímicos obtiveram valor prognóstico somente com dois marcadores, o p53 e o MIB-1. A presença de reatividade imunoistoquímica

com ‘cutt-off’ de 10% e 30%, respectivamente, para o p53 e o MIB-1, que predizem a progressão da doença com 50 a 60% de sensibilidade e 75 a 85% de especificidade (ALBERS et al. 1995; ALBERS et al. 1996; ALBERS et al. 1997; PECTASIDES et al. 2009).

1.3.2 Fatores Biomoleculares

Fatores histopatológicos e clínicos, participam da elaboração de modelos prognósticos e apresentam importante impacto na evolução de pacientes portadores de TCGTNS. Necessitamos, entretanto, de marcadores biomoleculares capazes de prever o comportamento dos tumores, apresentando impacto no risco de recidiva e progressão tumoral. Atualmente, vários marcadores teciduais tem sido associados aos TCGT (**Quadro 6**).

Quadro 6 - Marcadores biomoleculares teciduais em tumores testiculares.

Marcadores teciduais para o manejo de tumores testiculares		
Marcador	Uso	Referência
PLAP	NITCG	(MOSTOFI et al. 1987)
c-KIT	Seminoma, NITCG	(RAJPERT-DE MEYTS E SKAKKEBAEK 1994)
CD30	Carcinoma embrionário	(JONES et al. 2004) (CHENG 2004)
AFP	Carcinoma embrionário, Seio endodérmico	(MOSTOFI et al. 1987)
hCG	Seminoma, Coriocarcinoma	(MOSTOFI et al. 1987)
OCT 4	Estratificação de risco Carcinoma embrionário, Seminoma e NITCG	(LOOIJENGA et al. 2003) (CHENG 2004) (HONECKER et al. 2004) (JONES et al. 2004) (RAJPERT-DE MEYTS et al. 2004) (DE JONG et al. 2005)
NANOG	Carcinoma embrionário, Seminoma, NITCG	(HART et al. 2005) (HOEI-HANSEN et al. 2005) (GASHAW et al. 2007)
DPPA4	Seminoma	(JURIC et al. 2005)
CCND2	Carcinoma embrionário, Seminoma, NITCG	(HOULDSWORTH et al. 1997) (BARTKOVA et al. 1999) (SKOTHEIM et al. 2002) (SKOTHEIM et al. 2003)
SOX17	Seminoma, NITCG	(DE JONG et al. 2008)
SALL4	Carcinoma embrionário, Seminoma, NITCG	(CAO et al. 2009)

1.4 A TEORIA DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

As células-tronco são foco de pesquisa em várias áreas médicas. Tratam-se de células totipotentes e dotadas de grande potencial clonogênico, envolvidas na diferenciação e renovação celular de diversos tecidos. São descritas três tipos de células tronco: embrionária, germinativa e somática.

A célula-tronco embrionária é originada, do epiblasto, durante o período que se limita a sexta divisão do óvulo fecundado. Dela derivam todos os tecidos e órgãos do organismo humano. Já a célula-tronco germinativa é aquela responsável pela produção de óvulos e espermatozóides nas gônadas feminina e masculina, respectivamente. Por fim, existem as células-tronco somáticas, cujo potencial de proliferação e diferenciação é limitado em comparação às anteriores e estão envolvidas na produção de células maduras responsáveis pela renovação tecidual (BONNET e DICK 1997; CLARK 2007; LOBO et al. 2007; WU 2008).

Recentemente, foi introduzido o conceito de células-tronco tumorais ou “cancer stem cells (CSC)”. BONNET e DICK em 1997, isolaram células-tronco hematopoiéticas primitivas em pacientes portadores de leucemia mieloide aguda. Empregando técnica de imunofluorescência para marcação de proteínas de membrana celular, foram identificadas células capazes de promover a leucemia quando transplantadas para camundongos imunodeficientes. Essas células tinham como característica a expressão de proteína do grupamento de diferenciação 34 (CD34) e a ausência de expressão de proteína do grupamento de diferenciação 38 (CD38). A presença de um grupo específico de células tumorais capaz de replicar tumores in vitro com extrema facilidade, enquanto que as demais células não o

faziam foi comprovada (BONNET e DICK 1997).

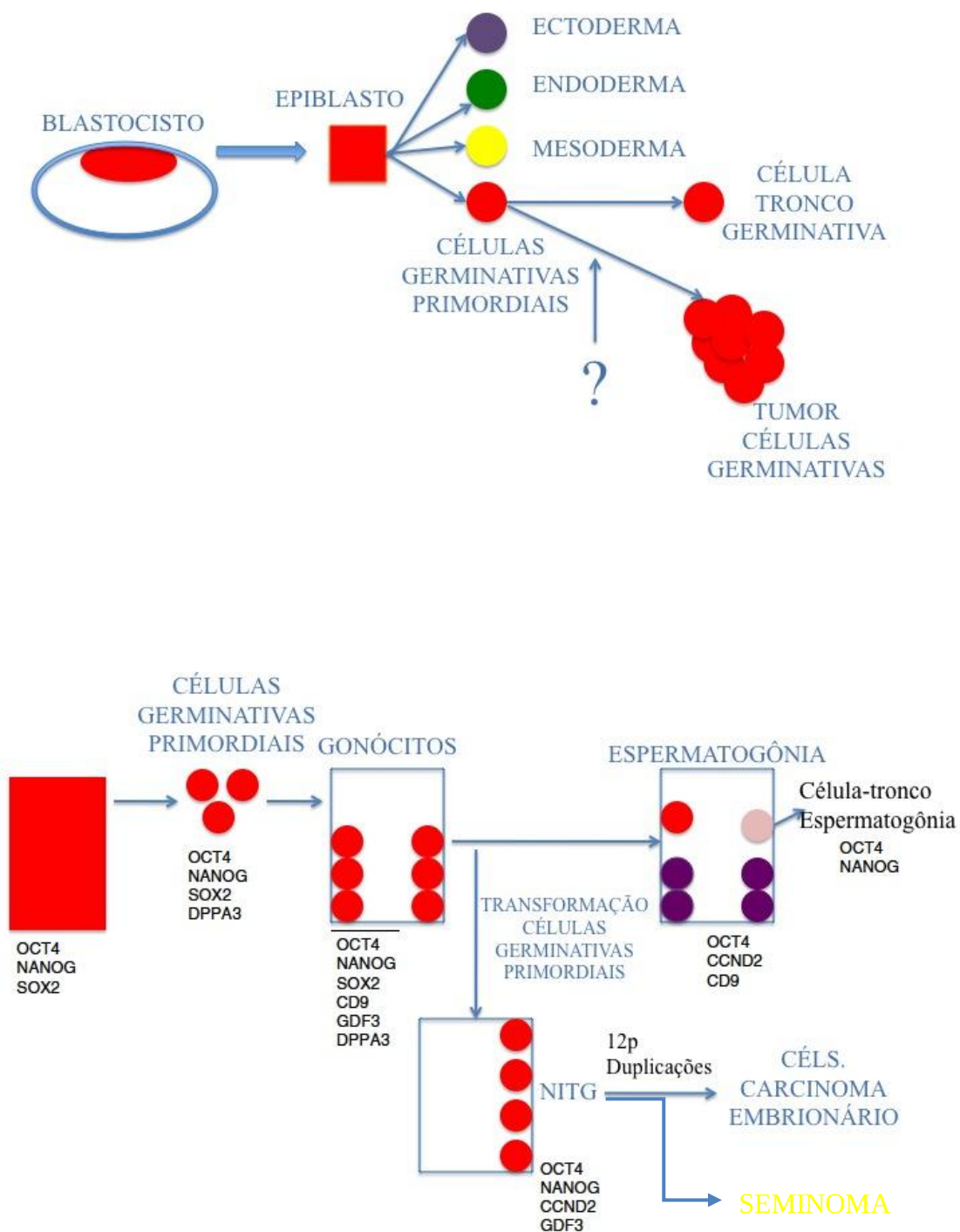
Experimentalmente, CSC são definidas como células derivadas de neoplasias, que apresentam a característica exclusiva de promover a regeneração integral do tumor quanto a sua complexidade e heterogeneidade (SELL 2004; CLARK 2007; LOBO et al. 2007). Seguindo essa definição, foram identificados diversos marcadores moleculares associados a uma série de neoplasias como melanoma e tumores de próstata, pâncreas, fígado, colorretais e testiculares (Quadro 7). (REYNOLDS e WEISS 1996; BONNET e DICK 1997; AL-HAJJ et al. 2003; SINGH et al. 2003; HOPE et al. 2004; FANG et al. 2005; DALERBA et al. 2007; LI et al. 2007; PRINCE et al. 2007; GHAFARZADEHGAN et al. 2008; ZHANG et al. 2008).

Quadro 7 - Marcadores de CSC em tecidos tumorais.

Neoplasia	Expressão do marcador CSC
Mama	CD44 ⁺ , CD24 ⁻
SNC	CD133 ⁺
Mieloma múltiplo	CD138 ⁻
Melanoma	CD20 ⁺
Próstata	NANOG, CD44 ⁺ , $\alpha 2\beta 1$ ⁺ , CD133 ⁺
Cólon	CD133 ⁺
Fígado	CD44 ⁺ , EpCam ⁺
Pâncreas	CD44 ⁺ , EpCam ⁺ , CD24 ⁺

Fonte: Adaptado de REGENBRECHT et al. (2008)

Especificamente em tumores testiculares foram identificados CSC germinativas e um possível papel no desenvolvimento dos tumores testiculares conforme esquematizado na **Figura 1** (CLARK 2007).



Fonte: Adaptado de CLARK (2007).

Figura 1 - Esquema da teoria das células-tronco tumorais germinativas

A identificação de marcadores de CSC nos diversos tecidos tumorais possibilitará um melhor entendimento das propriedades de tais células. Muitas características do metabolismo das CSC seguem desconhecidos e são, atualmente, alvo de interesse e pesquisa nas áreas da biologia molecular e oncologia.

1.5 CICLINA D2

A Ciclina D2 (CCND2) é uma proteína, que faz parte da família das ciclinas, responsável pela regulação do ciclo celular. O gene da CCND2 está localizado no braço curto do cromossomo 12, assim como o gene NANOG, região susceptível a presença de cópias, devido ao isocromossomo (i12p), associado a tumores de células germinativas em 80% dos casos (SKOTHEIM et al. 2002).

A CCND2 é um protooncogene, que codifica proteínas importantes para a regulação do crescimento e proliferação celular. As ciclinas tipo D, fazem parte da via do retinoblastoma (RB), são responsáveis pelo mecanismo regulatório da fase G1 / S do ciclo celular. BARTKOVA et al. (1999) demonstram o aumento de expressão da CCND2 em NITCG e expressão variáveis em tumores de células germinativas, que sugere o envolvimento da CCND2 em fases iniciais da tumorigênese.

Tumores de células germinativas, apresentam expressão acentuada de CCND2 combinada a ausência de genes supressores tumorais, desde a formação do NITCG até o desenvolvimento de neoplasias de células germinativas diferenciadas (SCHMIDT et al. 2001; BARTKOVA et al. 2003). SKOTHEIM et al. (2003) em estudo de expressão imunoistoquímica de CCND2 em amostras de TCGT e tecido normal, encontraram ausência de expressão em tecido normal. A expressão em

TCGT e NITCG foi aumentada, porém sem correlação específica com tipo histológico da neoplasia.

Alem do possível papel como marcador em NITCG e tumores de células germinativas a CCND2 apresenta expressão em tumor de Wilms e em células-tronco embrionárias humanas (FAUSSILLON et al. 2005; BECKER et al. 2006).

1.6 DPPA4

O DPPA4, ‘developmental pluripotency associated 4’, é um dos genes expressos em células-tronco embrionárias. O DPPA4 foi inicialmente identificado como um gene expresso em embriões murinos. O DPPA4 é um fator nuclear associado a cromatina ativa, descrito como regulador da diferenciação de células-tronco embrionárias. A expressão do DPPA4 está limitada a fases iniciais do desenvolvimento embrionário e a células germinativas primordiais (Bortvin, Eggan et al. 2003). Os fatores de transcrição característicos de células-tronco OCT4 – Octamer-binding Transcription factor 4, fator de transcrição SOX2 e NANOG tem como alvo a região promotora do DPPA4 em células-tronco embrionárias humanas (Boyer, Lee et al. 2005). A expressão do DPPA4, através de análise com DNA microarray, esteve presente de maneira significativa em amostras de seminoma.

O papel exato do DPPA4 na manutenção da células-tronco é pouco conhecido. Estudo recente, com células-tronco embrionárias murinas, descartou a função do DPPA4 no desenvolvimento da linhagem celular germinativa (MADAN et al. 2009). O DPPA4 foi identificado em diversos estudos de perfil gênico exclusivo a células totipotentes. Apesar do pouco conhecimento sobre a sua função no

desenvolvimento de células germinativas, é notório que sua expressão ocorre somente em células-tronco.

1.7 NANOG

Em gaélico, Nanog significa “Terra dos sempre jovens” (extraído da mitologia céltica irlandesa, *'Tir Nan Og'*) a denominação provou-se apropriada uma vez que NANOG modula a totipotência das células-tronco embrionárias e permite recriar células-tronco a partir de células somáticas adultas (SILVA et al. 2009).

NANOG é uma proteína de 305 aminoácidos inicialmente descrito como gene regulador de transcrição, localizado no braço curto do cromossomo 12, fundamental para definição de células-tronco embrionárias humanas e auto-renovação pela ativação de repressores e concomitante supressão de ativadores da diferenciação celular (MITSUI et al. 2003; MULLIN et al. 2008). O *locus* do gene NANOG está associado a tumores de células germinativas, a presença de cópias do braço curto do cromossomo 12, devido ao isocromossomo, (i12p), foi descrita inicialmente em 1982 por ATKIN e BAKER.

A regulação decrescente do NANOG induz a diferenciação (HATANO et al. 2005), ao passo que a expressão exacerbada do NANOG induz a totipotência (SILVA et al. 2006). A expressão de NANOG foi descrita em células-tronco embrionárias, células germinativas primordiais, testículo fetal, tumores de células germinativas, seminomas, câncer de mama e câncer de próstata (CHAMBERS et al. 2003; EZEH et al. 2005; HART et al. 2005, JETER et al. 2011).

Os poucos estudos sobre o NANOG, sugerem que não há expressão em tumores diferenciados como tumor do seio endodérmico, teratoma e coriocarcinoma, já a expressão aumentada do NANOG é característica de tumores indiferenciados de células germinativas: NITCG, carcinoma embrionário e seminoma (HART et al. 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar a expressão imunoistoquímica de CCND2, DPPA4 e NANOG no tumor primário de pacientes portadores de TCGTNS submetidos a orquiectomia radical e ulterior linfadenectomia retroperitoneal (para estágio I e para estádios avançados pós-QT) e correlacioná-los como fatores prognósticos da doença.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Analisar o impacto de seus níveis de expressão nos achados histopatológicos dos linfonodos retroperitonias;
- Analisar o impacto dos níveis de expressão dos marcadores nas taxas de sobrevida livre de doença (SLD), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida global (SG).
- Avaliar a expressão dos marcadores nos diversos tipos histológicos de TCGT;

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com tumor testicular não seminomatoso comprovado histologicamente, submetidos a orquiectomia radical e ulterior linfadenectomia retroperitoneal primária ou pós-quimioterapia.
- Ausência de co-morbidades que reduzam a expectativa de vida a menos de seis meses.

3.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes submetidos a QT prévia a orquiectomia;
- Prontuários com dados incompletos ou faltantes;
- Ausência do espécime ou de material anatomopatológico do tumor primário de testículo
- Material insuficiente ou arquivado em más condições impossibilitando a elaboração de novos cortes para imunoistoquímica;
- Casos em que a revisão anatomopatológica não tenha encontrado o TCGTNS na peça do produto da orquiectomia, seja por necrose, discordância diagnóstica ou representação insuficiente.
- TCGTS, tumores testiculares não germinativos e tumores germinativos com primário extragonadal
- Pacientes com tempo de seguimento inferior a seis meses.

METODOLOGIA

Teve início a busca de casos, através do cruzamento de dados do banco do Departamento de Cirurgia Pélvica com os dados do Departamento de Anatomia Patológica, do Registro Hospitalar do Hospital A.C. Camargo. Através dessa estratégia de busca foi possível triar 284 casos.

Foram revisados inicialmente 284 prontuários de pacientes da instituição, incluindo apenas os casos com tumores não seminomatosos submetidos a linfadenectomia retroperitoneal.

Após avaliação inicial de prontuários dos 284 casos iniciais, foram selecionados 54 casos. Todos os pacientes foram admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de entre 1982 e 2007, com diagnóstico de neoplasia germinativa testicular não seminoma. A partir dos 54 casos selecionados, prosseguimos com a busca das lâminas no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo, para revisão e posterior pareamento de blocos selecionados. Sendo que do total de 54 casos foram excluídos 27 casos: 21 casos devido a material insuficiente ou de baixa qualidade, 04 por terem recebido quimioterapia prévia a orquiectomia e 02 por ausência de neoplasia germinativa tipo não seminoma nas lâminas.

Os dados coletados dos 27 pacientes portadores de TCGTNS foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 1). As variáveis consideradas foram: idade, cor, lateralidade de lesão, estágio clínico, níveis de marcadores tumorais pré e pós-operatórios, data e local da realização da

orquiectomia, estágio patológico, tratamento adjuvante, tipo de linfadenectomia retroperitoneal, data da cirurgia, número total de linfonodos dissecados, número de linfonodos acometidos por metástase, resultado anatomopatológico da LNR, ocorrência de redivida e tratamento, classificação de prognóstico pela IGCCCG, tempo de seguimento, situação clínica ao final do estudo. A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se cortes convencionais para posterior coloração imunoistoquímica dos anticorpos CCND2, DPPA4 e NANOG .

3.1.3 Diagnóstico e Estadiamento

Todos os pacientes foram avaliados, de acordo com a rotina do departamento, inicialmente por exame clínico geral. Os pacientes foram indagados quanto a presença de sinais e sintomas relacionados à neoplasia testicular. A tomografia computadorizada de abdômen foi o método de imagem padrão para estadiamento do retroperitônio. O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM S, previamente descrito. As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio anterior e perfil. Na presença de lesões pulmonares suspeitas a tomografia computadorizada de tórax foi solicitada para confirmação de possíveis focos tumorais metastáticos. A cintilografia óssea e a tomografia computadorizada de crânio foram realizadas apenas nos casos de suspeita clínica de metástases ósseas ou para sistema nervoso central (sintomatologia, alteração laboratorial sugestiva ou doença metastática em múltiplos sítios).

Quando os pacientes já haviam sido submetidos a orquiectomia radical em outras instituições, as lâminas e blocos de parafina recuperados foram submetidos à revisão anatomopatológica sistemática.

3.1.4 Tratamento Cirúrgico

Todos os pacientes foram inicialmente submetidos a orquiectomia radical por via inguinal e ulterior linfadenectomia retroperitoneal. Os tipos de linfadenectomia retroperitoneal realizados, de acordo com a estágio patológico e avaliação intra-operatória, foram: modificada com preservação de nervos para os casos de Estádio I de alto risco e LNRP clássica sem preservação de nervos ou com preservação de nervos quando possível, para os casos pós-QT.

3.1.5 Seguimento dos Pacientes

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas mensalmente no primeiro semestre, e bimestralmente no segundo semestre. Do segundo ao terceiro ano de seguimento estas consultas passaram a ser trimestrais, sendo após o terceiro ano, realizadas anualmente. Em todas as consultas, foi realizado exame físico sistemático. Exames laboratoriais (DHL, AFP, β -HCG) e de imagem foram utilizados rotineiramente durante o acompanhamento clínico. Em casos suspeitos de recidiva local ou sistêmica, utilizou-se a tomografia computadorizada para confirmação diagnóstica.

Pacientes que não compareceram as consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para retorno foram considerados perdidos de seguimento na data da ultima informação.

Os pacientes foram classificados a partir do seguimento em:

- a) vivos sem câncer;
- b) vivos com câncer;
- c) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós

operatório (até 30 dias pós-cirurgia);

d) mortos por outras causas;

e) perdidos de seguimento.

3.1.6 Técnica de Imunoistoquímica

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificaram-se as lâminas histológicas referentes à peça cirúrgica. Em virtude de haver, em vários casos, mais de uma lâmina representativa do tumor primário, todas elas foram revistas por uma única especialista (Dra. Isabela W. da Cunha, sem conhecimento dos desfechos clínicos e patológicos) selecionando-se aquelas representativas dos diferentes componentes histológicos dos TCGTNS.

Os blocos correspondentes as lâminas mais representativas selecionadas, foram seccionados com cortes de 4µm e montados em lâminas previamente tratadas com 3 aminopropiltietoxi-silano (Sigma, A-3648,EUA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C para melhor adesão dos tecidos. Em seguida as lâminas foram submetidas ao processo de reações imunoistoquímicas descrito abaixo.

Os marcadores imunoistoquímicos empregados, bem como suas especificações e respectivas diluições estão assinalados no Quadro 8.

- **Desparafinização:** A desparafinização dos cortes foi realizada com dois banhos sucessivos de Xilol, o primeiro a 60°C por 20 minutos e o segundo, em temperatura ambiente por 20 minutos. A reidratação foi obtida em quatro banhos sucessivos de Etanol a 100%, a 95%, a 80% e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um. As lâminas foram enxaguadas em água corrente e destilada.

- **Recuperação Antigênica:** Procedeu-se então a recuperação antigênica em panela de pressão (Solar®-Tramontina). A solução tampão Citrato 10 mM pH 6,0 foi fervida na panela aberta e só então as lâminas foram mergulhadas e a panela lacrada, com válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula foi abaixada e a panela pressurizada. As lâminas permaneceram por quatro minutos após a pressurização. A panela ainda fechada foi esfriada por 10 minutos em água corrente e depois de destampada, foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.
- **Bloqueio da Peroxidase Endógena:** A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ (água oxigenada a 10 volumes), com três trocas de dez minutos cada. Nova lavagem em água corrente destilada e na sequência um banho com solução salina tamponada com fosfatos (*'PBS-Phosphate buffered saline'*) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos.
- **Incubação dos anticorpos primários:** As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma A9647, EUA) e Azida Sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida, sendo posteriormente lavada em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Após a incubação com esses anticorpos, foi aplicado o sistema de amplificação por polímero não biotilado Novolink (Novocastra, *New Castle Upon Tyne*, Inglaterra) por 30 minutos à 37°. Nova lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos cada.
- **Incubação com cromógeno e contra coloração:** Realizou-se a incubação da

lâmina em solução substrato: 3,3' *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride*(DAB) 100mg% (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfídico (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100mL de PBS por 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Observou-se, ao microscópio, nas lâminas controle o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. A lâmina foi, então, contra corada com hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavada em água corrente e destilada. As lâminas foram imersas, duas vezes, em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

- **Desidratação das lâminas:** Na sequência, as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de Etanol a 80%, a 95%, a 100%, por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de Xilol de 30 segundos cada.
- **Controles positivo e negativo:** A fidelidade das lâminas sempre foi atestada através de controles positivos em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos estudados (seminoma e linfoma B de grandes células) e de dois controle negativos, obtidos pela omissão dos anticorpos primários e o segundo controle negativo foi obtido pela supressão do anticorpo primário e substituição por imunoglobulina do mesmo idiótipo.

Quadro 8 - Lista de anticorpos primários utilizados com respectivos clones, títulos, códigos e nomes de fabricantes.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
CCND2	Monoclonal murino (DCS-3.1 + DCS-5.2)	1:50	AbCam#ab3087, Cambridge, MA, EUA.
DPPA4	Policlonal feito em coelho	1:10	AbCam#ab80149, Cambridge, MA, EUA.
NANOG	Monoclonal murino 1(E6C4)	1:1000	Cell Signaling #4893, Danvers, MA, EUA.

3.2.5 Avaliação das Reações De Imunoistoquímica

As reações foram realizadas em cortes convencionais e avaliadas por uma patologista (IWC). Para este trabalho, foram consideradas positivas, apenas as marcações nucleares, apesar de marcação citoplasmática em alguns casos. A avaliação foi feita de forma não automatizada, com Microscópio óptico em aumento de 200 x, em cada componente tumoral isoladamente, onde se avaliou a porcentagem de células positivas em cada subtipo histológico presente nos tumores avaliados. Inicialmente, as expressões foram divididas em quartis, 0 a 25%; 26 a 50%; 51% a 75% e 76 a 100% de expressão. Após as análises estatísticas preliminares, pode-se notar que os resultados com expressão de 0 a 25% e de 26 a 50%, foram bastante semelhantes, bem como para os quartis 50 a 75% e 76 a 100%. Sendo assim, optou-se por considerar apenas o valor corte de 50%, dividindo a população com positividade variando entre 0 e 49% como de baixa expressão e casos com positividade maior ou igual a 50% como tendo alta expressão.

3.2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 1), digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa *Excel 7.0 for Windows*. Para a análise estatística utilizou-se o software *Stata Statistical Software*, versão 7.0, College Station, Stata Corporation.

A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foi apresentada na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e seus respectivos desvios-padrão. Com o intuito de se verificar a existência de associação da expressão de CCND2, DPPA4 e NANOG às demais variáveis, foi realizado o teste Qui Quadrado de Pearson. Para os casos em que as frequências esperadas foram inferiores a 5 foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi o de 5%, p-valor.

A identificação dos fatores independentes relacionados à sobrevida global (SG), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD) foi realizada pela regressão logística múltipla. Para estudar as análises de SG, SCE e SLD utilizou-se o estimador de KAPLAN e MEIER (1958) como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com TCGTNS estar vivo ou não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Através da representação gráfica desse estimador, conseguimos visualizar, para uma determinada variável, qual categoria de pacientes apresenta maior probabilidade de não morrer por TCGTNS ou não apresentar recidiva de TCGTNS ao longo do tempo. Quanto mais superior for a curva referente a uma determinada categoria, maior será a probabilidade de os

pacientes dessa categoria estarem vivos ou sem recidiva do TCGTNS até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável utilizou-se o teste não-paramétrico de LogRank. Os valores p correspondentes aos testes estão apresentados no canto inferior direito de cada gráfico. O nível de significância adotado foi o de 5%.

Pacientes considerados perdidos de seguimento na data da ultima informação contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

3.2.7 Análise de Riscos e Aspectos Éticos

Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve a participação direta de pacientes, nem a alteração da estratégia de seguimento pós-operatório ou a introdução de qualquer modificação terapêutica, ou aplicação de qualquer medicação ou método que tenha gerado danos, benefícios, ou outras consequências a qualquer paciente. Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado. Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois, a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e sempre foi mantido material residual no bloco. O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do

Hospital do Câncer e foi aprovado em 06/10/2009. Está protocolado na referida comissão sob o número no. 1318/09.

3.3 CASUÍSTICA

3.3.1 Aspectos Demográficos e Clínicos

A idade dos 27 pacientes variou de 17 a 41 anos com média de 25,44 e mediana de 24 (dp = 6,44). Vinte pacientes (74,1%) apresentavam idade até 29 anos e 7 (25,9%) tinham 30 anos ou mais. Todos os pacientes eram brancos.

O tumor acometeu o testículo esquerdo em 18 casos e o testículo direito em 9 casos. Na apresentação à primeira consulta, 18 pacientes (66,6%) apresentavam o tumor testicular, enquanto 09 (33,4%) já haviam sido submetidos a orquiectomia em outra instituição.

O estadiamento “T” baseia-se na avaliação patológica da orquiectomia, será descrito nos aspectos anatomopatológicos. Em relação ao estágio clínico linfonodal, “N” AJCC / UICC (2010), o número de casos N0, N1, N2, N3 e Nx foi respectivamente, 12 (44,4%); 1 (3,7%); 6 (7,4%); 8 (29,6%) e nenhum caso Nx. Seis pacientes apresentavam metástase a distância ao estadiamento clínico inicial, sendo um paciente estágio M1a e cinco pacientes M1b. O estágio S, considerando a dosagem de marcadores ; AFP, B-HCG e DL na 30 dias após a orquiectomia, o número de casos S0, S1, S2, S3 e Sx foi respectivamente, 10 (37,3%); 12 (44,4%); 3 (11,1%); 0 e 2 (7,4%).

Todos os pacientes foram submetidos a LNRP, o tempo entre a orquiectomia e a LNRP variou de 1 a 71 meses com média de 9,62 e mediana de 5 meses (dp=

17,0). A LNRP foi primária em 10 casos e pós-QT nos 17 casos restantes. A LNRP foi modificada com preservação de nervos em 11 casos; clássica com preservação de nervos em 3 casos e clássica sem preservação de nervos em 13 casos.

3.3.2 Aspectos Anatomopatológicos

Os tumores em sua maioria eram mistos, apenas 8 tumores apresentavam um único componente histológico, sendo 7 carcinomas embrionários e 1 teratoma maduro. De acordo com o estadiamento patológico “T” AJCC / UICC (2010), 11 (40,7%) apresentavam tumores pT1, 15 (55,5%) pT2, 01 (3,7%) pT3 e nenhum caso pT4 ou pTis. A invasão microvascular foi constatada em 09 casos (33,4%) e estava ausente em 18 casos (66,6%). A NITCG estava associada a 10 (37,0%) casos, sendo descartada dos demais casos, na revisão patológica.

Os pacientes submetidos a linfadenectomia primária apresentaram em 6 casos tumor de células germinativas nos linfonodos retroperitoneais, e 4 casos sem doença retroperitoneal. Os pacientes submetidos a LNRP pós-quimioterapia apresentaram em 8 casos (47,0%) fibrose/necrose; em 7 casos (41,2%) teratoma e em 2 casos (11,8%) tumor viável em linfonodos retroperitoneais.

4 RESULTADOS

4.1 LNRP PRIMÁRIA

Optamos por descrever inicialmente os resultados obtidos pelas reações imunoistoquímicas de acordo com as variáveis demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a LNRP primária. As variáveis analisadas, nos casos submetidos a LNRP primária, são demonstradas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas nos pacientes submetidos a LNRP primária.

Variável	Categoria	Freq. (%) / Medidas
Raça	Branços	10 (100,0)
	Não Brancos	0 (0,0)
Idade ≥ 30 anos	Não	7 (70,0)
	Sim	3 (30,0)
Invasão microvascular	Não	7 (70,0)
	Sim	3 (30,0)
Carcinoma embrionário (≥50%)	Não	3 (30,0)
	Sim	7 (70,0)
Tumor de seio endodérmico	Ausente	6 (60,0)
	Presente	4 (40,0)
pN+	Presente	6 (60,0)
	Ausente	4 (40,0)
CCND2	Baixa expressão	2 (20,0)
	Alta expressão	8 (80,0)
DPPA4	Baixa expressão	2 (20,0)
	Alta expressão	8 (80,0)
NANOG	Baixa expressão	1 (10,0)
	Alta expressão	9 (90,0)
Status	Vivo sem evidência de doença	9 (90,0)
	Perdido de seguimento	1 (10,0)
Tempo de seguimento (meses)	N	10
	Varição	36 – 191
	Mediana	64,5
	Média (± desvio padrão)	77,2 (± 46,4)

4.1.1 LNRP Pós-Quimioterapia

Os resultados obtidos pelas reações imunoistoquímicas de acordo com as variáveis demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a LNRP pós-QT são vistas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas nos pacientes submetidos a LNRP pós-quimioterapia.

Variável	Categoria	Freq. (%) / Medidas
Raça	Branços	17 (100,0)
	Não Brancos	0 (0,0)
Idade ≥ 30 anos	Não	13 (76,5)
	Sim	4 (23,5)
IGCCCG	Bom	11 (64,7)
	Intermediário	1 (5,9)
	Ruim	5 (29,4)
Anatomo-patológico da LNRP	Fibrose ou necrose	7 (41,2)
	Tumor viável ou teratoma	10 (58,8)
CCND2	Baixa expressão	9 (52,9)
	Alta expressão	8 (47,1)
DPPA4	Baixa expressão	3 (17,6)
	Alta expressão	14 (82,4)
NANOG	Baixa expressão	5 (29,4)
	Alta expressão	12 (70,6)
Obito	Não	14 (82,4)
	Sim	3 (17,6)
Tempo de seguimento (meses)	N	17
	Variação	19 – 215
	Mediana	91
	Média (± desvio padrão)	92,2 (± 59,8)

Em virtude do limitado número de casos, para análise de resultados de pacientes submetidos a LNRP pós-QT, apresentamos sempre associados os casos de tumor viável e teratoma (pacientes que foram beneficiados pela LNRP) versus os casos de fibrose ou necrose, para os quais a cirurgia foi apenas estadiadora.

4.2 EXPRESÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Devido a variedade de componentes histológicos que compõe os tumores mistos de células germinativas, um único testículo pode apresentar diferentes tipos histológicos (componente seminomatoso, carcinoma embrionário; teratoma maduro, teratoma imaturo, tumor de seio endodérmico e coriocarcinoma) e pela diversidade de expressão imunoistoquímica em cada tipo histológico, realizamos a descrição desses eventos de maneira global nas **Tabelas 3 a 6**. Lembramos que em muitos casos havia presença de componente seminomatoso, os quais foram avaliados também.

4.2.1 CCND2

Analisando a diferença entre os componentes tumorais, na **Tabela 3** podemos observar que há maior expressão de CCND2 nos subtipos carcinoma embrionário e no componente seminomatoso, expressão diminuída nos teratomas e tumor de seio endodérmico e ausência de expressão em todos os casos de coriorcarcinoma.

Tabela 3 - Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador CCND2.

CCND2 / Componentes tumorais	Medidas	Resultados
Seminoma *	N	5
	Variação	0 – 100
	Mediana	90
	Média ($\pm$ desvio padrão)	74,0 ($\pm$ 42,2)
Carcinoma embrionário	N	20
	Variação	0 – 100
	Mediana	70
	Média ($\pm$ desvio padrão)	54,0 ($\pm$ 45,1)
Teratoma maduro	N	7
	Variação	0 – 100
	Mediana	50
	Média ($\pm$ desvio padrão)	55,7 ($\pm$ 36,0)
Teratoma imaturo	N	7
	Variação	0 – 100
	Mediana	10
	Média ($\pm$ desvio padrão)	42,8 ($\pm$ 50,6)
Tumor de seio endodérmico	N	5
	Variação	0 – 100
	Mediana	0
	Média ($\pm$ desvio padrão)	26,0 ($\pm$ 43,3)
Coriocarcinoma	N	3
	Variação	0 – 0
	Mediana	0
	Média (desvio padrão)	0

* componente seminomatoso de TCGTNS.

4.2.2 DPPA4

Analisando a diferença entre os componentes tumorais, na **Tabela 4** podemos observar que há expressão elevada de DPPA4 nos subtipos: componente seminomatoso, carcinoma embrionário, teratoma maduro, teratoma imaturo e tumor de seio endodérmico e expressão reduzida somente nos casos de coriocarcinoma.

Tabela 4 - Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador DPPA4.

DPPA4 / Componentes tumorais	Medidas	Resultados
Seminoma *	N	5
	Variação	40 – 100
	Mediana	100
	Média ($\pm$ desvio padrão)	78,0 ($\pm$ 30,3)
Carcinoma embrionário	N	20
	Variação	30 – 100
	Mediana	80
	Média ($\pm$ desvio padrão)	83,5 ($\pm$ 20,1)
Teratoma maduro	N	7
	Variação	20 – 80
	Mediana	50
	Média ($\pm$ desvio padrão)	55,7 ($\pm$ 22,2)
Teratoma imaturo	N	7
	Variação	10 – 100
	Mediana	70
	Média ($\pm$ desvio padrão)	64,3 ($\pm$ 30,5)
Tumor de seio endodérmico	N	5
	Variação	0 – 100
	Mediana	100
	Média ($\pm$ desvio padrão)	78,0 ($\pm$ 43,8)
Coriocarcinoma	N	3
	Variação	0 – 100
	Mediana	40
	Média ($\pm$ desvio padrão)	46,7 ($\pm$ 50,3)

* componente seminomatoso de TCGTNS.

4.2.3 NANOG

Analisando a diferença entre os componentes tumorais, na **Tabela 5** podemos observar que há expressão elevada de NANOG somente no componente seminomatoso e no carcinoma embrionário. Ausência de expressão nos subtipos teratoma maduro, teratoma imaturo, tumor de seio endodérmico e coriorcarcinoma.

Tabela 5 - Distribuição dos componentes tumorais e a respectiva expressão do marcador NANOG.

NANOG / Componentes tumorais	Medidas	Resultados
Seminoma *	N Variação Mediana Média ($\pm$ desvio padrão)	5 0 – 100 80 60,0 ($\pm$ 46,9)
Carcinoma embrionário	N Variação Mediana Média ($\pm$ desvio padrão)	20 80 – 100 100 98,0 ($\pm$ 5,2)
Teratoma maduro	N Variação Mediana Média ($\pm$ desvio padrão)	7 0 – 0 0 0
Teratoma imaturo	N Variação Mediana Média ($\pm$ desvio padrão)	7 0 – 0 0 0
Tumor de seio endodermico	N Variação Mediana Média ($\pm$ desvio padrão)	6 0 – 100 0 30,0 ($\pm$ 46,9)
Coriocarcinoma	N Variação Mediana Média (desvio padrão)	3 0 – 0 0 0

* componente seminomatoso de TCGTNS.

De modo resumido, para facilitar a visualização global, podemos aferir na Tabela 6, os valores medianos de expressão de cada um dos tipos histológicos além da expressão em NITCG.

Tabela 6 - A expressão imunoistoquímica dos marcadores de CSC, através da descrição do valor de medianas, nos diferentes componentes tumorais das TCGTNS.

TUMOR	CCND2	DPPA4	NANOG
SEMINOMA*	90	100	80
NITCG	100	100	100
CARCINOMA EMBRIONÁRIO	70	80	100
TERATOMA MADURO	50	50	0
TERATOMA IMATURO	10	70	0
TUMOR DE SEIO ENDODÉRMICO	0	100	0
CORIOCARCINOMA	0	40	0

* componente seminomatoso de TCGTNS.

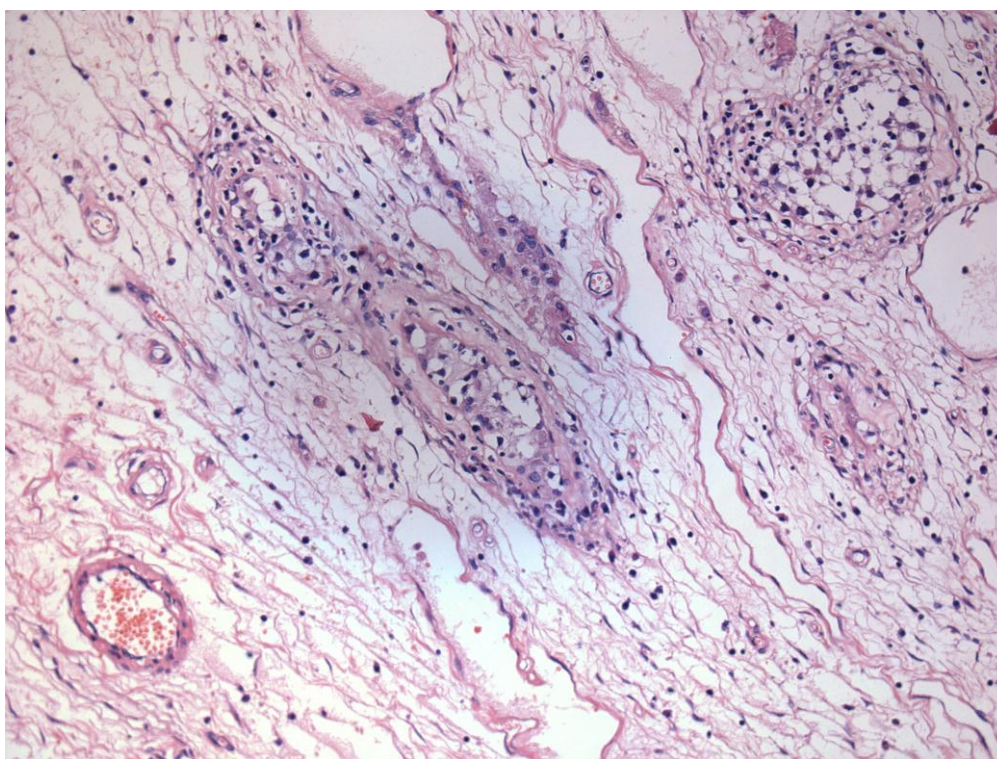


Figura 2 - Fotomicrografia de NITCG em HE (aumento original de 200x)

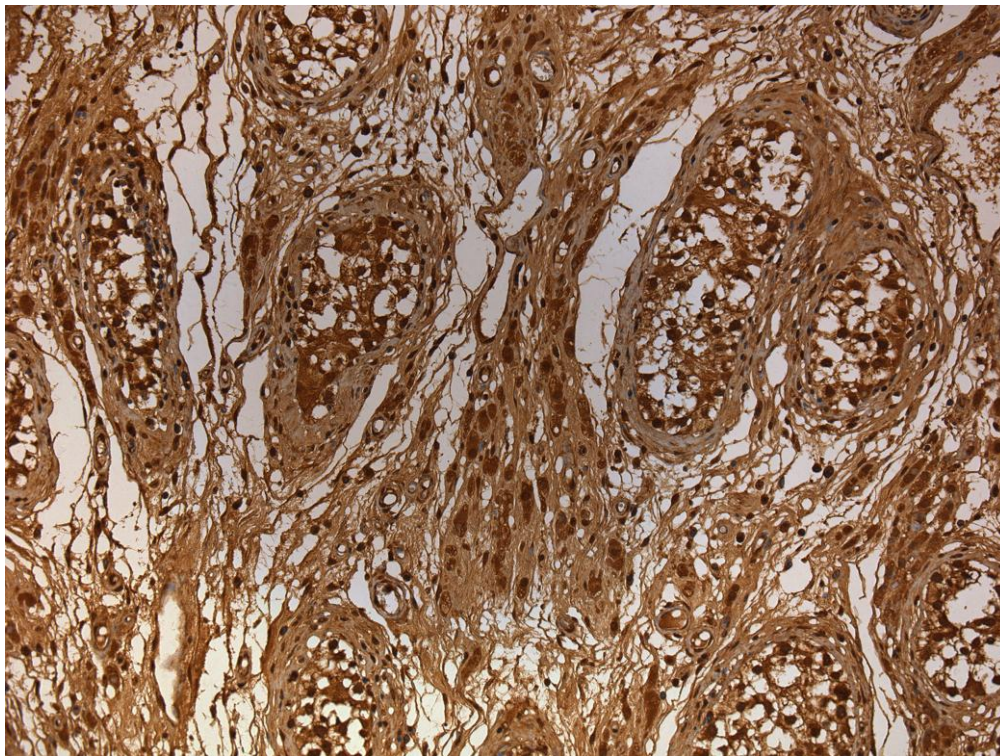


Figura 3 - Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de CCND2 (aumento original de 200X)

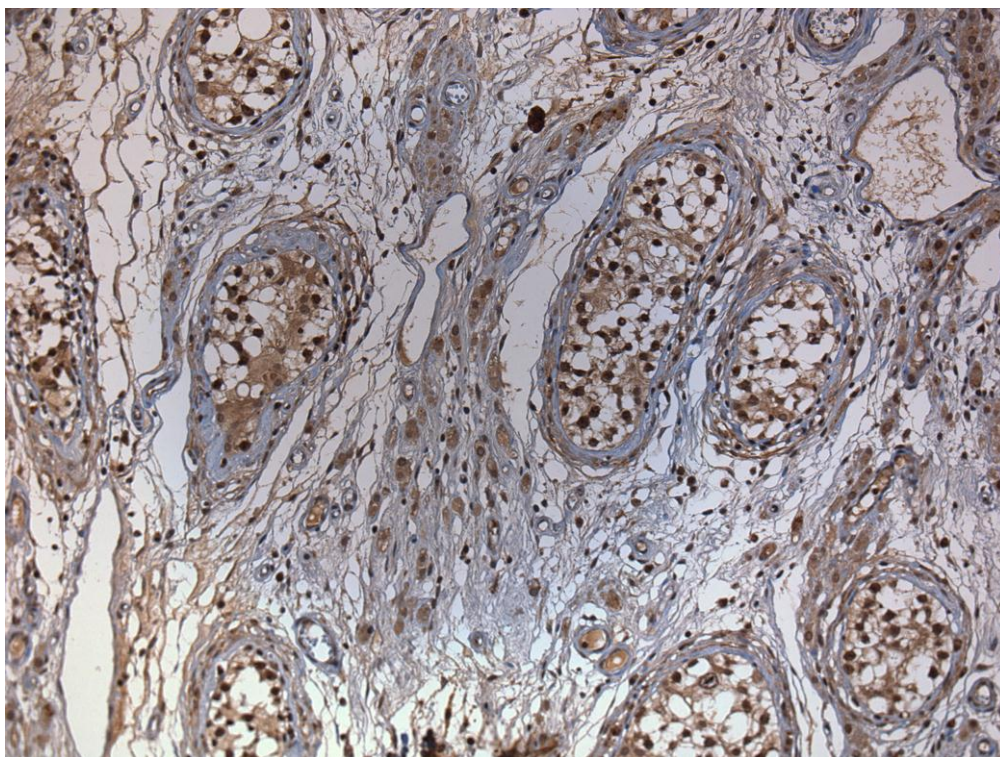


Figura 4 - Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de DPPA4 (aumento original de 200X)

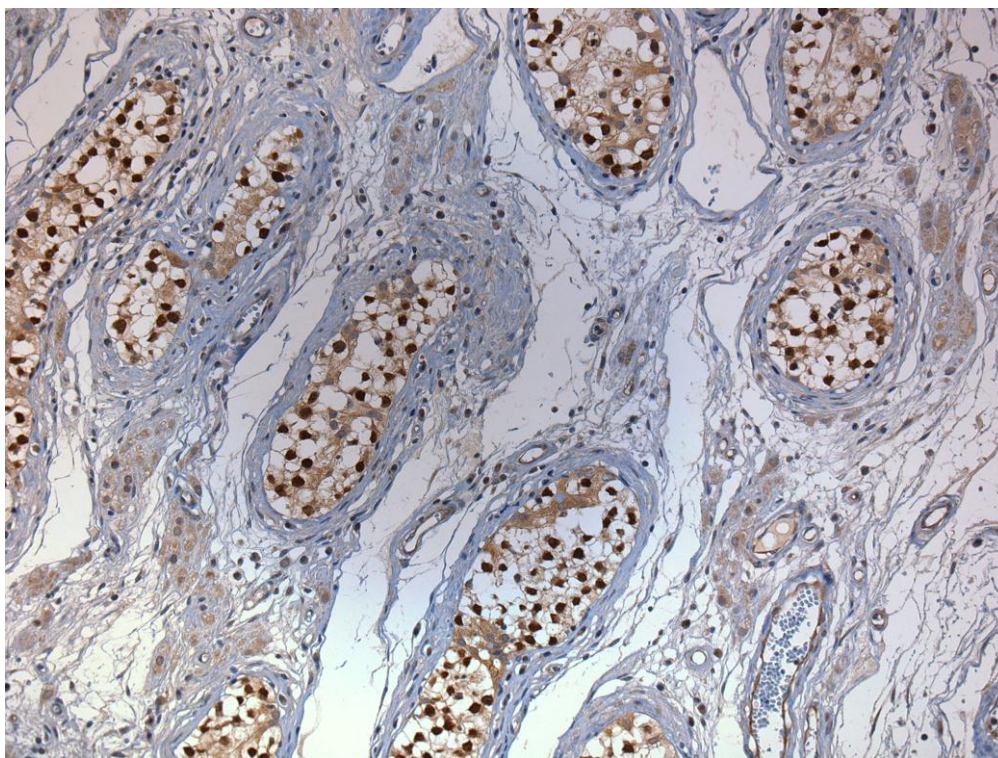


Figura 5 - Fotomicrografia de NITCG com expressão elevada de NANOG (aumento original de 200X)

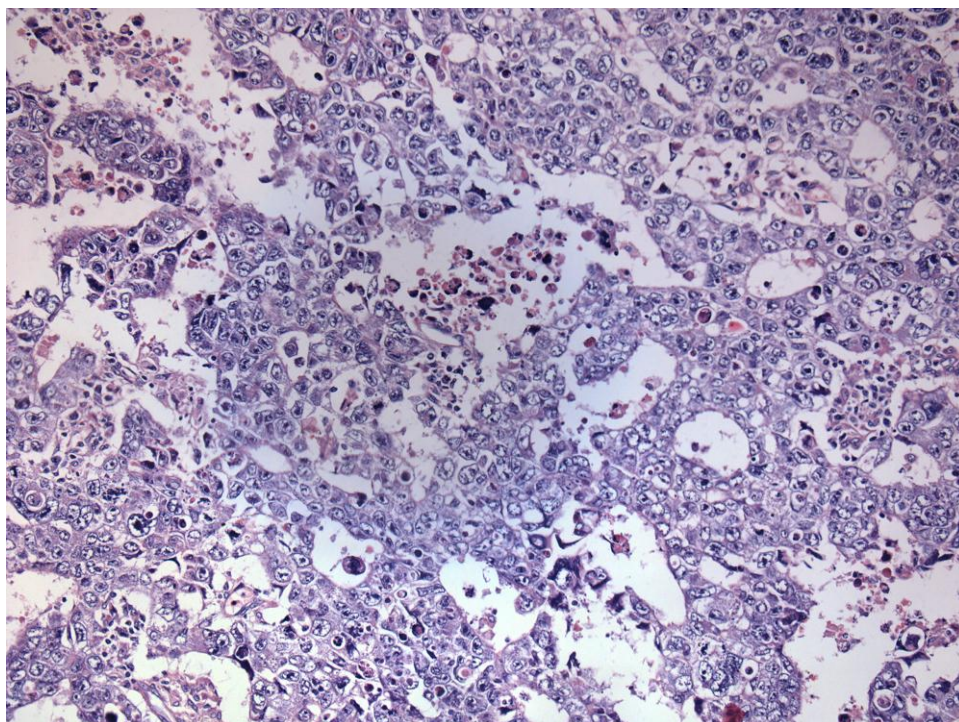


Figura 6 - Fotomicrografia de carcinoma embrionário em HE (aumento original de 200X)

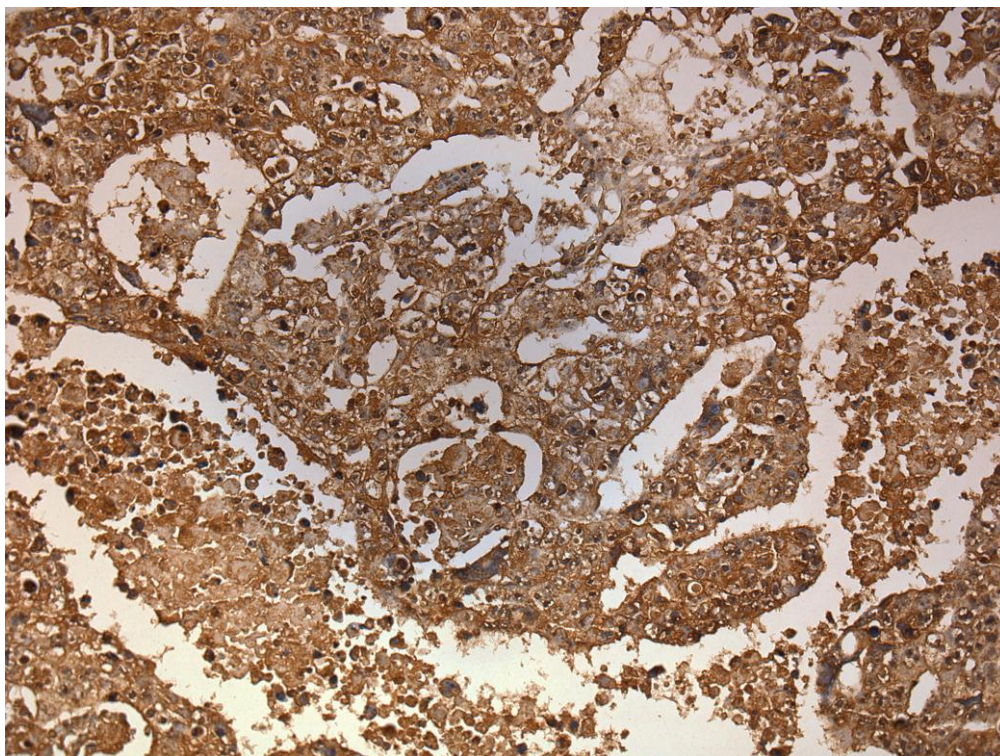


Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma embrionário com expressão elevada de CCND2 (aumento original de 200x)

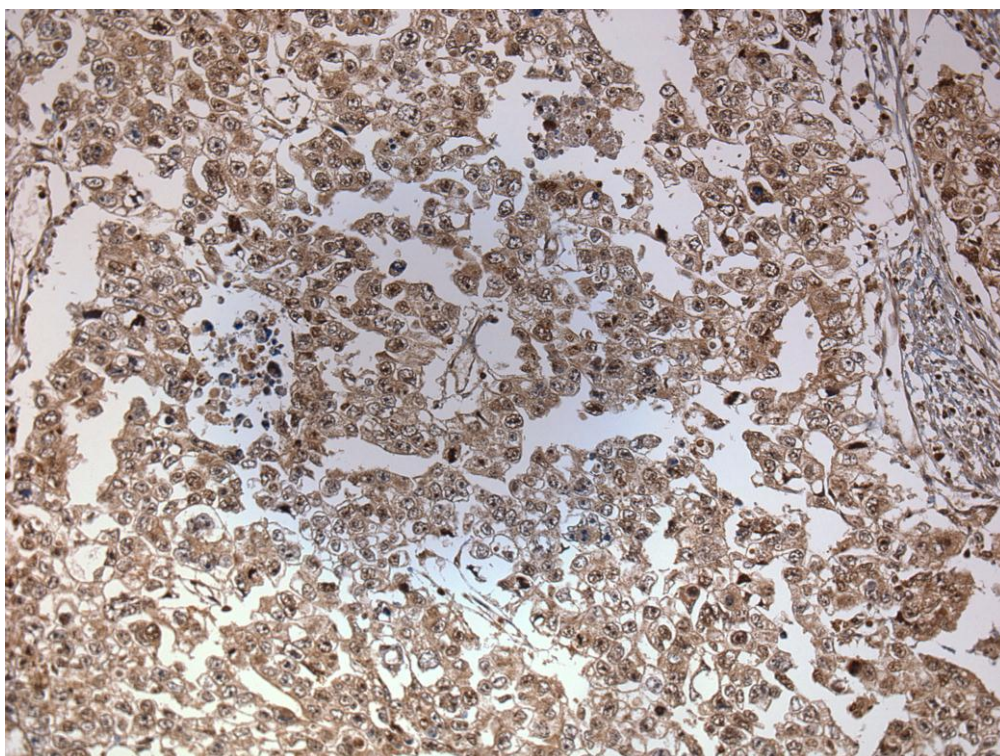


Figura 8 - Fotomicrografia de carcinoma embrionário com expressão elevada de DPPA4 (aumento original de 200x)

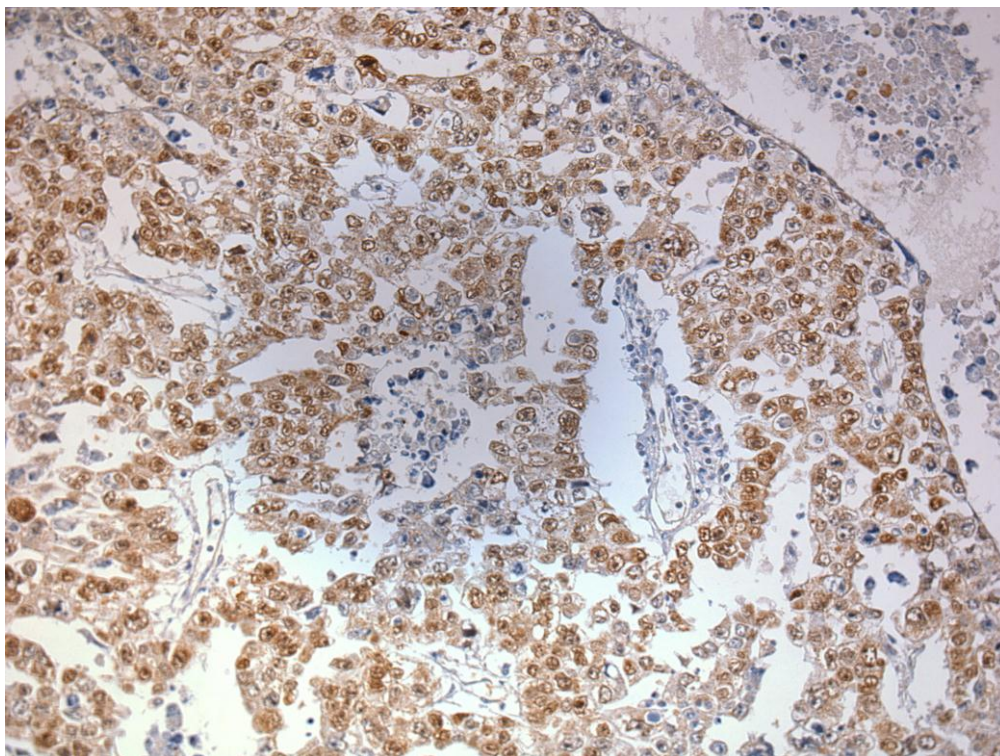


Figura 9 - Fotomicrografia de carcinoma embrionário com expressão elevada de NANOG (aumento original de 200X)

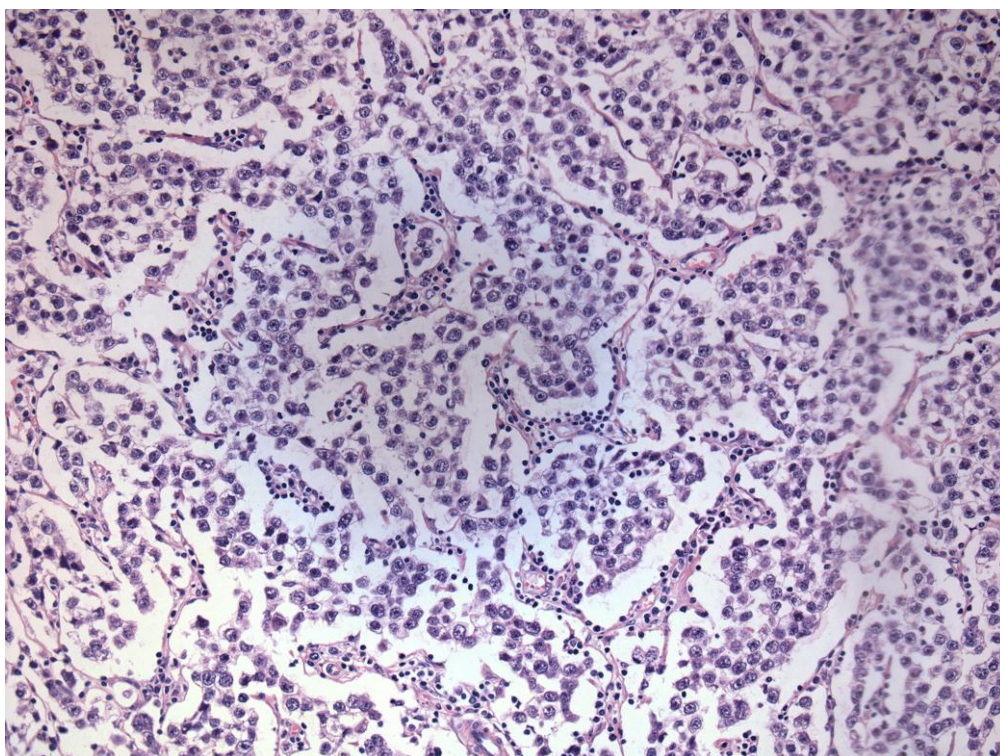


Figura 10 - Fotomicrografia de componente seminomatoso em HE (aumento original de 200X)

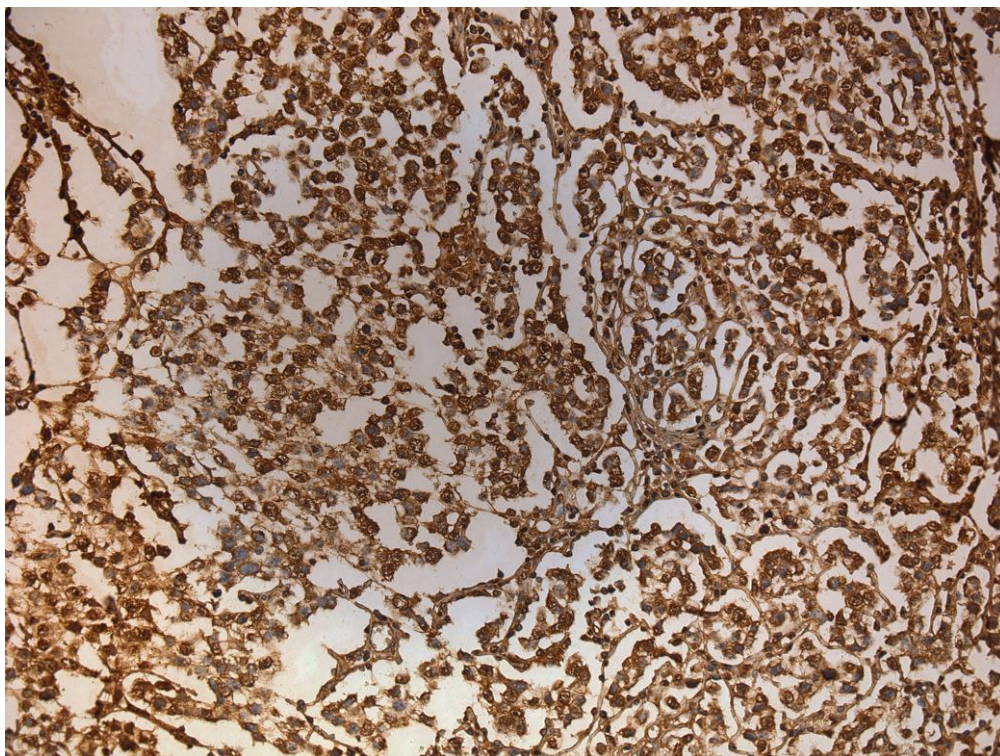


Figura 11 - Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de CCND2 (aumento original de 200X)

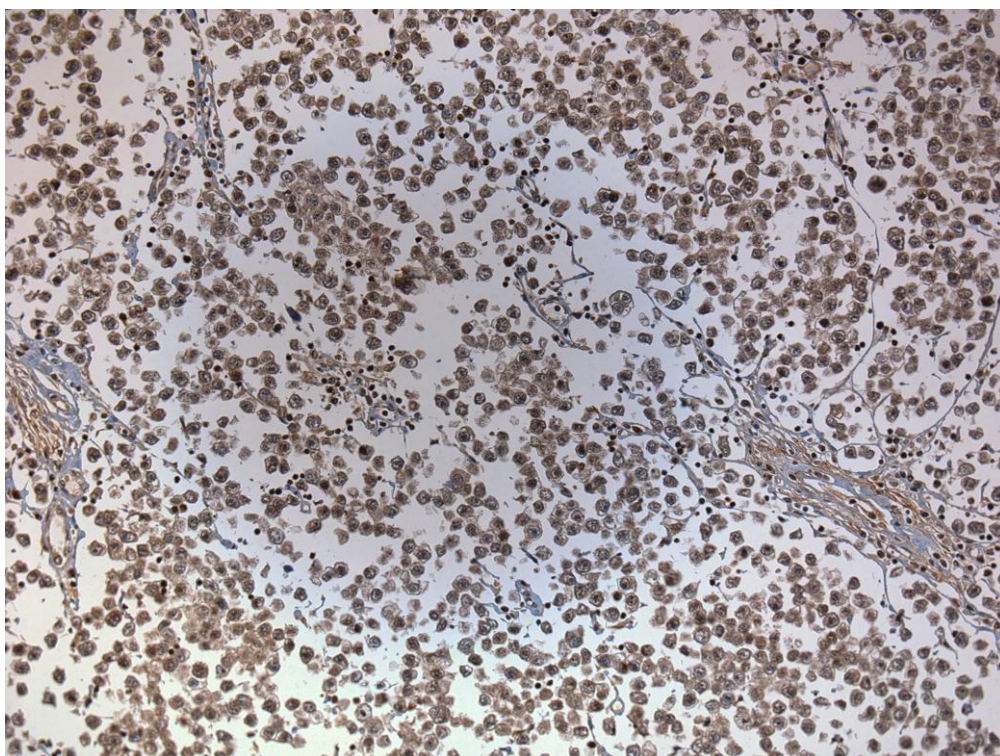


Figura 12 - Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de DDP4 (aumento original de 200X)

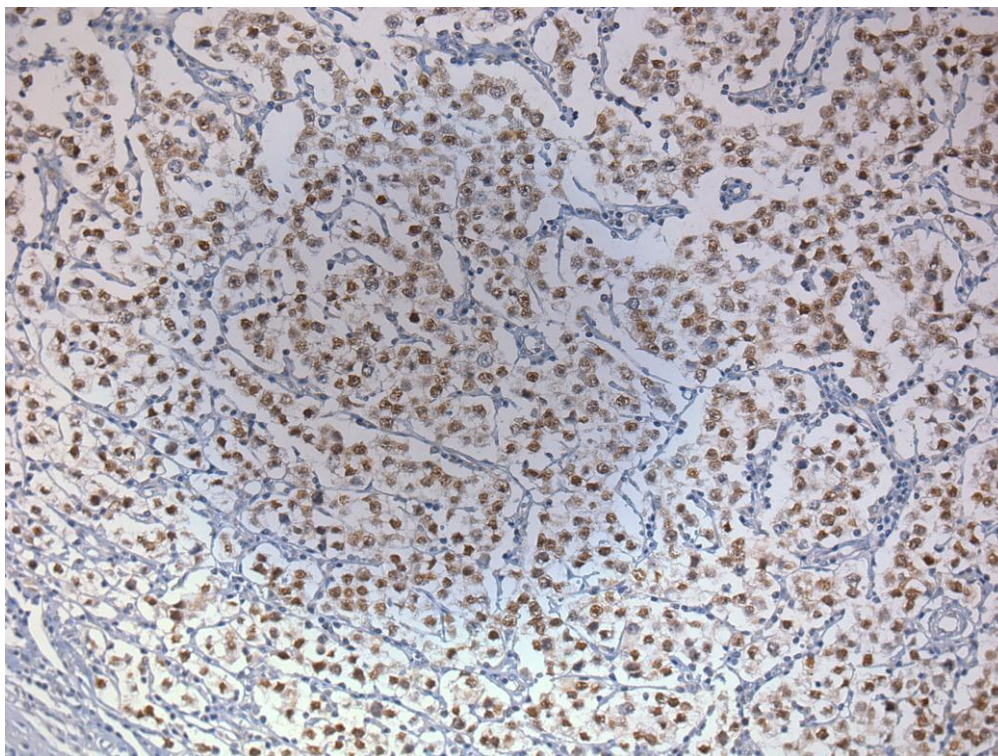


Figura 13 - Fotomicrografia de componente seminomatoso com expressão elevada de NANOG (aumento original de 200X)

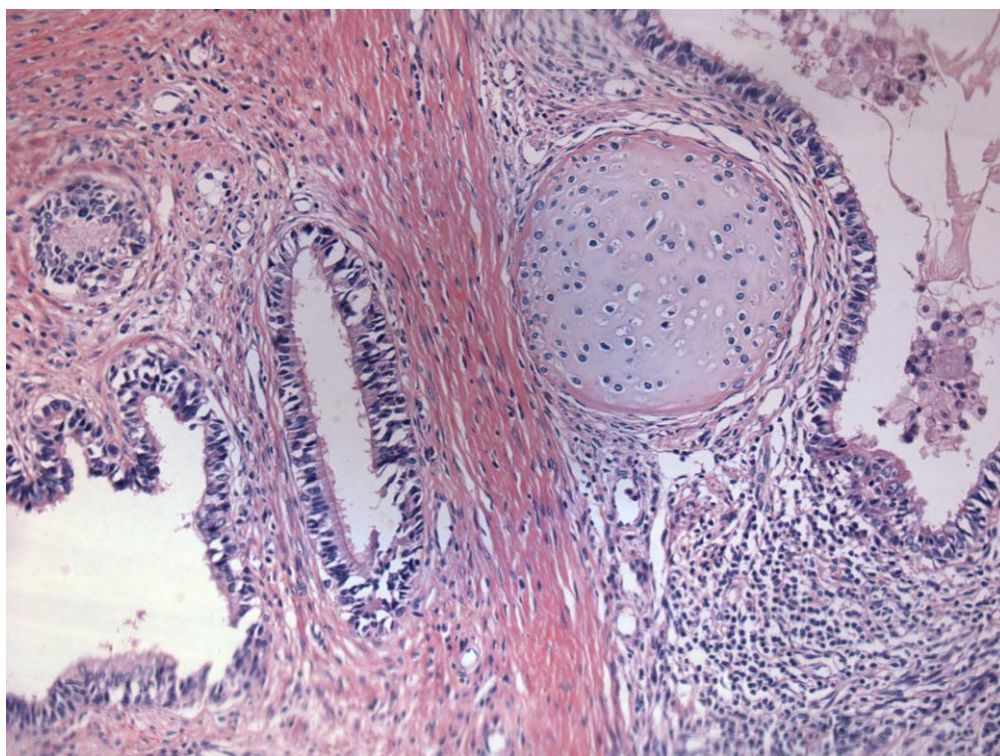


Figura 14 - Fotomicrografia de teratoma maduro em HE (aumento original de 200X)

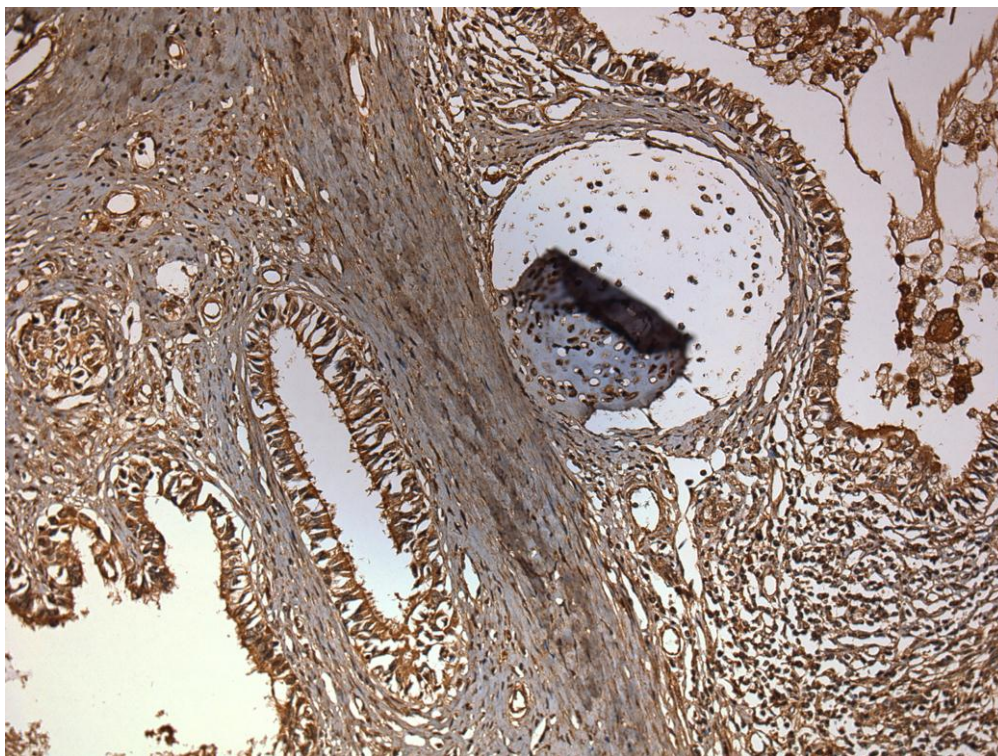


Figura 15 - Fotomicrografia de teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de CCND2 (aumento de 200X)

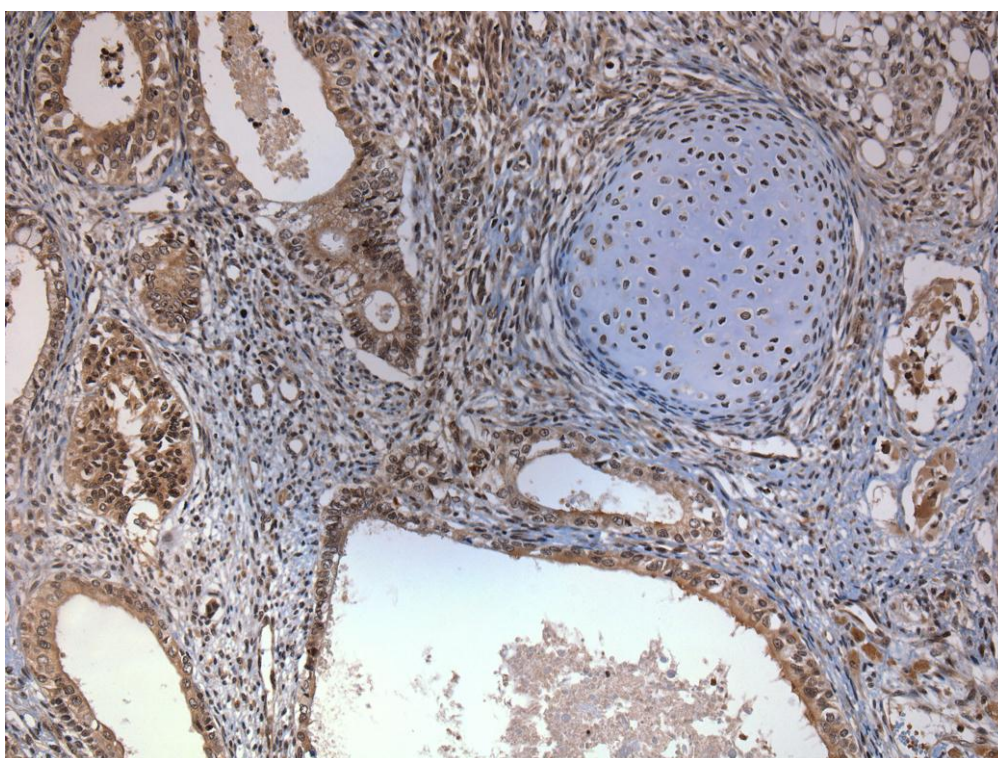


Figura 16 - Fotomicrografia de teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de DPPA4 (aumento de 200X)

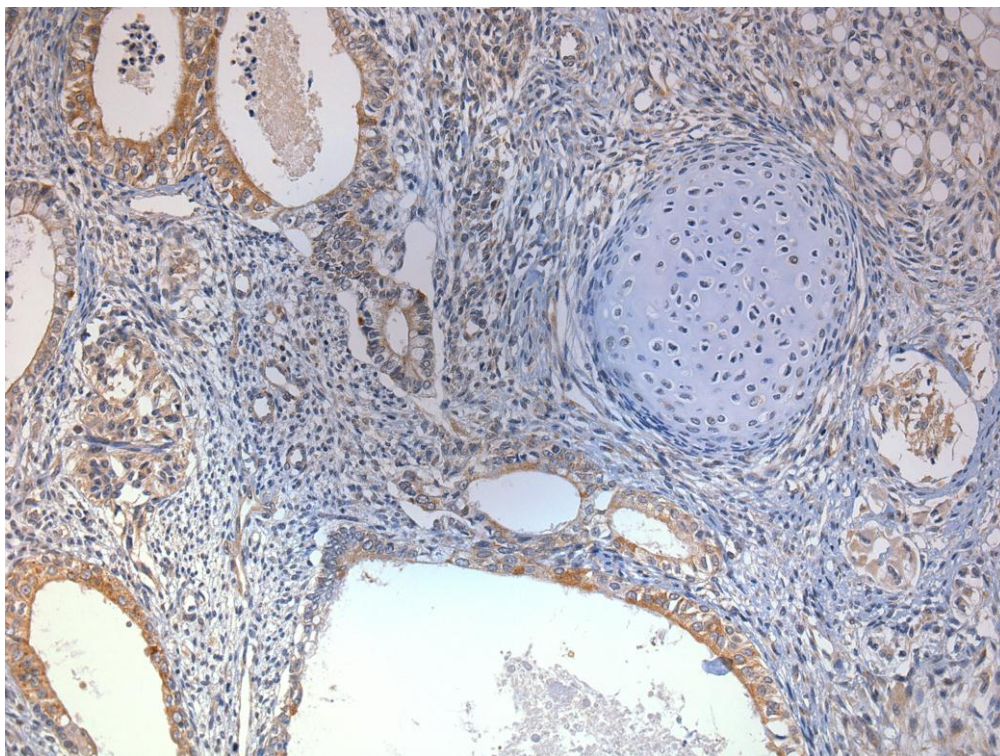


Figura 17 - Fotomicrografia de teratoma maduro com expressão nuclear reduzida de NANOG (aumento de 200X)

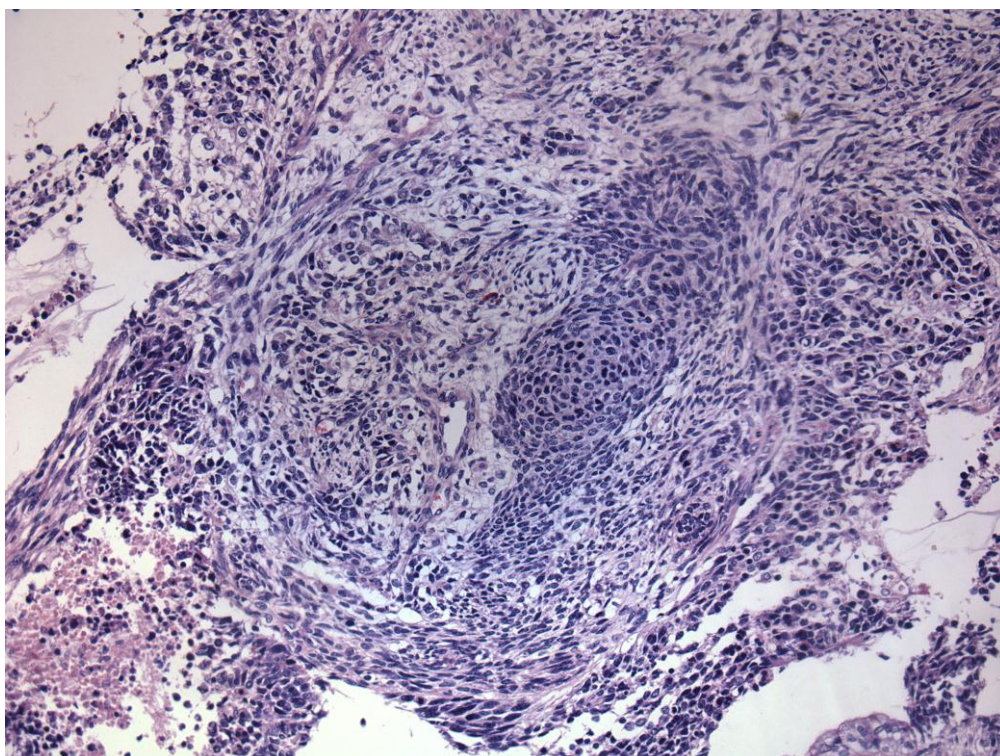


Figura 18 - Fotomicrografia de teratoma imaturo em HE (aumento original de 200X)

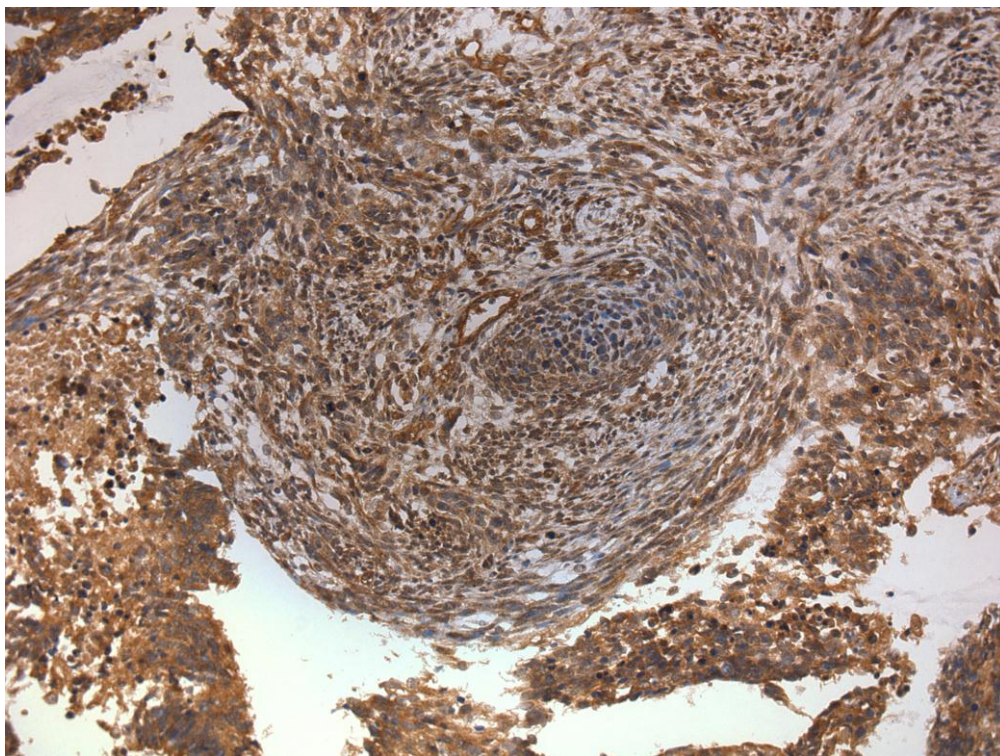


Figura 19 - Fotomicrografia de teratoma imaturo com expressão nuclear reduzida de CCND2 (aumento de 200X)

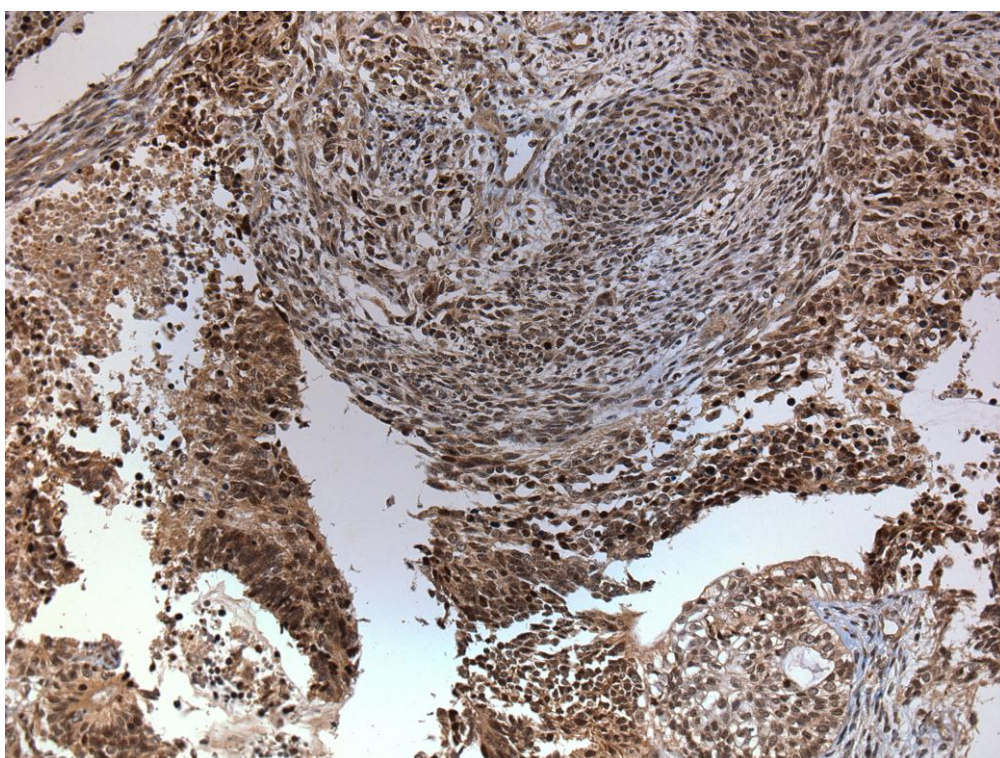


Figura 20 -Fotomicrografia de teratoma imaturo com expressão elevada de DPPA4 (aumento de 200X)

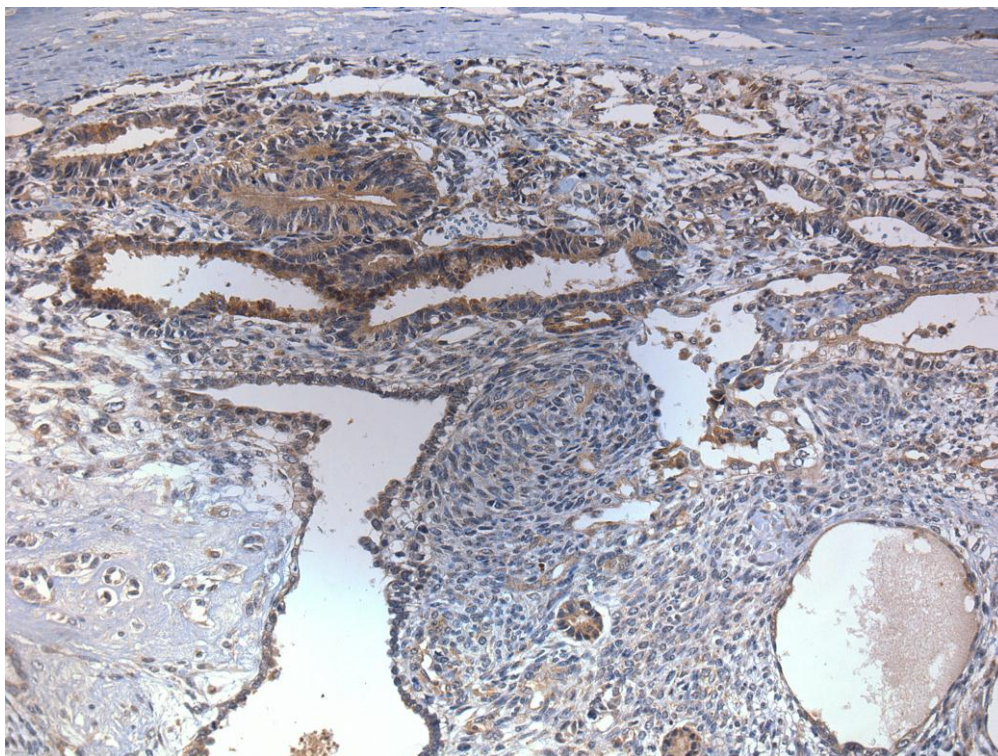


Figura 21 - Fotomicrografia de teratoma imaturo com expressão nuclear ausente de NANOG(aumento de 200X)

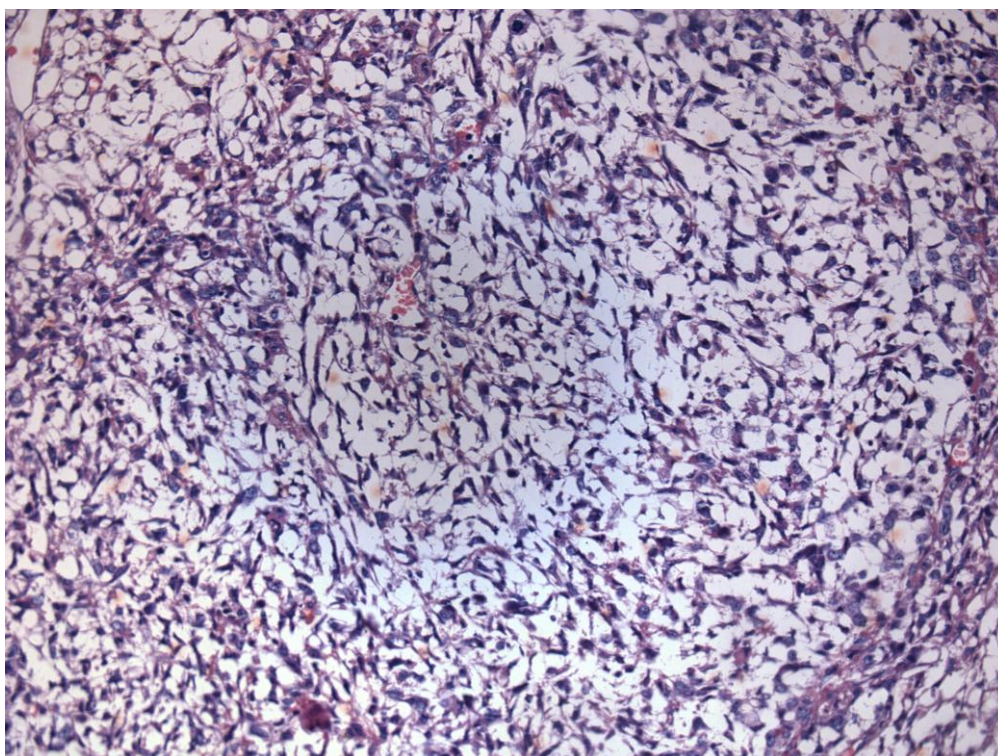


Figura 22 - Fotomicrografia de tumor de seio endodérmico em HE (aumento original de 200X)

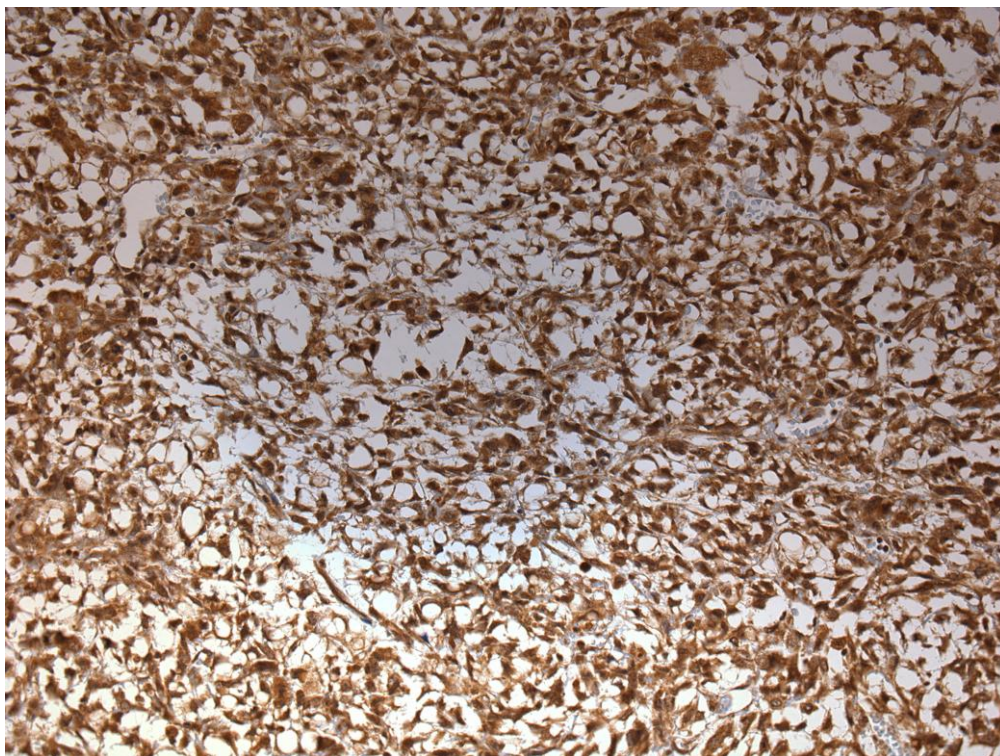


Figura 23 - Fotomicrografia de tumor de seio endodérmico com expressão elevada de CCND2 (aumento original de 200X)

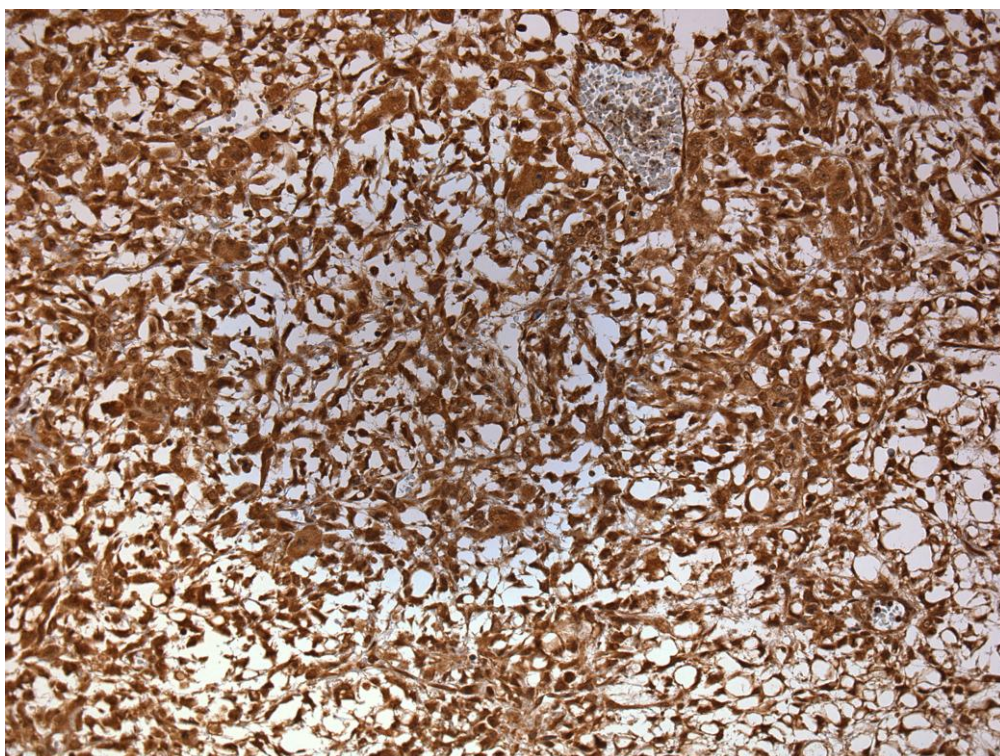


Figura 24 - Fotomicrografia de tumor de seio endodérmico com expressão elevada de DPPA4 (aumento de 200X)

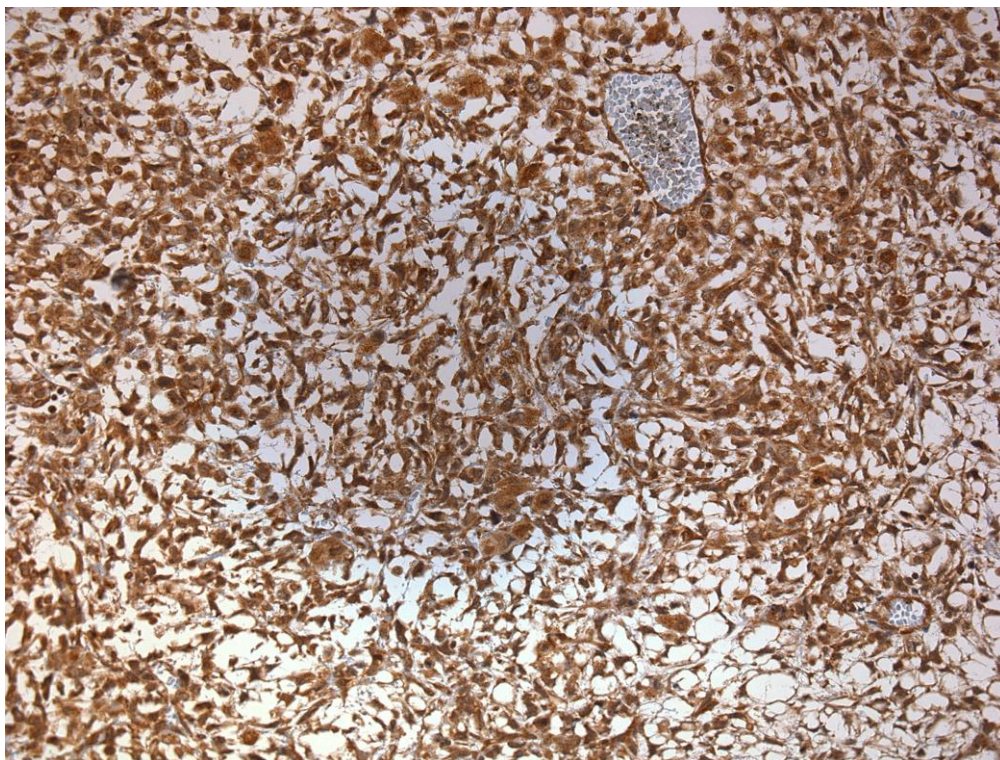


Figura 25 - Fotomicrografia de tumor de seio endodérmico com expressão nuclear reduzida de NANOG (aumento de 200X)

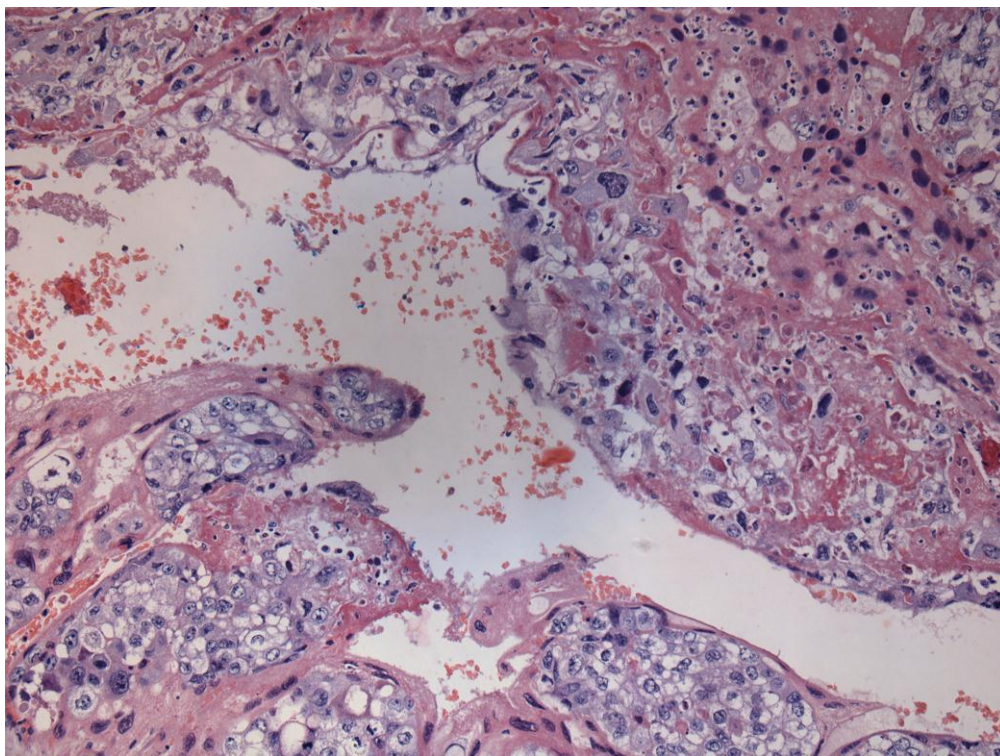


Figura 26 - Fotomicrografia de coriocarcinoma em HE (aumento original de 200X)

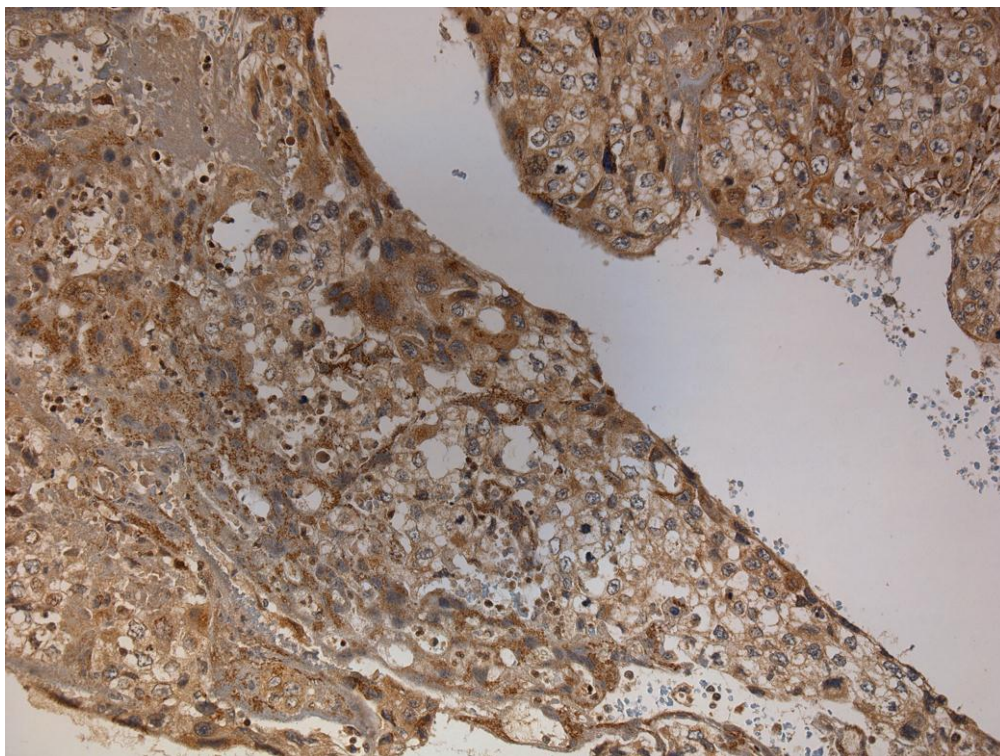


Figura 27 - Fotomicrografia de coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de CCND2(aumento de 200X)

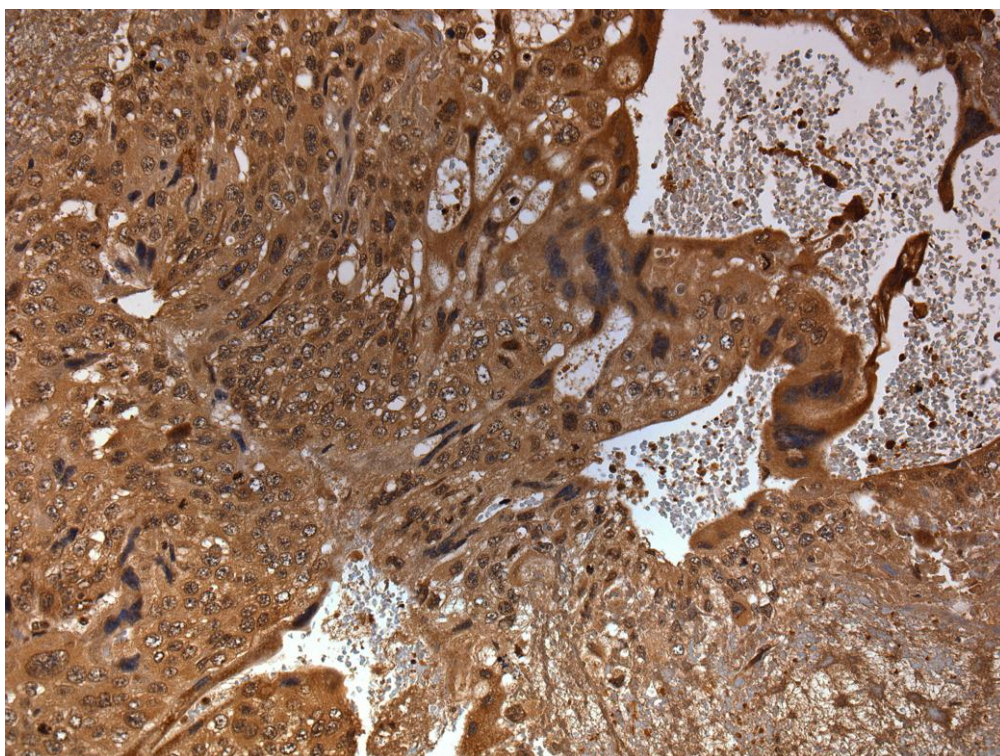


Figura 28 - Fotomicrografia de coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de DPPA4(aumento de 200X)

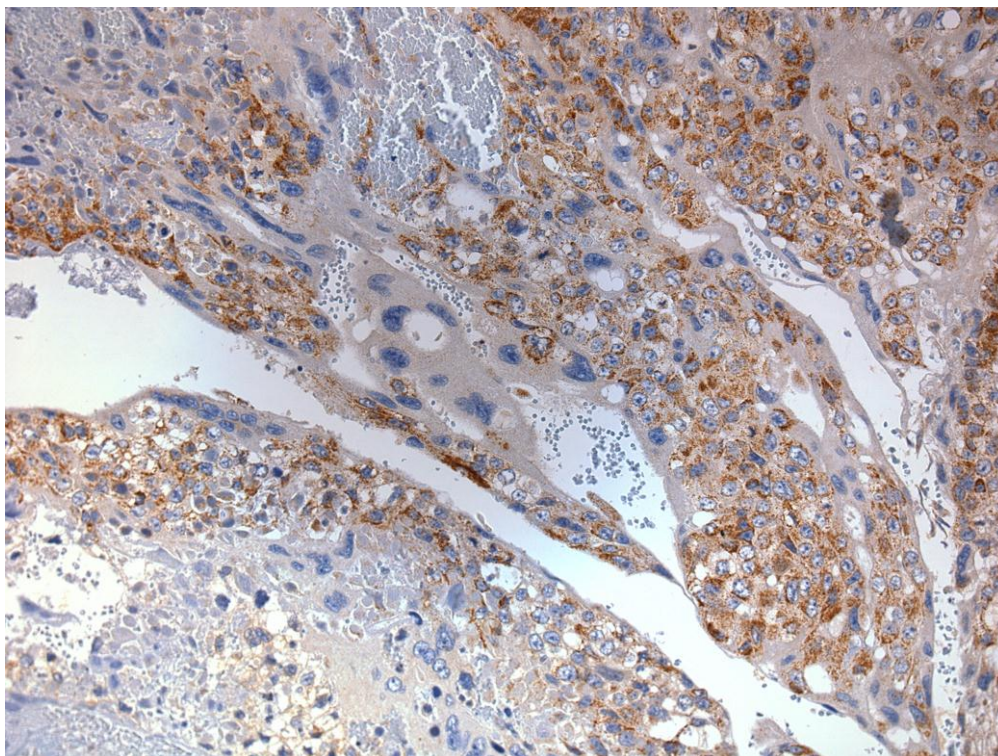


Figura 29 - Fotomicrografia de coriocarcinoma com expressão nuclear ausente de NANOG(aumento de 200X)

4.2.4 Risco de Metástases em Linfonodos

O risco de metástase para linfonodos retroperitoneais foi avaliado, através de análise univariada, no grupo submetido a LNR primária e no grupo submetido a LNR pós-quimioterapia de maneira individualizada.

Dentre as variáveis demográficas, clínicas e patológicas demonstradas na **Tabela 7**, as que se associaram de maneira estatisticamente significativa, com a presença de metástase em linfonodos retroperitoneais, na análise univariada, dos pacientes submetidos a LNR primária foram a presença de 50% ou mais do componente carcinoma embrionário ($p= 0,033$) e a ausência de tumor de seio endodérmico ($p=0,005$).

Tabela 7 - Distribuição das variáveis demográficas, patológicas e imunoistoquímicas de acordo com achado anatomopatológico da LNRP primária.

Variável	Categoria	AP LNRP		p-valor
		Negativo Freq. (%)	Positivo Freq.(%)	
Idade ≥ 30 anos	Não	2 (20,0)	5 (50,0)	0,500
	Sim	2 (20,0)	1 (10,0)	
Invasão microvascular	Não	2 (28,6)	5 (71,4)	0,500
	Sim	2 (66,7)	1 (33,3)	
Carcinoma embrionário (≥50%)	Não	3 (100,0)	0 (0,0)	0,033
	Sim	1 (14,3)	6 (85,7)	
Tumor de Seio Endodérmico	Ausente	0 (0,0)	6 (100,0)	0,005
	Presente	4 (100,0)	0 (0,0)	
CCND2	Baixa expressão	0 (0,0)	2 (100,0)	0,467
	Alta expressão	4 (50,0)	4 (50,0)	
DPPA4	Baixa expressão	0 (0,0)	2 (100,0)	0,467
	Alta expressão	4 (50,0)	4 (50,0)	
NANOG	Baixa expressão	1 (100,0)	0 (0,0)	NA*
	Alta expressão	3 (33,3)	6 (66,7)	

* Não avaliável estatisticamente.

Nenhuma das variáveis demográficas, clínicas e patológicas demonstradas na **Tabela 8**, se associaram de maneira estatisticamente significativa, com a presença de teratoma ou tumor viável em linfonodos retroperitoneais, na análise univariada, dos pacientes submetidos a LNRP pós-QT.

Tabela 8 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas, patológicas e imunoistoquímicas de acordo com achado anatomopatológico da LNRP pós-quimioterapia.

Variável	Categoria	AP LNRP		p-valor
		Fibrose/ Necrose Freq. (%)	Tumor viável/ Teratoma Freq. (%)	
Idade ≥ 30 anos	Não	5 (38,5)	8 (61,5)	> 0,999
	Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	
IGCCCG	Bom	5 (45,4)	6 (54,6)	> 0,999
	Intermediário +Ruim	2 (33,3)	4 (66,7)	
CCND2	Baixa expressão	5 (55,6)	4 (44,4)	0,335
	Alta expressão	2 (25,0)	6 (75,0)	
DPPA4	Baixa expressão	1 (33,3)	2 (66,7)	> 0,999
	Alta expressão	6 (42,9)	8 (57,1)	
NANOG	Baixa expressão	1 (20,0)	4 (80,0)	0,338
	Alta expressão	6 (50,0)	6 (50,0)	

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida Livre de Doença

A taxa de SLD, em 05 anos, da população estudada foi de 79,7%, como demonstrado na figura 30.

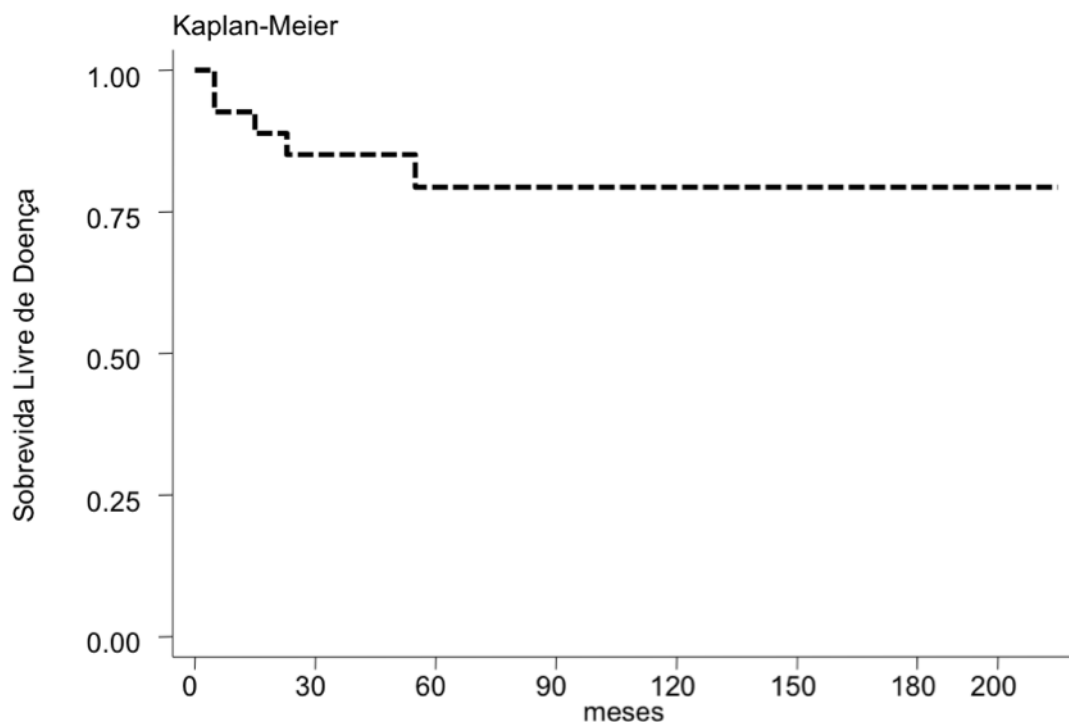


Figura 30 - Curva de Sobrevida livre de doença nos 27 casos de TCGTNS.

4.3.2 CCND2

A SLD avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de CCND2, **Figura 31**. Quando há alta expressão de CCND2 a probabilidade de SLD em 5 anos é de 74,5% e se a expressão está reduzida a taxa é de 86,7% , diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,275$).

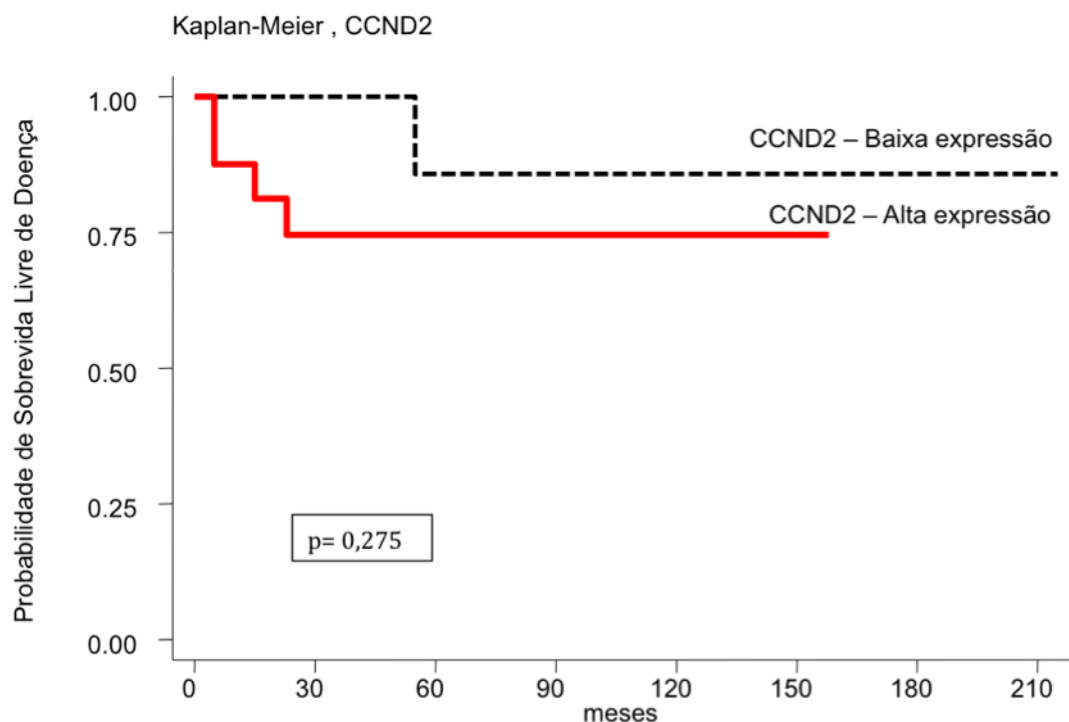


Figura 31 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunoistoquímica de CCND2.

4.3.3 DPPA4

A sobrevida livre de doença avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de DPPA4, Figura 32. Quando há alta expressão de DPPA4 a probabilidade de SLD em 5 anos é de 75,5% e se a expressão está reduzida a taxa é de 100,0% , diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,283$).

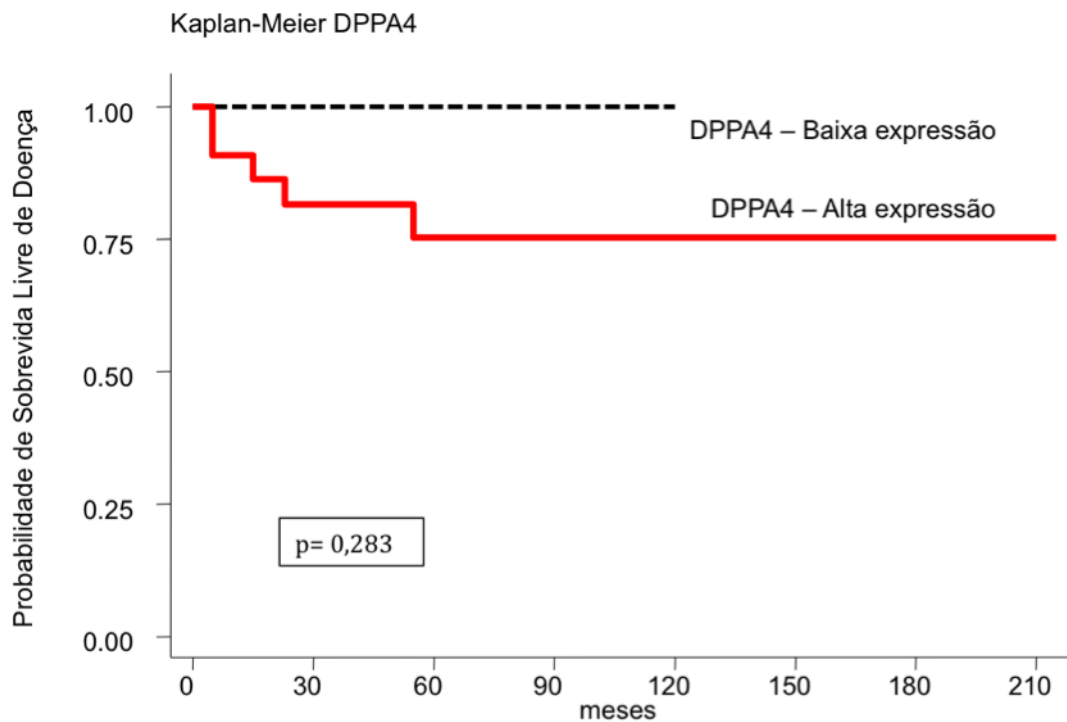


Figura 32 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunoistoquímica de DPPA4.

4.3.4 NANOG

A sobrevida livre de doença avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de NANOG, Figura 33. Quando há alta expressão de NANOG a probabilidade de SLD em 5 anos é de 74,2% e se a expressão está reduzida a taxa é de 100,0% , diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,219$).

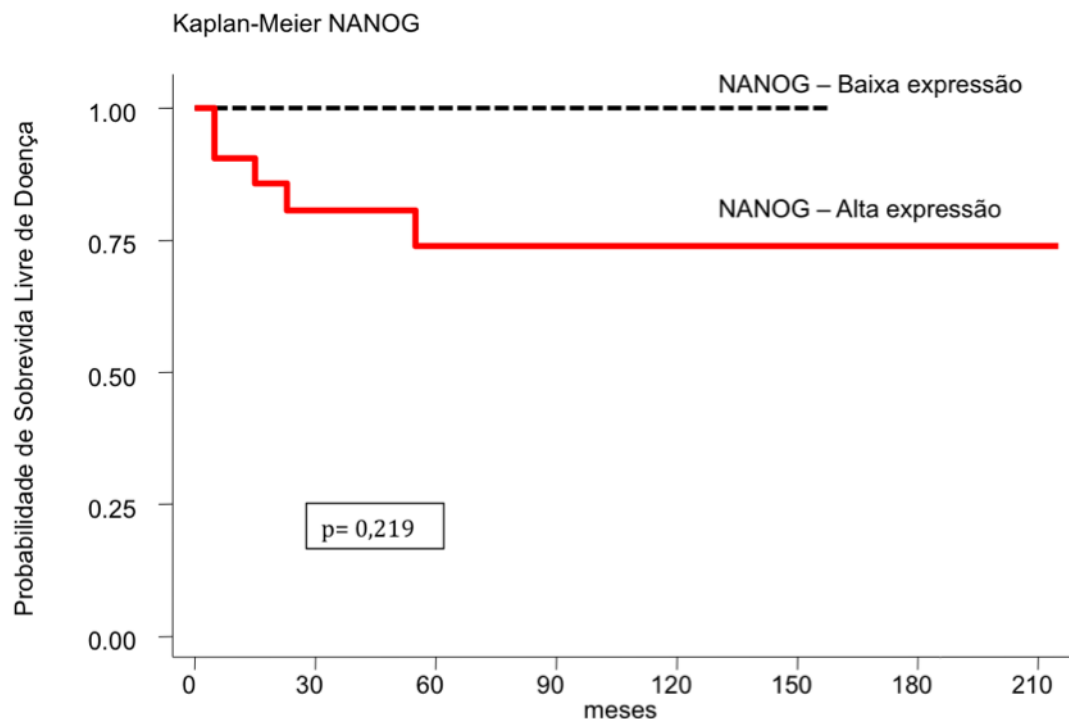


Figura 33 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a expressão imunohistoquímica de NANOG.

4.3.5 Sobrevida Global e Câncer Específica

Na população estudada a sobrevida global e câncer específica são coincidentes, uma vez que todos os óbitos foram em função da neoplasia.

A sobrevida global em 05 anos na população estudada foi de 88,4%, conforme demonstrado na Figura 34.

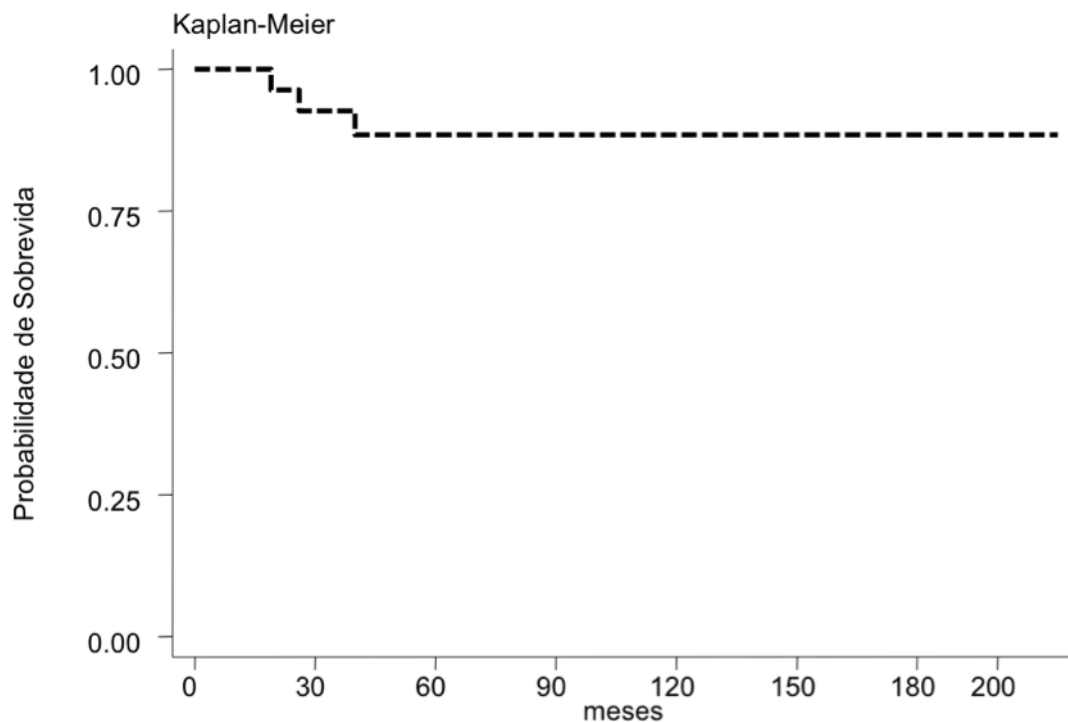


Figura 34 - Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS.

4.3.6 CCND2

A SCE avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de CCND2, (Figura 35). Quando há alta expressão de CCND2 a probabilidade de SCE em 5 anos é de 80,5% e se a expressão está reduzida a taxa é de 100,0%, diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,158$).

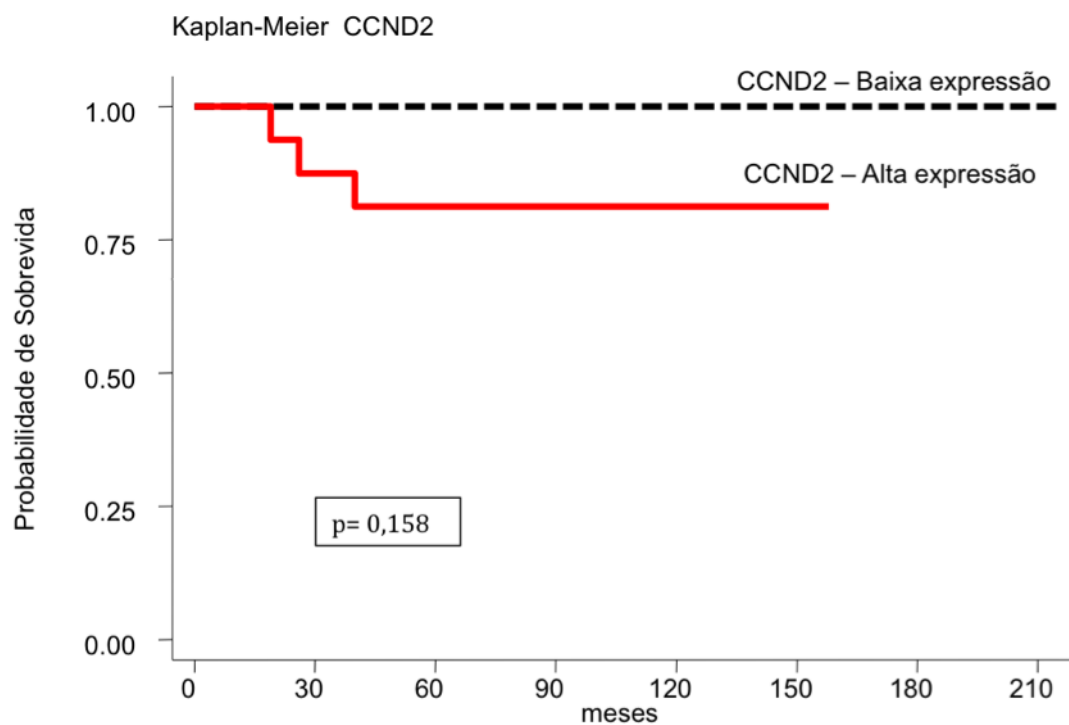


Figura 35 - Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de CCND2.

4.3.7 DPPA4

A SCE avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de DPPA4, (Figura 36). Quando há alta expressão de DPPA4 a probabilidade de SCE em 5 anos é de 85,9% e se a expressão está reduzida a taxa é de 100,0% , diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,430$).

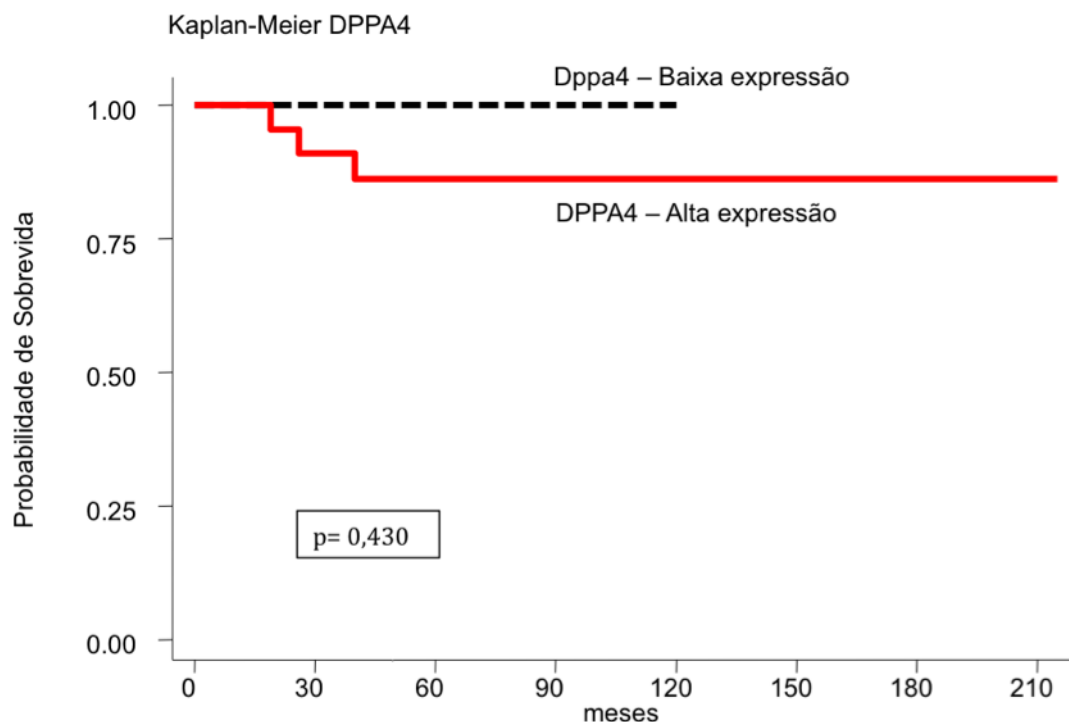


Figura 36 - Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de DPPA4.

4.3.8 NANOG

A SCE avaliada de acordo com a expressão imunoistoquímica de NANOG, Figura 37. Quando há alta expressão de NANOG a probabilidade de SCE em 5 anos é de 90,5% e se a expressão está reduzida a taxa é de 81,8%, diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,659$).

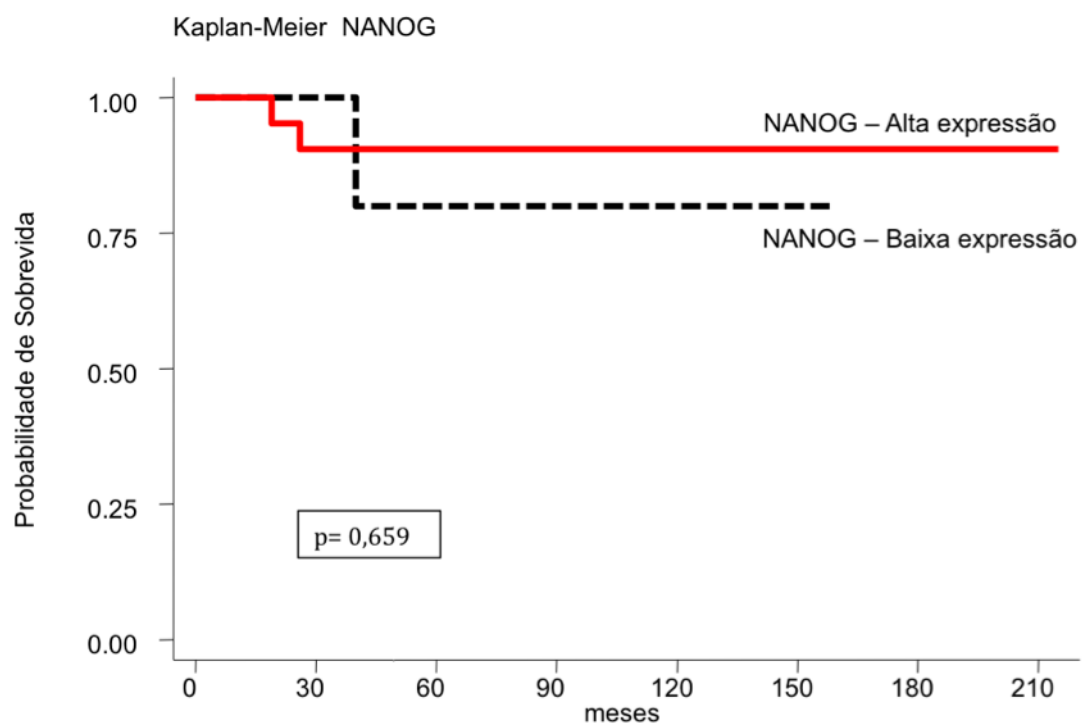


Figura 37 - Curva de sobrevida câncer específica nos pacientes portadores de TCGTNS de acordo com a expressão de NANOG.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

A neoplasia germinativa de testículos tem apresentado um aumento de sua incidência em países ocidentais nas últimas quatro décadas e estima-se que a incidência global tenha se duplicado nos últimos trinta anos (PARKIN 2005; CURADO 2007). Os estudos populacionais tem demonstrado que os paciente mais frequentemente acometidos tem entre 15 e 34 anos (PARKIN 2005; WU et al. 2005). Nossa amostra é composta de pacientes entre 17 e 41 anos, com média de 25,44 e mediana de 24 anos (dp=6,44), de maneira similar a de estudos internacionais.

Existe uma disparidade entre o acometimento de homens brancos e negros pela neoplasia germinativa do testículo. Os arquivos de estatística de câncer nos Estados Unidos da América(EUA), apresentam incidência de câncer testicular em brancos na taxa de 6,2 para cada 100.000 homens e uma incidência de 1,3 para cada 100.000 entre homens negros do mesmo país, no período de 1999 a 2004. Os estudos populacionais em sua grande parte foram realizados nos países nórdicos onde há incidência elevada dessa neoplasia, cerca de 9,6 em cada 100.000 homens, com população nativa composta por homens de cor branca. Em nossa casuística todos os pacientes eram da cor branca, compatível com a disparidade entre a incidência TCGT de acordo com a etnia encontrada na literatura.

A neoplasia testicular é insidiosa, apresenta poucos sintomas. Os tumores testiculares são normalmente descobertos após a palpação de nódulo pelo paciente ou

por sua parceria sexual. Raramente, os pacientes apresentam sintomas de dor testicular, hidrocele reacional ou sinais e sintomas de doença metastática como dores no dorso, ureterohidronefrose ou perda de peso. Cerca de 35% dos pacientes com neoplasia germinativa não seminomatosa são estadiados com doença avançada na investigação inicial (EDGE 2010). Em nosso estudo encontramos 51,85% de pacientes com estágio avançado ao diagnóstico inicial. Acreditamos que isso se deva ao fato de incluirmos somente pacientes submetidos a linfadenectomia retroperitoneal, excluindo de nossa casuística pacientes com doença de estágio I de baixo risco para metástases retroperitoneal inscritos em protocolo de vigilância e pacientes de estágio I de alto risco que optaram por realizar vigilância ou QT adjuvante.

Diversos estudos vêm tentando, ao longo dos anos, identificar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais nos pacientes portadores de neoplasia germinativa do testículo. Os fatores prognósticos patológicos relevantes para pacientes com TCGTNS de estágio I são a invasão vascular ou linfática peritumoral, a taxa de proliferação celular maior que 70% avaliada através da expressão imunoistoquímica de MIB-1, a presença de mais de 50% de carcinoma embrionário entre os componentes tumorais e ausência de tumor de seio endodérmico (FREEDMAN et al. 1987; ALBERS et al. 1995; ALBERS et al. 1997; ALBERS et al. 2003).

A presença de 50% ou mais de componente carcinoma embrionário em tumores mistos de células germinativa não seminoma, apresenta sensibilidade de 70,2%, valor preditivo negativo de 71,2%, valor preditivo positivo de 43,0% e acurácia de 53,9% como fator prognóstico para presença de metástases

retroperitoneais ocultas em pacientes de estágio clínico I, em estudo realizado em 200 homens alemães (ALBERS et al. 2003).

READ e STENNING et al. em 1992 validaram, em estudo multicêntrico com 373 pacientes, o sistema de estratificação de risco proposto em 1987 por FREEDMAN. Este sistema valoriza 4 fatores preditores de doença retroperitoneal oculta: invasão linfática, invasão vascular, presença de carcinoma embrionário e ausência de tumor do seio endodérmico (FREEDMAN et al. 1987; READ et al. 1992).

A invasão vasculolinfática tem sido relatada como fator prognóstico independente de maior relevância em pacientes com TCGTNS estágio I. No estudo do grupo colaborativo alemão, a presença de invasão vascular apresenta sensibilidade de 68,4%, valor preditivo negativo de 76,9%, valor preditivo positivo de 52,7% e acurácia de 65,1% (ALBERS et al. 2003).

Nosso estudo apresentou como fatores de risco relevantes, quanto a presença de metástases em linfonodos retroperitoneais em pacientes submetidos a LNRP primária, a presença de 50% ou mais do componente carcinoma embrionário (**p=0,033**) e a ausência de tumor de seio endodérmico (**p=0,005**). No entanto, a presença de invasão vascular neste grupo de pacientes não foi um fator significativo a análise univariada (**p=0,50**). O fato da invasão vascular não ser um fator prognóstico relevante em nossa casuística, deve-se ao fato da amostra de pacientes de estágio I submetidos a linfadenectomia retroperitoneal primária ser pequena e cerca de metade dos casos apresentarem doença retroperitoneal apesar da ausência de invasão vascular no tumor primário. Além disso, verificamos apenas 3 pacientes com invasão vascular, sendo que um com linfonodos retroperitoneais positivos, pelo reduzido

número, um único evento pode influenciar significativamente o resultado. Em contrapartida, nesta pequena amostra, seis dos dez pacientes no estágio I apresentavam 50% ou mais de carcinoma embrionário, sendo que seis apresentaram metástases linfonodais. Uma amostra maior talvez revelasse como na maioria das séries a importância da invasão vascular.

Reiteramos aqui a dificuldade de maior casuística, mesmo num centro de referência como o nosso, uma vez que o tumor testicular é raro, o não seminomatoso em estágio inicial menos frequente e devido as várias opções terapêuticas poucos pacientes optam pela LNRP primária, por escolha própria ou influenciados pelo médico que prestou o atendimento inicial. Alia-se a isto, o fato da orquiectomia radical ser procedimento simples, realizado em serviços menores com encaminhamento a grandes centros após a cirurgia. Por vezes isso dificulta a recuperação dos espécimes de tumores primários de testículo submetidos a LNRP em nosso serviço.

Os pacientes com tumores de estágio avançado inicialmente submetidos a QT e com tumor retroperitoneal residual não apresentam fatores prognósticos efetivos da presença de necrose, tumor viável ou teratoma. Cerca de 50% dos pacientes apresentam teratoma ou tumor viável em massa retroperitoneal maior que 1cm, sendo obrigatória a realização de linfadenectomia retroperitoneal frente a esta situação clínica (DONOHUE et al. 1987). STEYERBERG et al. (2003) propôs como fatores preditores de presença de necrose em tumor retroperitoneal residual a ausência de teratoma no tumor primário, dosagem de AFP normal prévio a quimioterapia, B-HCG normal, DHL elevado, tumor retroperitoneal de pequeno volume pré e/ou pós-quimioterapia e redução importante do tumor durante a QT. No

entanto, após a tentativa de validação externa do modelo proposto por Steyerberg, em estudo com 105 pacientes, chegou-se a conclusão de que o modelo tem pouca relevância clínica uma vez que apresenta limitações para determinar quem deve ser submetido a LNRP e quem deve ser observado.

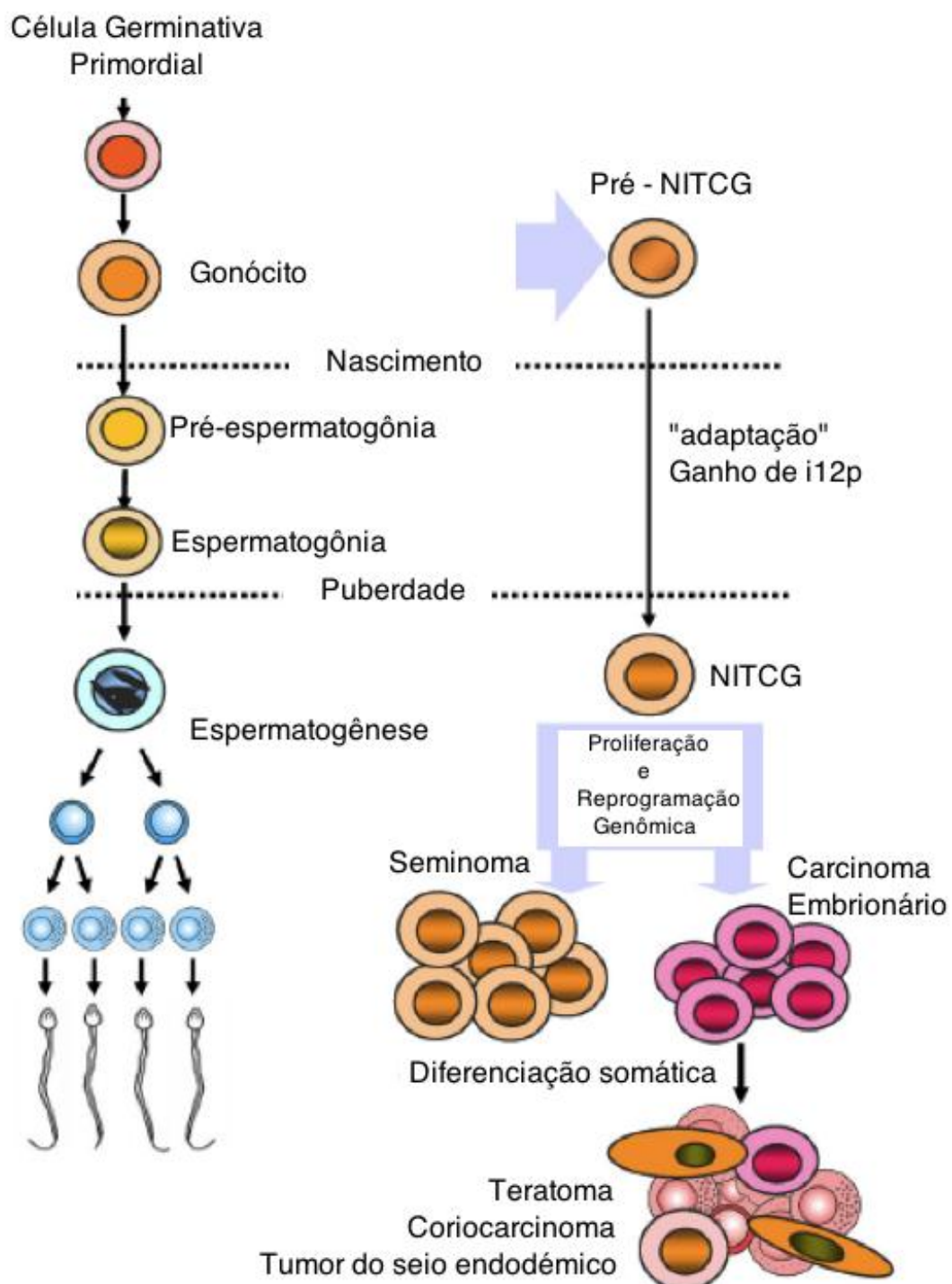
BECK et al. (2002), demonstraram que pode haver teratoma no retroperitônio em 48% dos pacientes sem teratoma no tumor testicular primário. FOSSA et al. (2003), mostrou em 87 casos de LNRP pós-QT para linfonodos menores que 2,0cm, presença de tumor viável em 6 casos (5 com linfonodo menor que 0,5cm) e de teratoma em 27 casos, sendo três já apresentando transformação maligna. Deste modo não há variáveis clínicas, patológicas ou laboratoriais que garantam a ausência de tumor viável ou teratoma nos linfonodos retroperitoneais.

Em consoância com a literatura, nenhuma das variáveis demográficas, clínicas e patológicas avaliadas em nosso estudo, se associaram de maneira estatisticamente significativa, com a presença de teratoma ou tumor de células germinativas viável em linfonodos retroperitoneais, na análise univariada, dos pacientes submetidos a LNRP pós-quimioterapia.

5.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

O ponto de partida celular para a maioria dos tumores de células germinativas do testículo é a NITCG, conforme demonstrado na Figura 38. A NITCG foi inicialmente descrita em 1972, por SKAKKEBAEK, sendo atualmente classificada como uma lesão precursora dos TCGT. A NITCG é composta por células malignas que possuem a habilidade de invadir os túbulos seminíferos na forma de tumores

sólidos do tipo seminoma ou não seminoma (SKAKKEBAEK 1972; OOSTERHUIS e LOOIJENGA 2005). Os tumores precursores de não seminoma, apresentam componente derivado de células-tronco embrionárias, que podem diferenciar-se em linhagens somáticas como teratoma e tecidos extra-embriônicos como tumor do seio endodérmico e coriocarcinoma (OOSTERHUIS e LOOIJENGA 2003).



Fonte: Adaptado de RAJPERT-DE MEYTS (2006)

Figura 38 - Modelo comparativo do desenvolvimento normal e tumoral da célula germinativa.

O processo tem início, quando as células germinativas primordiais migram do ectoderma primitivo para a crista genital. Estas células passam a ser denominadas gonócitos, iniciando o processo de maturação em pré-espermatogônia. Na fase de pré-espermatogônia ocorre perda da expressão de marcadores de totipotência, compatível com o fato de não haver a expressão de marcadores de células-tronco tumorais no tecido testicular normal do adulto (GASKELL et al. 2004; GASHAW et al. 2007).

No caso das células germinativas primordiais que sofrem transição para NITCG, devido a distúrbio do desenvolvimento germinativo normal, ocorre entre outros eventos o ganho de cópias do braço curto do cromossomo 12 (i12p). A presença desta alteração cromossômica ocorre na maioria das neoplasia de células germinativas e está relacionada a expressão de vários genes, a exemplo da CCND2 e NANOG (RODRIGUEZ et al. 2003). A expressão dos marcadores de pluripotência, nos tumores de células germinativas, se daria pela persistência de características exclusivas das células germinativas primordiais mesmo após transição para NITCG. A expressão de marcadores pluripotência está elevada em NITCG, seminoma e carcinoma embrionário (GILLIS et al. 2011; LOOIJENGA et al. 2011) o que corrobora a teoria das células-tronco tumorais e a participação da NITCG no desenvolvimento dos TCGTNS.

O carcinoma embrionário, após sofrer diferenciação somática, origina tumores mistos não seminoma compostos por teratoma, tumor do seio endodérmico e coriocarcinoma. Após a diferenciação há uma redução importante da expressão dos marcadores de pluripotência nos tumores diferenciados (GILLIS et al. 2011; LOOIJENGA et al. 2011).

5.2.1 NITCG

As células da NITCG apresentam características similares as células germinativas primordiais e aos gonócitos. Diversos estudos tem demonstrado a expressão elevada de marcadores de pluripotência como PLAP, CCND2, DPPA4, NANOG, OCT3/4 e SOX2 (JORGENSEN et al. 1995; LOOIJENGA et al. 2003; RAJPERT-DE MEYTS et al. 2004; SKOTHEIM et al. 2005; GILLIS et al. 2011).

Os marcadores de células-tronco tumorais (CCND2, DPPA4 e NANOG) avaliados em nosso estudo, apresentaram expressão imunoistoquímica mediana de 100% nos dez casos que apresentavam neoplasia intratubular adjacente ao TCGTNS. Este achado confirma a presença de características de célula-tronco nesses espécimes e apresenta concordância com a tendência expressa na literatura.

5.2.2 Componente Seminomatoso

Em nosso estudo, foram analisados somente tumores testiculares não seminomatosos. No entanto, o componente seminomatoso destes tumores foi avaliado de maneira individualizada, assim como, os demais subtipos histológicos, por estar presente em vários casos.

Inicialmente descrita em 1997, a correlação entre a expressão elevada de CCND2 e TCGT, através das análises protéica, gênica e imunoistoquímica em linhagens de tumores de testículo (HOULDSWORTH et al. 1997). BARTKOVA et al. em 1999, confirmaram a expressão elevada de CCND2 em tumores do tipo seminoma, através da análise de 16 casos de seminoma, sendo a expressão da CCND2 elevada em 81,25% dos casos. A expressão gênica de CCND2 foi avaliada em 23 casos de seminoma, por RT-PCR, sendo encontrada expressão aumentada na

maioria dos casos quando comparados a diversos tumores não germinativos (JURIC et al. 2005). Os estudos relatados não encontraram expressão de CCND2 em tecido testicular adulto não tumoral, motivo pelo qual abdicamos a realização de imunoistoquímica em tecido testicular adulto não tumoral.

Em nosso estudo, cinco casos apresentaram em sua composição componente seminoma, com uma expressão nuclear mediana de CCND2 de 90%.

A expressão de NANOG em seminoma, é similar a expressão elevada em células-tronco embrionárias e em células da NITCG (LOOIJENGA et al. 2003; Hoei-HANSEN et al. 2005; RAJPERT-DE MEYTS 2006; GILLIS et al. 2011). GASHAW et al. em 2007, avaliaram através de RT-PCR a expressão gênica em 40 espécimes de seminoma, sendo encontrada a expressão elevada de NANOG quando comparada a tecido testicular adulto normal. No entanto, não houve diferença na expressão de acordo com o estágio patológico pT1-3. Resultado semelhante ao encontrado em nossa amostra, que apresentou expressão elevada de NANOG em seminomas (mediana = 80%), sem variação da expressão de acordo com estágio TNM.

A literatura sobre a expressão de DPPA4 em seminomas é restrita a dois estudos realizados em 2005. Ambos estudos, avaliaram a perfil de expressão gênica (cDNA microarray e RT-PCR) de tumores de células germinativas comparados a outros tumores. JURIC et al. (2005) analisaram 25 casos de seminoma, enquanto SKOTHEIM et al. (2005) analisaram 03 linhagens de seminoma, os dois autores encontraram um aumento da expressão de DPPA4 nos TCGTS.

Nosso estudo é pioneiro na avaliação imunoistoquímica do marcador DPPA4 em tumores de células germinativas do testículo. A expressão imunoistoquímica de DPPA4 em seminoma, apresentou mediana de 100%. Expressão imunoistoquímica

comparável ao descrito previamente na literatura em estudos de perfil de expressão gênica. Fato que abre uma alternativa na avaliação de DPPA4, demonstrando a viabilidade da avaliação da expressão imunoistoquímica de DPPA4 em TCGT. Esse fato pode ser relevante na prática clínica, pois a imunoistoquímica está disponível para laboratórios convencionais de anatomia patológica. Como os seminomas em sua grande maioria não expressam marcadores séricos, alternativas práticas para elucidação de dúvida diagnóstica são bem vindas.

5.2.3 Carcinoma Embrionário

O carcinoma embrionário tumor maligno derivado de células-tronco embrionárias, apresenta na literatura diversos estudos que demonstram a expressão elevada de marcadores de pluripotencialidade (BARTKOVA et al. 2003; CHAMBERS et al. 2003; SKOTHEIM et al. 2005; GILLIS et al. 2011).

O estudo de 11 casos de carcinoma embrionário demonstrou expressão elevada de CCND2 em 81,25% dos casos (BARTKOVA et al. 1999). SKOTHEIM et al. (2005) avaliaram 5 espécimes de carcinoma embrionário de maneira comparativa com outros tumores de origem germinativa, encontrando a expressão elevada de DPPA4 e NANOG nestas amostras. Recentemente, GILLIS et al. (2011) avaliaram a maior amostra publicada com 50 casos de carcinoma embrionário demonstrando a forte expressão de NANOG seguida da perda de expressão quando da diferenciação somática em teratoma, tumor de seio endodérmico e coriocarcinoma.

A avaliação de 20 casos de carcinoma embrionário, em nosso estudo, encontrou expressão mediana elevada dos marcadores CCND2, DPPA4 e NANOG, respectivamente, 70% , 80% e 100%. A expressão dos marcadores analisados, vai de

encontro ao descrito na literatura e ao modelo de desenvolvimento dos TCGT proposto por RAJPERT-DE MEYTS em 2006, aonde esse tipo histológico se apresenta com possível potencial de desenvolvimento de outras histologias, característica compatível com sua pluripotencialidade.

5.2.4 Tumor de Seio Endodérmico, Teratoma e Coriocarcinoma

O carcinoma embrionário, pode diferenciar-se em linhagens somáticas como teratoma imaturo, teratoma maduro e tecidos extra-embriônicos como tumor do seio endodérmico e coriocarcinoma.

A expressão dos marcadores de pluripotência apresenta regulação descendente após a diferenciação somática que dá origem a estes tumores (LOOIJENGA et al. 2003; HOEI-HANSEN et al. 2005; GILLIS et al. 2011). Estudos recentes propõe que apesar de haver perda de alguns marcadores de pluripotência nesta fase, alguns marcadores recentemente descritos como LIN28, SOX2 e SOX17 (GILLIS et al. 2011) apresentam marcação que persiste a fase de diferenciação somática, ou seja, as células ainda teriam características de células tronco tumorais apesar da perda de alguns genes, como o NANOG e a CCND2.

Estudos que avaliaram a expressão gênica de DPPA4 em TCGT não encontraram expressão relevante em tumores do tipo teratoma, tumor de seio endodérmico e coriocarcinoma (JURIC et al. 2005; SKOTHEIM et al. 2005). A expressão imunoistoquímica de DPPA4 diverge dos resultados de expressão gênica de outros estudos. A expressão imunoistoquímica mediana encontrada foi de 50% no teratoma maduro, 70% no teratoma imaturo, 100% no tumor de seio endodérmico e 40% no coriocarcinoma. Há poucos estudos na literatura sobre o DPPA4 nos tumores

de células germinativas do testículo. Acreditamos que o DPPA4, a exemplo de outros marcadores como o SOX2, SOX17 e LIN28 persiste após a fase de diferenciação somática. O que não ocorre com a CCND2 e o NANOG.

Nossos resultados quanto a expressão de CCND2 e NANOG nestes tumores foi similar a encontrada na literatura. A expressão de CCND2 em teratoma maduro apresentou uma mediana de 50%, e a expressão mediana em teratoma imaturo foi 10%. O tumor do seio endodérmico e o coriocarcinoma não apresentaram expressão do marcador, a exceção de 1 caso de tumor de seio endodérmico.

Os resultados quanto a expressão de NANOG nestes tumores é ausente no teratoma imaturo, teratoma maduro, tumor de seio endodérmico e coriocarcinoma. Dado que contrasta com a alta expressão encontrada na NITCG (100%), no carcinoma embrionário (100%) e no seminoma (80%).

Estudo recente, avaliou o grau de metilação nos diversos subtipos tumorais e a expressão dos marcadores de pluripotência. A metilação do DNA é um processo que pode alterar a função normal de um gene. Tumores indiferenciados de células germinativas do testículo (NITCG, seminoma e carcinoma embrionário) são hipometilados, em contra partida os tumores diferenciados (teratomas, tumor de seio endodérmico e coriocarcinoma) apresentam um maior grau de metilação. O grau de metilação, em tumores de células germinativas, determina a perda da expressão de genes presentes no isocromossomo 12 (i12p). Nesse estudo in vitro, após demetilação com 5-azacytidina as células de linhagens de tumores diferenciados voltaram a expressar os marcadores NANOG e OCT4 e passaram a apresentar menor resistência a cisplatina (WERMANN et al. 2010).

Provavelmente, as células do carcinoma embrionário no processo de transição

para tumores diferenciados sofrem a ação da metilação entre outros eventos perdendo a expressão dos marcadores de células tronco CCND2 e NANOG.

5.3 ANÁLISE DE RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

Para a análise do risco de metástase em linfonodos retroperitoneais foram avaliados além dos parâmetros clínico-demográficos e anatomopatológicos do tumor primário, já discutido nos aspectos gerais, a imunorreatividade para CCND2, DPPA4 e NANOG.

Na literatura não há estudos tentando correlacionar a expressão de marcadores de células-tronco tumorais com a presença de metástases linfonodais. Entre os marcadores estudados buscando prever a presença de metástase oculta em linfonodos retroperitoneais, o marcador de maior notoriedade é o MIB-1/ Ki-67. O MIB-1 , avalia a proliferação celular, na presença de 70% ou mais de sua expressão em tumores testiculares não seminomatosos de estágio I, segundo Albers et al em 1995, estaria relacionado a presença de doença retroperitoneal. No entanto, ressaltamos que os TCGTNS em sua maioria são mistos o que dificultou muito a avaliação dos marcadores de células tronco tumorais em nosso estudo. Em análise detalhada dos estudos que avaliaram a expressão de MIB-1 notamos que em estudo inicial em 1995, Albers et al., foi analisada a expressão de MIB-1 em 10 campos sob aumento de 400X sendo descartadas as áreas de componente seminomatoso, elementos teratomatosos ou tecido estromal. Sendo assim , a avaliação basicamente se fez nas áreas de carcinoma embrionário. Em 1997, Albers et al., descrevem a avaliação de 78 tumores testiculares não seminomatosos, como critério para

avaliação imunoistoquímica de MIB-1 quando possível a expressão foi avaliada somente nas áreas de carcinoma embrionário e em 13 casos (12 teratomas puros e 1 tumor de seio endodérmico) onde este componente estava ausente foram avaliadas áreas com maior reatividade ao marcador não se levando em conta as regiões de estroma testicular. Por fim em 2003, Albers et al, em estudo multicêntrico do grupo alemão de cancer testicular foram avaliados 200 TCGTNS. Nesse estudo, os autores descrevem que avaliação da expressão de MIB-1 foi realizada preferencialmente nas áreas de carcinoma embrionário e que na sua ausência o marcador foi avaliado nos demais componentes do tumor não seminomatoso, mas não descreve de maneira explícita os achados nesses componentes. Descrevem ainda que a avaliação patológica foi realizada pelo mesmo patologista das séries anteriormente publicadas, mas quando comparada a avaliação com um segundo patologista houve discordância entre a porcentagem de expressão, determinando 20% de diferença na definição se o caso estava acima ou abaixo do cut-off de 70%.

Transpondo as dificuldades que encontramos na avaliação patológica de tumores mistos devido a expressão diversa de acordo com o subtipo histológico avaliado, acreditamos que a expressão de MIB-1 pode não ser relevante na predição de doença retroperitoneal, uma vez que a expressão foi avaliada essencialmente em áreas de carcinoma embrionário e sabemos que o volume de carcinoma embrionário no tumor é um fator prognóstico para metástase linfonodal. Além de que a reprodução do estudo com MIB-1 ou mesmo seu uso na prática clínica parece ser inviável, uma vez que a discordância entre dois patologistas com experiência em avaliar a expressão do marcador foi significativa ao ponto de mudar a classificação do tumor em 20% das vezes.

Em nosso estudo, o risco de metástase para linfonodos retroperitoneais foi avaliado, de maneira individualizada no grupo submetido a LNRP primária e no grupo submetido a LNRP pós-quimioterapia.

Nos pacientes submetidos a LNRP primária, a expressão imunoistoquímica de CCND2, DPPA4 e NANOG não se correlacionou ao achado anatomopatológico da LNRP, bem como a expressão destes marcadores também não apresentou relevância em prever o achado de doença retroperitoneal residual nos pacientes submetidos a LNRP pós-QT.

5.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

5.4.1 Sobrevida Livre de Doença

A SLD em cinco anos de maneira geral foi de 79,7%.

Quando houve alta expressão de CCND2 a probabilidade de SLD em 5 anos foi de 74,5% e se a expressão estava reduzida a taxa foi de 86,7% , diferença que não foi estatisticamente significativa ($p=0,275$), mas que demonstra tendência de ganho na SLD nos pacientes com baixa expressão do marcador.

Quando houve alta expressão de DPPA4 a probabilidade de SLD em 5 anos foi de 75,5% e se a expressão estava reduzida a taxa foi de 100,0%, diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,283$).

Na presença de alta expressão de NANOG a probabilidade de SLD em 5 anos foi de 74,2% e se a expressão estava reduzida a taxa foi de 100,0%, diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,219$).

Na expressão reduzida de DPPA4 ou de NANOG houve tendência de ganho na SLD uma vez que a probabilidade de SLD em 5 anos nesse grupo foi de 100% e a SLD global foi de 79,7%. Acreditamos que o tamanho da amostra pode ter impossibilitado a confirmação estatística dessa tendência.

5.4.2 Sobrevida Global e Câncer Específica

Na população estudada a SG e SCE são coincidentes, uma vez que todos os óbitos foram em função da neoplasia. A sobrevida câncer específica foi de 88,4%.

Na presença de expressão elevada de NANOG a probabilidade de SCE em 5 anos foi de 90,5% e se a expressão estava reduzida de 81,8%, diferença sem relevância estatística ($p=0,659$).

Quando houve expressão elevada de CCND2 a probabilidade de SCE em 5 anos foi de 80,5% e se a expressão estava diminuída a taxa foi de 100,0%, diferença que não é estatisticamente significativa ($p=0,158$).

Na alta expressão de DPPA4 a probabilidade de SCE em 5 anos foi de 85,9% e se a expressão estava reduzida a taxa foi de 100,0%, não atingindo relevância estatística ($p=0,430$).

Na expressão reduzida de CCND2 ou de DPPA4 houve tendência de ganho na SCE uma vez que a probabilidade de SCE em 5 anos nesse grupo foi de 100% e a SCE global foi de 88,4%. Para todos os marcadores avaliados, a expressão reduzida pareceu se aproximar de melhores taxas de sobrevida, com exceção a SG quando analisada pela expressão de NANOG, na qual de modo invertido a alta expressão tendeu a melhor sobrevida, mas ressaltamos, sem validação estatística. Porém notamos que NANOG foi pouco expresso nos casos com elementos teratomatosos, e

hoje sabemos que a maior parte das LNRPs para massas residuais pós-QT se dão devido a teratoma. Além disso o coriocarcinoma, componente misto de lesões de alta letalidade não expressa NANOG, portanto esse marcador parece não ser útil em futuras investigações nesta situação clínica. O fato de os TCGTNS serem altamente curáveis, em sua maioria, seja por abordagem cirúrgica ou quimioterapia baseada em platina influi positivamente sobre o pequeno número de mortes câncer específicas e associado ao tamanho da amostra, possa ter determinado a ausência de relevância estatística da tendência a melhor SCE dos pacientes com expressão diminuída de CCND2 ou DPPA4.

A limitação de casuística se dá aqui também, por atualmente muitos casos com resolução completa das lesões retroperitoneais serem poupados da LNR.

Nesses pacientes as classificações de risco internacional como a do IGCCCG permanecem com prognósticos significativos de sobrevida.

Após a avaliação do emprego dos marcadores CCND2, NANOG e DPPA4 em TCGTNS para a predição de doença linfonodal ou desfecho clínico desencorajamos o uso na rotina ou em futuras investigações com intenção de avaliação prognóstica devido a expressão heterogênea dos marcadores nos tumores mistos. A expressão segue um padrão de acordo com o subtipo histológico cada qual com a sua expressão. A marcação tende a ser extremada, ou seja, quando há expressão geralmente é muito elevada não distinguindo os casos que tem pior evolução ou doença retroperitoneal dos casos que não necessitam de tratamento complementar.

6 CONCLUSÕES

- A expressão imunoistoquímica dos marcadores CCND2, DPPA4 e NANOG não conseguiu predizer a presença de doença metastática em linfonodos retroperitoneais.
- A expressão imunoistoquímica dos marcadores de células-tronco tumorais CCND2, DPPA4 e NANOG no tumor primário de pacientes portadores de TTCGNS submetidos a orquiectomia radical e ulterior linfadenectomia retroperitoneal não teve impacto sobre a SLD, SCE ou SG.
- Não houve expressão imunoistoquímica de CCND2 em coriocarcinoma.
- Não houve expressão imunoistoquímica de NANOG em teratoma maduro, teratoma imaturo e coriocarcinoma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymus]. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. **J Clin Oncol** 1997; 15:594-603.

Abern MR, Dude AM, Coogan CL. Marital status independently predicts testis cancer survival-an analysis of the SEER database. **Urol Oncol** 2010 Sep 25. [Epub ahead of print]

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-8.

Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al. Guidelines on testicular cancer. **Eur Urol** 2005; 486:885-94.

Albers P, Bierhoff E, Neu D, Fimmers R, Wernert N, Müller SC. MIB-1 immunohistochemistry in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors predicts patients at low risk for metastasis. **Cancer** 1997; 79:1710-16.

Albers P, Miller GA, Orazi A, et al. Immunohistochemical assessment of tumor proliferation and volume of embryonal carcinoma identify patients with clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumor at low risk for occult metastasis. **Cancer** 1995; 75:844-50.

Albers P, Orazi A, Ulbright TM, et al. Prognostic significance of immunohistochemical proliferation markers (Ki-67/MIB-1 and proliferation-associated nuclear antigen), p53 protein accumulation, and neovascularization in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. **Mod Pathol** 1995; 8:492-7.

Albers P, Siener R, Kliesch S, et al. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. **J Clin Oncol** 2003; 21:1505-12.

Albers P, Siener R, Krege S, et al. Randomized phase III trial comparing retroperitoneal lymph node dissection with one course of bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I Nonseminomatous testicular germ cell tumors: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. **J Clin Oncol** 2008; 26:2966-72.

Albers P, Ulbright TM, Albers J, et al. Tumor proliferative activity is predictive of pathological stage in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. **J Urol** 1996; 155:579-86.

Atkin NB, Baker MC. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? **Lancet** 1982; 2:1349.

Bartkova J, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. D-type cyclins in adult human testis and testicular cancer: relation to cell type, proliferation, differentiation, and malignancy. **J Pathol** 1999; 187:573-81.

Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. **APMIS** 2003; 111:252-65; discussion 265-6.

Beck SD, Foster RS et al. Teratoma in orchiectomy specimen and volume of metastasis are predictors of retroperitoneal teratoma in post-chemotherapy nonseminomatous testis cancer. **J Urol** 2002; 168:1402-04.

Beck SD, Bey AL, Bihrlé R, Foster RS. Ejaculatory status and fertility rates after primary retroperitoneal lymph node dissection. **J Urol** 2010; 184:2078-80.

Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. **J Cell Physiol** 2006; 209:883-93.

Benson RC Jr, Beard CM, Kelalis PP, Kurland LT. Malignant potential of the cryptorchid testis. **Mayo Clin Proc** 1991; 66:372-8.

Bianchi G, Beltrami P, Giusti G, Tallarigo C, Mobilio G. Unilateral laparoscopic retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular neoplasm. **Eur Urol** 1998; 33:190-4.

Birch R, Williams S, Cone A, et al. Prognostic factors for favorable outcome in disseminated germ cell tumors. **J Clin Oncol** 1986; 4:400-7.

Böhlen D, Borner M, Sonntag RW, Fey MF, Studer UE. Long-term results following adjuvant chemotherapy in patients with clinical stage I testicular nonseminomatous malignant germ cell tumors with high risk factors. **J Urol** 1999; 161:1148-52.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 1997; 3:730-7.

Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. **Development** 2003; 130:1673-80.

Bosl GJ, Geller NL, Cirrincione C, et al. Multivariate analysis of prognostic variables in patients with metastatic testicular cancer. **Cancer Res** 1983; 43:3403-7.

Bosl, G. J. and R. J. Motzer (). Testicular germ-cell cancer. **N Engl J Med** 1997; 337:242-53.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell** 2005; 122:947-56.

Boyle P, Zaridze DG. Risk factors for prostate and testicular cancer. **Eur J Cancer** 1993; 29A:1048-55.

Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Møller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. **Int J Cancer** 2006; 118:3099-111.

Cao D, Humphrey PA, Allan RW. SALL4 is a novel sensitive and specific marker for metastatic germ cell tumors, with particular utility in detection of metastatic yolk sac tumors. **Cancer** 2009; 115:2640-51.

Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1065-77.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ** 1992; 305:609-13.

Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell** 2003; 113:643-55.

Cheng L. Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT4 immunohistochemistry. **Cancer** 2004; 101:2006-10.

Chevreau C, Mazerolles C, Soulié M, et al. Long-term efficacy of two cycles of BEP regimen in high-risk stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors with embryonal carcinoma and/or vascular invasion. **Eur Urol** 2004; 46:209-14; discussion 214-5.

Chilvers C, Dudley NE, Gough MH, Jackson MB, Pike MC. Undescended testis: the effect of treatment on subsequent risk of subfertility and malignancy. **J Pediatr Surg** 1986; 21:691-6.

Clark AT. The stem cell identity of testicular cancer. **Stem Cell Rev** 2007; 3:49-59.

Colls BM, Harvey VJ, Skelton L, et al. Late results of surveillance of clinical stage I nonseminoma germ cell testicular tumours: 17 years' experience in a national study in New Zealand. **BJU Int** 1999; 83:76-82.

Colls BM, Harvey VJ, Skelton L, Thompson PI, Frampton CM. Bilateral germ cell testicular tumors in New Zealand: experience in Auckland and Christchurch 1978-1994. **J Clin Oncol** 1996; 14:2061-5.

Culine S, Kerbrat P, Kramar A, et al. Refining the optimal chemotherapy regimen for good-risk metastatic nonseminomatous germ-cell tumors: a randomized trial of the Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers (GETUG T93BP). **Ann Oncol** 2007; 18:917-24.

Cullen MH, Stenning SP, Parkinson MC, et al. Short-course adjuvant chemotherapy in high-risk stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: a Medical Research Council report. **J Clin Oncol** 1996; 14:1106-13.

Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. **Cancer incidence in the five continents**. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007. (IARC Scientific Publications No. 160)

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:10158-63.

de Jong J, Stoop H, Dohle GR, et al. Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. **J Pathol** 2005; 206:242-9.

de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. **J Pathol** 2008; 215:21-30.

de Wit R, Stoter G, Sleijfer DT, et al. Four cycles of BEP vs four cycles of VIP in patients with intermediate-prognosis metastatic testicular non-seminoma: a randomized study of the EORTC Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. **Br J Cancer** 1998; 78:828-32.

DeCastro BJ, Peterson AC, Costabile RA. A 5-year followup study of asymptomatic men with testicular microlithiasis. **J Urol** 2008; 179:1420-3; discussion 1423.

Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. **World J Urol** 2004; 22:2-14.

Donohue JP, Rowland RG, Kopecky K, et al. Correlation of computerized tomographic changes and histological findings in 80 patients having radical retroperitoneal lymph node dissection after chemotherapy for testis cancer. **J Urol** 1987; 137:1176-9.

Donohue JP, Thornhill JA, Foster RS, Bihrlé R, Rowland RG, Einhorn LH. The role of retroperitoneal lymphadenectomy in clinical stage B testis cancer: the Indiana University experience (1965 to 1989). **J Urol** 1995; 153:85-9.

Donohue JP, Thornhill JA, Foster RS, Rowland RG, Bihrlé R. Clinical stage B non-seminomatous germ cell testis cancer: the Indiana University experience (1965-1989) using routine primary retroperitoneal lymph node dissection. **Eur J Cancer** 1995; 31A:1599-604.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press, 2004. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 6).

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti. **AJCC cancer staging manual**. 7 ed. New York: Springer-Verlag, 2009. Testis; p.469-73.

Ekbom A, Richiardi L, Akre O, Montgomery SM, Sparén P. Age at immigration and duration of stay in relation to risk for testicular cancer among Finnish immigrants in Sweden. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1238-40.

Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. **Cancer** 2005; 104:2255-65.

Fang, D., Nguyen TK, et al. (). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Res** 2005; 65:9328-37.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. Frequent overexpression of cyclin D2/cyclin-dependent kinase 4 in Wilms' tumor. **Cancer Lett** 2005; 221:67-75.

Fosså SD, Oldenburg J, et al. Postchemotherapy retroperitoneal surgery remains necessary in patients with nonseminomatous testicular cancer and minimal residual masses. **J Clin Oncol** 2003; 21:3310-7

Fosså SD, Chen J, Schonfeld SJ, et al. Risk of contralateral testicular cancer: a population-based study of 29,515 U.S. men. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1056-66.

Fosså SD, Cvancarova M, Chen L, et al. Adverse prognostic factors for testicular cancer-specific survival: a population-based study of 27,948 patients. **J Clin Oncol** 2011; 29:963-70.

Fosså SD, Ous S, Lien HH, Stenwig AE. Post-chemotherapy lymph node histology in radiologically normal patients with metastatic nonseminomatous testicular cancer. **J Urol** 1989; 141:557-9.

Foster RS, Roth BJ. Clinical stage I nonseminoma: surgery versus surveillance. **Semin Oncol** 1998; 25:145-53.

Freedman LS, Parkinson MC, Jones WG, et al. Histopathology in the prediction of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone. **Lancet** 1987; 2:294-8.

Ganmaa D, Li XM, Wang J, Qin LQ, Wang PY, Sato A. Incidence and mortality of testicular and prostatic cancers in relation to world dietary practices. **Int J Cancer** 2002; 98:262-7.

Garner MJ, Birkett NJ, Johnson KC, et al. Dietary risk factors for testicular carcinoma. **Int J Cancer** 2003; 106:934-41.

Gashaw I, Dushaj O, Behr R, et al. Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. **Mol Hum Reprod** 2007; 13:721-7.

Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. **Biol Reprod** 2004; 71:2012-21.

Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziie HR, et al. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. **World J Gastroenterol** 2008; 14:6376-81.

Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. **Int J Androl** 2011 Jun 2. [Epub ahead of print]

Giwerzman A, Grindsted J, Hansen B, Jensen OM, Skakkebaek NE. Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study. **J Urol** 1987; 138:1214-16.

Hart AH, Hartley L, Parker K, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. **Cancer** 2005; 104:2092-8.

Hatano SY, Tada M, Kimura H, et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. **Mech Dev** 2005; 122:67-79.

Hemminki, K. and B. Chen (). Familial risks in testicular cancer as aetiological clues. **Int J Androl** 2006; 29:205-10.

Hemminki K, Chen B. Cancer risks in Nordic immigrants and their offspring in Sweden. **Eur J Cancer** 2002; 38:2428-34.

Hendry WF, Norman A, Nicholls J, Dearnaley DP, Peckham MJ, Horwich A. Abdominal relapse in stage 1 nonseminomatous germ cell tumours of the testis managed by surveillance or with adjuvant chemotherapy. **BJU Int** 2000; 86:89-93.

Herrinton LJ, Zhao W, Husson G. Management of cryptorchism and risk of testicular cancer. **Am J Epidemiol** 2003; 157:602-5.

Hoei-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, et al. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. **Histopathology** 2005; 47:48-56.

Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. **J Pathol** 2004; 203:849-57.

Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nat Immunol** 2004; 5:738-43.

Horwich A, Norman A, Fisher C, Hendry WF, Nicholls J, Dearnaley DP. Primary chemotherapy for stage II nonseminomatous germ cell tumors of the testis. **J Urol** 1994; 151:72-7; discussion 77-8.

Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. **Cell Growth Differ** 1997; 8:293-9.

Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shenn JJ e Tang DJ. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. **Oncogene** 2011 Apr 18. [Epub ahead of print]

Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Baldrige LA, Cheng L. OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:935-40.

Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Müller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. **Lab Invest** 1995; 72:223-31.

Juric D, Sale S, Hromas RA, et al. Gene expression profiling differentiates germ cell tumors from other cancers and defines subtype-specific signatures. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:17763-8.

Kaye SB, Mead GM, Fossa S, et al. Intensive induction-sequential chemotherapy with BOP/VIP-B compared with treatment with BEP/EP for poor-prognosis metastatic nonseminomatous germ cell tumor: a Randomized Medical Research

Council/European Organization for Research and Treatment of Cancer study. **J Clin Oncol** 1998; 16:692-701.

Klepp O, Olsson AM, Henrikson H, et al. Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: multivariate analysis of a prospective multicenter study. Swedish-Norwegian Testicular Cancer Group. **J Clin Oncol** 1990; 8:509-18.

Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. **J Cancer Res Clin Oncol** 1996; 122:135-40.

Kuczyk M, Machtens S, Stief C, Jonas U. Management of the post-chemotherapy residual mass in patients with advanced stage non-seminomatous germ cell tumors (NSGCT). **Int J Cancer** 1999; 83:852-5.

LeBlanc E, Caty A, Dargent D, Querleu D, Mazeman E. Extraperitoneal laparoscopic para-aortic lymph node dissection for early stage nonseminomatous germ cell tumors of the testis with introduction of a nerve sparing technique: description and results. **J Urol** 2001; 165:89-92.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Res** 2007; 67:1030-7.

Link RE, Allaf ME, Pili R, Kavoussi LR. Modeling the cost of management options for stage I nonseminomatous germ cell tumors: a decision tree analysis. **J Clin Oncol** 2005; 23:5762-73.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2007; 23:675-99.

Logothetis CJ, Samuels ML, Selig DE, et al. Cyclic chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin plus vinblastine and bleomycin in advanced germinal tumors. Results with 100 patients. **Am J Med** 1986; 81:219-28.

Logothetis CJ, Swanson DA, Dexeus F, et al. Primary chemotherapy for clinical stage II nonseminomatous germ cell tumors of the testis: a follow-up of 50 patients. **J Clin Oncol** 1987; 5:906-11.

Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. **Int J Androl** 2011 May 11. [Epub ahead of print]

Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. **Cancer Res** 2003; 63:2244-50.

Madan B, Madan V, Weber O, et al. The pluripotency-associated gene Dppa4 is dispensable for embryonic stem cell identity and germ cell development but essential for embryogenesis. **Mol Cell Biol** 2009; 29:3186-203.

Manecksha RP, Fitzpatrick JM. Epidemiology of testicular cancer. **BJU Int** 2009; 104:1329-33.

Martin OV, Shialis T, Lester JN, Scrimshaw MD, Boobis AR, Voulvoulis N. Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. **Environ Health Perspect** 2008; 116:149-57.

Merzenich H, Ahrens W, Stang A, et al. Sorting the hype from the facts in testicular cancer: is testicular cancer related to trauma? **J Urol** 2000; 164:2143-4.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell** 2003; 113:631-42.

Møller H, Cortes D, Engholm G, Thorup J. Risk of testicular cancer with cryptorchidism and with testicular biopsy: cohort study. **BMJ** 1998; 317:729.

Møller H, Knudsen LB, Lynge E. Risk of testicular cancer after vasectomy: cohort study of over 73,000 men. **BMJ** 1994; 309:295-9.

Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ Jr. Immunopathology of germ cell tumors of the testis. **Semin Diagn Pathol** 1987; 4:320-41.

Motzer RJ, Nichols CJ, Margolin KA, et al. Phase III randomized trial of conventional-dose chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell rescue as first-line treatment for patients with poor-prognosis metastatic germ cell tumors. **J Clin Oncol** 2007; 25:247-56.

Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE, Bosl GJ, Mazumdar M, Chaganti RS. Molecular and cytogenetic studies in the diagnosis of patients with poorly differentiated carcinomas of unknown primary site. **J Clin Oncol** 1995; 13:274-82.

Motzer RJ, Sheinfeld J, Mazumdar M, et al. Etoposide and cisplatin adjuvant therapy for patients with pathologic stage II germ cell tumors. **J Clin Oncol** 1995; 13:2700-4.

Mullin NP, Yates A, Rowe AJ, et al The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer. **Biochem J** 2008; 411:227-31.

Nielsen ME, Lima G, Schaeffer EM, et al. (). Oncologic efficacy of laparoscopic RPLND in treatment of clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer. **Urology** 2007; 70:1168-72.

Oliver RT, Ong J, Shamash J, et al. Long-term follow-up of Anglian Germ Cell Cancer Group surveillance versus patients with Stage 1 nonseminoma treated with adjuvant chemotherapy. **Urology** 2004; 63:556-61.

Oosterhuis JW, Looijenga LH. Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis. **APMIS** 2003; 111:280-9.

Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:210-22.

Osterlind A, Berthelsen JG, Abildgaard N, et al. Risk of bilateral testicular germ cell cancer in Denmark: 1960-1984. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:1391-5.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. **Cancer Incidence in Five Continents**. Lyon: IARC, 2003. v.8. (IARC Scientific Publication No. 155)

Pectasides D, Papaxoinis G, Nikolaou M, et al. Analysis of 7 immunohistochemical markers in male germ cell tumors demonstrates the prognostic significance of p53 and MIB-1. **Anticancer Res** 2009; 29:737-44.

Peterson AC, Bauman JM, Light DE, McMann LP, Costabile RA. The prevalence of testicular microlithiasis in an asymptomatic population of men 18 to 35 years old. **J Urol** 2001; 166:2061-4.

Pico JL, Rosti G, Kramar A, et al. A randomised trial of high-dose chemotherapy in the salvage treatment of patients failing first-line platinum chemotherapy for advanced germ cell tumours. **Ann Oncol** 2005; 16:1152-9.

Pinczowski D, McLaughlin JK, Läckgren G, Adami HO, Persson I. Occurrence of testicular cancer in patients operated on for cryptorchidism and inguinal hernia. **J Urol** 1991; 146:1291-4.

Pizzocaro G, Monfardini S. No adjuvant chemotherapy in selected patients with pathologic stage II nonseminomatous germ cell tumors of the testis. **J Urol** 1984; 131:677-80.

Pont J, Albrecht W, Postner G, Sellner F, Angel K, Hörtl W. Adjuvant chemotherapy for high-risk clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell cancer: long-term results of a prospective trial. **J Clin Oncol** 1996; 14:441-8.

Preiner JL, Jewett MA. Role for retroperitoneal lymphadenectomy for testis cancer. **Curr Opin Urol** 1999; 9:205-8.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. (). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:973-8.

Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. **Hum Reprod Update** 2006; 12:303-23.

Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jørgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE. Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. **Hum Reprod** 2004; 19:1338-44.

Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. **Int J Androl** 1994; 17:85-92.

Raman JD, Nobert CF, Goldstein M. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. **J Urol** 2005; 174:1819-22; discussion 1822.

Rapley EA, Crockford GP, Easton DF, Stratton MR, Bishop DT; International Testicular Cancer Linkage Consortium. Localisation of susceptibility genes for familial testicular germ cell tumour. **APMIS** 2003; 111:128-33; discussion 33-5.

Rapley EA, Crockford GP, Teare D, et al. Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. **Nat Genet** 2000; 24:197-200.

Read G, Stenning SP, Cullen MH, et al. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. Medical Research Council Testicular Tumors Working Party. **J Clin Oncol** 1992; 10:1762-8.

Regenbrecht CR, Lehrach H, Adjaye J. Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors. **Stem Cell Rev** 2008; 4:319-28.

Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Dev Biol** 1996; 175:1-13.

Richie JP, Kantoff PW. Is adjuvant chemotherapy necessary for patients with stage B1 testicular cancer? **J Clin Oncol** 1991; 9:1393-6.

Rodriguez S, Jafer O, Goker H, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. **Oncogene** 2003; 22:1880-91.

Rustin GJ, Mead GM, Stenning SP, et al Randomized trial of two or five computed tomography scans in the surveillance of patients with stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: Medical Research Council Trial TE08, ISRCTN56475197--the National Cancer Research Institute Testis Cancer Clinical Studies Group. **J Clin Oncol** 2007; 25:1310-5.

Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M, Ackermann R. Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. **Cancer Res** 2001; 61:4214-21.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Crit Rev Oncol Hematol** 2004; 51:1-28.

Sharpe RM. The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? **Int J Androl** 2003; 26:2-15.

Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. **Nature** 2006; 441:997-1001.

Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. **Cell** 2009; 138:722-37.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res** 2003; 63:5821-8.

Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. **Lancet** 1972; 2:516-7.

Skotheim RI, Abeler VM, Nesland JM, et al. Candidate genes for testicular cancer evaluated by in situ protein expression analyses on tissue microarrays. **Neoplasia** 2003; 5:397-404.

Skotheim RI, Lind GE, Monni O, et al. Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. **Cancer Res** 2005; 65:5588-98.

Skotheim RI, Monni O, Mousses S, et al. New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. **Cancer Res** 2002; 62:2359-64.

Sogani PC, Perrotti M, Herr HW, Fair WR, Thaler HT, Bosl G. Clinical stage I testis cancer: long-term outcome of patients on surveillance. **J Urol** 1998; 159:855-8.

Sonneveld DJ, Sleijfer DT, Schrafford Koops H, et al. Familial testicular cancer in a single-centre population. **Eur J Cancer** 1999; 35:1368-73.

Spermon JR, Roelleveld TA, van der Poel HG, et al. Comparison of surveillance and retroperitoneal lymph node dissection in Stage I nonseminomatous germ cell tumors. **Urology** 2002; 59:923-9.

Stenning SP, Parkinson MC, Fisher C, et al. Postchemotherapy residual masses in germ cell tumor patients: content, clinical features, and prognosis. Medical Research Council Testicular Tumour Working Party. **Cancer** 1998; 83:1409-19.

Stephenson AJ, Klein EA. Surgical management of low-stage nonseminomatous germ cell testicular cancer. **BJU Int** 2009; 104:1362-8.

Stephenson AJ, Sheinfeld J. The role of retroperitoneal lymph node dissection in the management of testicular cancer. **Urol Oncol** 2004; 22:225-33; discussion 234-5.

Sternberg CN. Role of primary chemotherapy in stage I and low-volume stage II nonseminomatous germ-cell testis tumors. **Urol Clin North Am** 1993; 20:93-109.

Stone JM, Sandeman TF, Ironside P, Cruickshank DG, Matthews JP. Time trends in accuracy of classification of testicular tumours, with clinical and epidemiological implications. **Br J Cancer** 1992; 66:396-401.

Studer UE, Fey MF, Calderoni A, Kraft R, Mazzucchelli L, Sonntag RW. Adjuvant chemotherapy after orchiectomy in high-risk patients with clinical stage I non-seminomatous testicular cancer. **Eur Urol** 1993; 23:444-9.

Swerdlow AJ, Higgins CD, Pike MC. Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. **BMJ** 1997; 314:1507-11.

Tan IB, Ang KK, Ching BC, Mohan C, Toh CK, Tan MH. Testicular microlithiasis predicts concurrent testicular germ cell tumors and intratubular germ cell neoplasia of unclassified type in adults: a meta-analysis and systematic review. **Cancer** 2010; 116:4520-32.

Tandstad T, Cohn-Cedermark G, Dahl O, et al. Long-term follow-up after risk-adapted treatment in clinical stage 1 (CS1) nonseminomatous germ-cell testicular cancer (NSGCT) implementing adjuvant CVB chemotherapy. A SWENOTECA study. **Ann Oncol** 2010; 21:1858-63.

Theodore Ch, Terrier-Lacombe MJ, Laplanche A, et al. Bilateral germ-cell tumours: 22-year experience at the Institut Gustave Roussy. **Br J Cancer** 2004; 90:55-9.

Thompson RH, Carver BS, Bosl GJ, et al. Contemporary lymph node counts during primary retroperitoneal lymph node dissection. **Urology** 2011; 77:368-72.

Toner GC, Panicek DM, Heelan RT, et al. Adjunctive surgery after chemotherapy for nonseminomatous germ cell tumors: recommendations for patient selection. **J Clin Oncol** 1990; 8:1683-94.

Tuomisto J, Holl K, Rantakokko P, et al. Maternal smoking during pregnancy and testicular cancer in the sons: a nested case-control study and a meta-analysis. **Eur J Cancer** 2009; 45:1640-8.

Vergouwe Y, Steyerberg EW, de Wit R, et al. External validity of a prediction rule for residual mass histology in testicular cancer: an evaluation for good prognosis patients. **Br J Cancer** 2003; 88:843-7.

Walsh TJ, Dall'Era MA, Croughan MS, Carroll PR, Turek PJ. Prepubertal orchiopexy for cryptorchidism may be associated with lower risk of testicular cancer. **J Urol** 2007; 178:1440-6; discussion 1446.

Warszawski N, Schmücking M. Relapses in early-stage testicular seminoma: radiation therapy versus retroperitoneal lymphadenectomy. **Scand J Urol Nephrol** 1997; 31:355-9.

Weissbach L, Bussar-Maatz R, Flechtner H, Pichlmeier U, Hartmann M, Keller L. RPLND or primary chemotherapy in clinical stage IIA/B nonseminomatous germ cell tumors? Results of a prospective multicenter trial including quality of life assessment. **Eur Urol** 2000; 37:582-94.

Wermann H, Stoop H, Gillis AJ, et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. **J Pathol** 2010; 221:433-42.

Westergaard T, Olsen JH, Frisch M, Kroman N, Nielsen JW, Melbye M. Cancer risk in fathers and brothers of testicular cancer patients in Denmark. A population-based study. **Int J Cancer** 1996; 66:627-31.

Westermann DH, Schefer H, Thalmann GN, Karamitopoulou-Diamantis E, Fey MF, Studer UE. Long-term followup results of 1 cycle of adjuvant bleomycin, etoposide and cisplatin chemotherapy for high risk clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis. **J Urol** 2008; 179:163-6.

Williams SD, Stablein DM, Einhorn LH, et al. Immediate adjuvant chemotherapy versus observation with treatment at relapse in pathological stage II testicular cancer. **N Engl J Med** 1987; 317:1433-8.

Wu X, Groves FD, McLaughlin CC, Jemal A, Martin J, Chen VW. Cancer incidence patterns among adolescents and young adults in the United States. **Cancer Causes Control** 2005; 16:309-20.

Wu XZ. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:407-14.

Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. **J Exp Clin Cancer Res** 2008; 27:85.

Anexo 1 – Ficha de levantamento de dados

Nome: _____

Registro: _____

Lâmina: _____

Data da orquiectomia: _____

Idade (anos): _____

Raça: (1) Branco (2) Não branco

Orquiectomia realizada na instituição: (0) Não (1) Sim

Lateralidade: (1) Direito (2) Esquerdo (3) Bilateral (9999) Desconhecido

Estádio T: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9999) Desconhecido

Estádio N: (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9999) Nx

Estádio M: (0) M0 (1) M1 (9999) Mx

Estádio S pré-operatório : (0) S0 (1) S1 (2) S2 (3) S3 (9999) Sx

Estádio clínico: (1) I (2) II (3) III (9999) Desconhecido

Invasão vascular: (0) Não (1) Sim

Neoplasia Intratubular de Células Germinativas: (0) Não (1) Sim

% Componentes :

Carcinoma embrionário :

Teratoma maduro:

Teratoma imaturo:

Seio endodérmico:

Coriocarcinoma:

> 50% de Carcinoma embrionário : (0) Não (1) Sim

Presença de tumor de Seio endodérmico: (0) Não (1) Sim

Estádio S pós-operatório : (0) S0 (1) S1 (2) S2 (3) S3 (9999) Sx

Quimioterapia primária: (0) Não (1) Sim

Data da LNRP: ____/____/____

Tipo de LNRP: (1) Modificada com preservação de nervos (2) Completa com preservação
(3) Completa sem preservação de nervos (4) Outra (9999) Desconhecido

AP da LNRP: (0) Necrose/fibrose (1) Tumor viável (2) Teratoma (9999) Desconhecido

% Tumor viável : (0) Ausente (1) < 10% (2) > 10% (9999) Não se aplica (Estádio I)

No Total de linfonodos:

No de Linfonodos + :

Quimioterapia após a LNRP : (0) Não (1) Sim

Recidiva durante o seguimento: (0) Não (1) Sim

Data da recidiva: ____/____/____

Tratamento da recidiva:

(0) Nenhum/palição (1) Cirurgia (2) Quimioterapia (3) Cirurgia + QT (4) Outro

IGCCCG – Prognóstico : (1) Bom (2) Intermediário (3) Mau (9999) Não se aplica (Estádio I)

Data da última consulta: _____

Status:

(1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença
(3) Morte cancer específica (4) Perda de vista

Óbito: (1) Sim (2) Não

Seguimento atualizado (meses): _____