

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO
RECEPTOR DE FSH EM TECIDO TESTICULAR
TUMORAL, PERITUMORAL, NORMAL E DE
PACIENTES INFÉRTEIS**

VICTOR SILVESTRE SOARES FANNI

**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-Orientadores: Prof. Dr. Sidney Glina, Dr.
Rafael Malagoli Rocha**

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fanni, Victor Silvestre Soares

Expressão imunoistoquímica dos receptores de fsh em tecido testicular tumoral, peritumoral, normal e de pacientes inférteis /

Victor Silvestre Soares Fanni – São Paulo, 2012.

76p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1 IMUNOISTOQUÍMICA. 2. NEOPLASIA TESTICULAR. 3. SÍNDROME DA DISGENESIA TESTICULAR. 4. INFERTILIDADE. 5. HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais pela minha educação e carinho, por ensinarem conceitos básicos e fundamentais que me permitiram fazer escolhas corretas para alcançar todas as minhas conquistas”.

“Minha noiva Cheila pelo apoio e confiança incondicional para minhas escolhas”.

“A minha tia Luzia (in memoriam) quem me criou durante a infância e que lamento profundamente por não estar presente nestes momentos de conquistas. Porém, se coisas boas ainda acontecem, é por que ainda que de longe continua cuidando de mim!”

“À minha irmã Emiliana, seu companheiro Luciano, meus sobrinhos Michel e Francis, pelo apoio e carinho incondicional.”

AGRADECIMENTOS

“Ao Dr Stênio de Cássio Zequi para quem não tenho palavra para agradecer tudo que tem feito por mim, profissional exemplar de caráter indiscutível e ser humano admirável.”

“Ao Professor Sidney Glina pelo apoio e ensinamentos, o qual levarei como exemplo a ser seguido, tenho profunda admiração e eterna gratidão!”

“Ao Dr Luiz Figueiredo Mello pelas lições de hombridade e atitudes exemplares de um grande urologista.”

“Ao Departamento de Cirurgia Pélvica, em especial ao Núcleo de Urologia, pelo auxílio e disposição da sua estrutura para realização desta pesquisa, sem isto não poderíamos concluí-la.”

“A todos os assistentes do Serviço de Urologia do Hospital Ipiranga pela enorme paciência e comprometimento com a minha formação.”

“A Dra Isabela Wernek da Cunha pelo apoio fundamental para a realização desta pesquisa.”

“Aos profissionais da pós-graduação que com muita competência e profissionalismo me orientaram e organizaram de forma excepcional todo este curso.”

“A todos os funcionários da biblioteca do Hospital AC Camargo pelo apoio e paciência.”

“Aos profissionais do Departamento de Anatomia Patológica por toda ajuda e paciência, sem vocês não poderíamos concluir esta pesquisa”.

“Ao amigo Mário Luis Casella, dupla de residência, com sua disciplina e dedicação exemplar me fez um profissional melhor”.

“Aos colegas de residência Marcelo Iwamoto e Daniel Coccito, com os quais mantenho grande vínculo de amizade”.

“Ao Dr Roberto Anania, chefe da residência de cirurgia geral da Faculdade de Medicina de Jundiaí, com quem aprendi a importância e responsabilidade do exercício desta especialidade, criando condições para que eu conclui-se a residência de urologia da melhor forma possível.”

“A todos assistentes da Cirurgia Geral do Hospital São Vicente de Paulo e da Faculdade de Medicina de Jundiaí, pela paciência que tiveram ao ensinarem os princípios desta especialidade”.

“Aos amigos de Faculdade Eduardo Taroni, Maurício Otta, Álvaro Salles, Newton Remaille e Adriano Salvastro, pessoas que mantenho próximas, sempre me apoiam e se contentam com minhas conquistas”.

“Ao amigo Guilherme, contemporâneo e contemporâneo em todos estes anos que estive em São Paulo, pelo apoio e satisfação com as minhas conquistas”.

“Aos colegas urologistas da pós-graduação Ravendra, Gustavo, Walter, Álvaro e Ricardo, com os quais dividi expectativas e angústias durante o curso, e também obtive apoio para conclusão desta importante fase da minha vida.”

“Ao Dr Rodrigo Campos, Urologista do Hospital AC Camargo, colega de pós-graduação e de exercício profissional, por quem tenho profunda gratidão pelas oportunidades e apoio no meu exercício profissional.”

“Ao Dr Adriano Pinto, médico urologista exemplar, pelas oportunidades profissionais que me proporcionou, terei eterna gratidão.”

RESUMO

Fanni VSS. **Expressão imunoistoquímica do receptor de FSH em tecido testicular tumoral, peritumoral, normal e de pacientes inférteis.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A Síndrome de Disgenesia Testicular (STD) compreende pacientes com alterações da espermatogênese, infertilidade, criptorquidia, hipospádia e tumores germinativos. Prega que fatores ambientais (hormonais) e genéticos atuam durante a gestação dando origem as diferentes entidades da síndrome. O hormônio FSH (Hormônio Folículo Estimulante) produzido na hipófise, no sexo masculino, age nos testículos determinando função crucial, junto com a Testosterona, sobre a espermatogênese e espermiogênese (proliferação e diferenciação das células germinativas). A relação deste hormônio com o desenvolvimento da neoplasia testicular é incerta, a existência de estudos observacionais correlaciona níveis elevados deste hormônio com o desenvolvimento desta neoplasia, o fato de que portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico nunca a desenvolvem e que a incidência maior desta neoplasia ocorre após a puberdade (maior exposição hormonal), nos motivaram para a realização desta investigação. **Material e Método:** Trata-se de uma pesquisa retrospectiva com análise imunoistoquímica do receptor de FSH (FSHR) no parênquima testicular de homens férteis (Grupo I controle) e de adultos acometidos por diferentes entidades clínicas que compõe a STD: parênquima indivíduos inférteis (Grupo II), parênquima peritumoral, contendo ou não neoplasias intratubulares testiculares de células germinativas (NITTCG) (Grupo III), e tecidos neoplásicos seminomatosos (Grupo IV) e não seminomatosos (Grupo V). Foram confeccionadas lâminas seguido de coloração por hematoxilina-eosina (HE) e reação imunoistoquímica (IHQ). Os resultados foram analisados por um patologista experimentado e cada lâmina de IHQ foi pontuada baseada na intensidade da reação e a

porcentagem de células coradas. Para análise dos resultados calculamos a média de pontuação de cada grupo com seu respectivo desvio padrão, realizamos comparações estatísticas utilizando o teste de T student e consideramos como significativas relações com $p < 0,05$. **Resultados:** O grupo controle foi constituído por 3 indivíduos todos com pontuação pela IHQ de 4. O grupo de inférteis (N=20) teve média de pontos de 3,3 sem diferença estatística em relação ao controle ($p = 0,07$). Observamos que um subgrupo de pacientes inférteis, com antecedente de criptorquidia (N=3), apresentou uma maior expressão do FSHR (média de pontos 5,33) em relação aos demais inférteis ($p = 0,04$). O tecido peritumoral (N=25 / média de pontos = 2,47) teve expressão menor que o controle ($p < 0,01$) e semelhante ao da respectiva neoplasia adjacente. Nos casos de neoplasias intratubulares testiculares de células germinativas (NITTCG) a expressão foi semelhante ao do tecido peritumoral e a neoplasia com a qual se apresentava. O seminoma (n=20) teve em média uma baixa expressão do FSHR menor que o grupo controle (média de pontos = 2,24 e $p < 0,01$). Nos não seminomas, o carcinoma embrionário (n=10) teve expressão ausente em todos os casos exceto em um onde a expressão foi fraca (média 0,2 / $p < 0,01$). No teratoma e no tumor do saco vitelino (TSV), observamos uma expressão variável. Quando comparado ao grupo controle não houve diferença para o teratoma (n=7 / média = 2,71 / $p = 0,19$) e uma expressão menor foi observado no TSV (n=6 / média = 2,0 / $p = 0,01$). **Conclusões:** Nossos resultados mostram uma perda progressiva da expressão dos FSHR numa correlação inversa com a diferenciação tecidual testicular. A presença do mesmo foi praticamente ausente no CE, tendendo a fraca no seminoma e variável no teratoma e TSV, sendo neste tendendo a fraca. No tecido peritumoral normal a expressão do FSHR foi menor que o tecido normal (controle), sendo os valores observados semelhantes ao das NITTCG e a neoplasia adjacente.

SUMMARY

Fanni VSS. **[Immunohistochemical expression of FSH receptor in tumoral, peritumoral, normal and infertile patients testicular tissue]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS), an entity that includes patients with altered spermatogenesis, infertility, cryptorchidism, hypospadias and testicular germ cell tumors. Environmental factors (hormonal) and genetic would act during pregnancy resulting from the different entities of this syndrome. The FSH (Follicle Stimulating Hormone) produced in the pituitary gland acts in the testis determining crucial role along with testosterone on spermatogenesis and spermiogenesis. The relationship of this hormone with the development of testicular neoplasm is uncertain, the existence of observational studies correlate high levels of this hormone with the development of this neoplasm and the fact that patients which hypogonadotropic hypogonadism never develop this pathology motivated us to carry out this investigation. **Methods:** This was a retrospective study with immunohistochemical analysis of FSH receptors (FSHR) in stored tissues of normal fertile men (Group I) and of testicular parenchymas representing different clinical entities that make up the SDT in adults: infertile patients (Group II), peritumoral with or without adjacent of intratubular testicular germ cell neoplasm (ITTGCN) (Group III), neoplastic seminomatous (Group IV) and non-seminomatous sample tissues (Group V). Slides were made and underwent hematoxylin-eosin (HE) coloration and immunohistochemistry (IHC). The results were analyzed by a skilled pathologist and a score was given for each slide of the IHC, according the intensity of the reaction and the percentage of stained cells. To analyze the results, we calculate the average score and standard deviation of each group, statistical comparisons performed using the Student T test and we accepted as significant relationships with $p < 0.05$. **Results:** The control group (I) was composed of

three individuals all with a score of 4 by IHC. The average expression of infertile group (II) (N = 20) was 3.3 points with no difference compared to control (p = 0.07). The peritumoral tissue (III) (N = 25 / average score = 2.47) had lower expression compared to controls (p <0.01) and was similar to the respective adjacent tumor. In cases of peritumoral tissue ITTGCN areas, its expression was similar to the adjacent tumoral tissue. The seminoma (IV) (N = 20) had a tendency to low expression compared to controls (mean = 2.24 and p <0.01). In nonseminomatous (V), embryonal carcinoma (EC) (N = 10) expression was absent in all cases except one, where the expression was low (average 0.2 / p <0.01). In teratoma and in yolk sac tumor (YST), we observed a variable expression. When compared to the control group, no difference was verified in teratomas (n = 7 / mean = 2.71 / p = 0.19) and a lower expression was observed in YST (n = 6 / mean = 2.0 / p = 0,01).

Conclusions: Our results show a progressive loss of expression of FSHR in an inverse correlation with the testicular tissue differentiation. The expression of FSHR was practically absent in EC, tends to be weak in seminoma and was variable in teratoma and in YST (tends to be weak in the latter). In Peritumoral tissues without ITTGCN expression of the FSHR is lower than normal tissue (control); the values observed in this group are similar to the tumor and adjacent ITTGCN. The FSHR seems to be associated with differentiation processes of testicular germs cells tumor in adults.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1	Taxa de incidência do Câncer de Testículo em dois países europeus (Dinamarca e Finlândia) e nos Estados Unidos da América (USA).....	2
Figura 2	Ilustração da relação entre a freqüência relativa dos vários sintomas da síndrome de disgenesia testicular.....	11
Figura 3	Representação esquemática de ligações entre a patogênese e as manifestações clínicas da Síndrome de Disgenesia Testicular.....	12
Figura 4	Desenho Esquemático do Receptor do Hormônio Foliculo-estimulante (FSHR).....	14
Figura 5	Diagrama representando o desenvolvimento normal das células germinativas no sexo masculino e um modelo proposto para a sua transformação neoplásica.....	17
Figura 6	Um modelo da origem do Carcinoma “in situ” do testículo em desenvolvimento precoce e caminho patológicos hipotéticos de progressão para TTCC.....	19
Figura 7	A - Tecido Testicular Normal com Espermatogênese preservada. B – Reação imunoistiquímica do tecido testicular normal com expressão moderada do receptor de FSH.....	35
Figura 8	Tecido Testicular de indivíduo infértil (400x).....	36
Figura 9	NITTCG em Tecido peritumoral de Seminoma (400x).....	39

Figura 10	Neoplasia Seminomatosa (400x) com coloração de HE.....	40
Figura 11	Neoplasia Seminomatosa (400x) com reação IHQ.....	40
Figura 12	Neoplasia Não-Seminomatosa - Coriocarcinoma (400x).....	41
Figura 13	Neoplasia Não-seminomatosa – Teratoma (400x).....	42
Figura 14	Neoplasia Não-seminomatosa – Tumor do Saco Vitelino.....	43
Figura 15	Representação Gráfica (Boxplot) dos Resultados da Expressão do FSHR nos diferentes grupos Histológicos avaliados.....	46
Tabela 1	Critério de pontuação para análise imunoistoquímica.....	29
Tabela 2	Características do grupo de indivíduos inférteis.....	37
Tabela 3	Distribuição dos Grupos Analisados com os respectivos valores de expressão imunoistoquímica do FSHR.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	α -feto proteína
β-hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana β
CCND2	Ciclina dependente de cinase tipo D 2
cdk4	Cinase 4
cdk6	Cinase 6
CE	Carcinoma Embrionário
CGs	Células Germinativas
DAB	3,3-Diaminobenzidina Tetra-hidrocloreto
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHR	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Estimulante de Gonadotrofina
HE	Hematoxilina-eosína
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
H2O2	Água oxigenada
LH	Hormônio Luteinizante
NITTCG	Neoplasia Intra-tubular Testicular de Células Germinativas
pRB	Proteína Supressora-tumoral Retinoblastoma
SDT	Síndrome da Disgenesia Testicular
TSV	Tumor do Saco Vitelino
TTCG	Tumores Testiculares de Células Germinativas
USA	Estados Unidos da América

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Justificativa do Estudo	1
1.2	Racional.....	3
1.3	Revisão da Literatura	4
1.3.1	TTCG.....	4
1.3.2	Infertilidade Masculina	8
1.3.3	Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT)	10
1.3.4	Hormônio Folículo-estimulante (FSH).....	12
1.3.5	Receptores do FSH (FSHR)	14
1.3.6	Mecanismo de Transformação das Células Germinativas	15
1.3.7	Alterações Biomoleculares Relacionadas com a gênese da Neoplasia Testicular	16
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo primário	22
2.2	Objetivos secundários	22
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1	CrITÉRIOS de Inclusão	25
3.2	CrITÉRIOS de Exclusão.....	25
3.3	Reação Imunoistoquímica (IHQ)	26
3.4	Avaliação das Reações Imunoistoquímicas	28
3.5	Análise Estatística	30
3.6	Análise de Riscos e Aspectos Éticos.....	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Aspectos Demográficos e Clínicos	32
4.1.1	Grupo I – Controle	32
4.1.2	Grupo II – Inférteis	32

4.1.3	Grupo III – Peritumoral	33
4.1.4	Grupo IV – Tumoral Seminoma	33
4.1.5	Grupo V – Tumoral Não-Seminoma	34
4.2	Expressão IHQ do Receptor de FSH.....	34
4.2.1	Grupo I – Normal	34
4.2.2	Grupo II – Infertilidade	35
4.2.3	Grupo III – Peritumoral	38
4.2.4	Grupo IV – Seminoma	39
4.2.5	Grupo V – Não Seminoma.....	41
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ANEXOS

Anexo 1	Formulário De Pesquisa – Grupo Normal
Anexo 2	Formulário De Pesquisa – Grupo Infértil
Anexo 3	Formulário De Pesquisa – Grupo Neoplasia
Anexo 4	Aprovação CEP do Hospital AC Camargo
Anexo 5	Aprovação CEP Do Hospital Pérola Byington
Anexo 6	Parecer Favorável da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – Sistema Estadual de Transplante

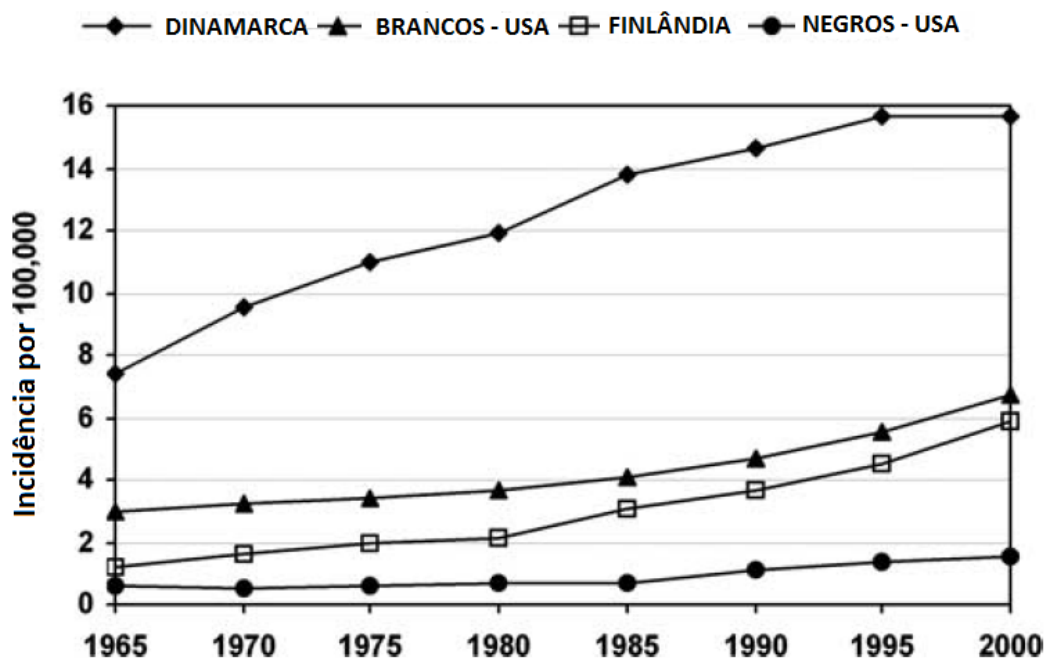
1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os tumores de células germinativas (TTCG) representam a maior parte das neoplasias testiculares, correspondem a cerca de 1 – 1,5% das neoplasias no sexo masculino e são mais comum na faixa etária entre 20 – 40 anos (ALBERS et al. 2011).

Os fatores de risco mais bem estabelecidos para o desenvolvimento de TTGC são criptorquidia, infertilidade, antecedente pessoal, história familiar de neoplasia testicular e a Síndrome de Klinefelter (JACOBSEN et al. 2000; MCGLYNN e COOK 2009).

Sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas no mundo ocidental (JEMAL et al. 2009) e mudanças críticas nos fatores ambientais são suspeitos de contribuírem para este fato (HORWICH et al. 2006). Este aumento da incidência ocorreu principalmente no final do século 20 e no início deste século, notadamente em países Escandinavos e nos Estados Unidos da América, os quais apresentam elevadas taxas de incidência dessa neoplasia (Figura 1: RAJPERT-DE MEYTS e HOEIHANSEN 2007).



Fonte: RAJPERT-DE MEYTS e HOEI-HANSEN (2007).

Figura 1 - Taxa de incidência do Câncer de Testículo em dois países europeus (Dinamarca e Finlândia) e nos Estados Unidos da América (USA), onde as taxas mostraram diferenças entre brancos e negros.

O aumento da incidência dos TTCG ocorreu concomitante com o de desordens reprodutivas e mal-formações genitais (criptorquidia e hipospádia). Estas entidades têm sido associadas na Síndrome de Disgenesia Testicular (SDT) (SKAKKEBAEK et al. 2001), que pode se apresentar desde um indivíduo saudável com discreta alteração do espermograma (manifestação menor) até neoplasia testicular em um indivíduo infértil com antecedente de criptorquidia e ou hipospádia (manifestação maior).

Alguns estudos de BERGSTROM et al. (1996) e ZHENG et al. (1996) demonstram que o desenvolvimento desta neoplasia está sobre controle

hormonal, onde altos níveis plasmáticos de Gonadotrofinas, em especial do FSH, associados com um desequilíbrio nos níveis de andrógenos e estrógenos seriam a chave para este evento. Esta hipótese se baseia no fato de que condições que se apresentam com baixos níveis de gonadotrofinas (Hipogonadismo Hipogonadotrófico) nunca desenvolvem tal neoplasia (WAGNER 1988).

1.2 RACIONAL

O objetivo deste estudo é investigar uma correlação possível do FSH com o desenvolvimento dos TTTCG, através do estudo da expressão imunoistoquímica (IHQ) de seu receptor em tecido normal de indivíduos férteis e nos diferentes tipos histológico de tecido testicular que representariam hipoteticamente fases distintas da Síndrome de Disgenesia Testicular em um indivíduo adulto: tecido normal de indivíduos férteis (ausência da síndrome), pacientes inférteis (manifestação menor) e tecidos neoplásicos (manifestação maior), bem como o tecido testicular peritumoral dos portadores destas neoplasias, com ênfase na neoplasia intra-tubular testicular de células germinativas (NITTTCG).

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 TTCG

O TTCG, apesar de relativamente raro, é a causa mais comum de neoplasia em homens com idade entre 15 – 40 anos. Até o presente momento não existem estudos nacionais sobre a incidência desta neoplasia. 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 (Ministério da Saúde 2009).

Trata-se de uma das neoplasias sólidas mais curáveis, principalmente devido ao aspecto multimodal do seu tratamento. A combinação de técnicas efetivas de diagnóstico, disponibilidade de marcadores tumorais séricos, esquema quimioterápico com várias drogas disponíveis e alterações da técnica cirúrgica fez com a mortalidade de até 50% nos anos 70 diminuíssem para taxas próximas a 5% nos dias atuais (BOSL e MOTZER 1997).

O TTCG é uma das poucas neoplasias associadas com marcadores séricos eficazes: β -HCG (Gonadotrofina Coriônica Humana β) e AFP (α -Feto Proteína). Estes marcadores são de grande importância no prognóstico e no seguimento da doença, permitindo intervenções precoces no curso da doença, sendo determinantes na avaliação da necessidade e escolha da terapêutica complementar a ser instituída.

Outras características dos TTCG que favorecem os resultados obtidos no tratamento trata-se da boa resposta a quimioterapia e a sensibilidade à

radioterapia de alguns tipos histológicos. O fato de acometer indivíduos jovens, com maior tolerância a terapia multimodal, também explica a grande taxa de cura desta doença.

Indivíduo com antecedente de criptorquidia apresenta risco de cerca de 4 a 8 vezes maior que a população geral (MCGLYNN e COOK 2009) para o acometimento pela neoplasia testicular. O mecanismo pelo qual a criptorquidia colabora para o desenvolvimento desta neoplasia não é claro. Existem duas teorias: de que tanto a criptorquidia quanto o câncer de testículo teriam uma causa comum (SDT) e outra teoria de que a ectopia testicular submete o testículo a fatores ambientais que favorecem o desenvolvimento de TTCCG.

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

A história prévia de câncer testicular também é um importante fator de risco para o desenvolvimento metacrônico contra-lateral. Determina um aumento da incidência de 12 a 27 vezes em relação a população geral (FOSSA et al. 2005; MCGLYNN e COOK 2009).

O histórico familiar de câncer testicular correlaciona com um aumento no risco em quatro vezes para filhos de pacientes e oito vezes para irmãos (HEMMINKI e CHEN 2006).

Ao câncer de testículo associa-se também a disgenesia gonadal e a infertilidade masculina (SHARPE e SKAKKEBAEK 2008). RAMAN et al. (2005) descreveu um aumento de até 20 vezes no risco para câncer testicular em homens inférteis com análise seminal anormal quando comparados à população geral.

Os mecanismos envolvidos nesta associação ainda não estão devidamente esclarecidos. Acredita-se que a exposição intra-uterina 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).

Os TTCG representam 95% dos casos de neoplasia testiculares e é dividido em 2 grandes grupos (RICHIE e STEELE 2007):

Seminoma – subdividido em 3 subgrupos:

- Clássico – Acomete indivíduos com idade entre 25 – 40 anos e raramente adolescentes com idade inferior à 15 anos. Representa até 85% dos Seminomas e está presente em aproximadamente 60% dos TTCG, na sua forma pura ou em associação com outros tipos histológicos não seminomatoso (tumores mistos). Em 10 -15% dos casos apresentam elevação da β -HCG, devido a presença do componente sinciotrofoblasto.

- Anaplásico – Com faixa etária de acometimento semelhante a forma clássica, porém bastante indiferenciado e com aspecto histológico mais agressivo, mas de evolução clínica similar. Representa 5 – 10% de todos os Seminomas.
- Espermatocítico – Representa de 2 – 12% dos Seminomas, acomete na maioria das vezes indivíduos com idade superior à 50 anos e raramente está associado com outro tipo histológico. Apresenta evolução favorável com taxas de cura excelente e via de regra não produzem metástases a distância.

Não-Seminoma - Seus componentes estão presente em aproximadamente em 40% dos TTCCG, acometem uma faixa etária mais jovem quando comparada com o TTCCG Seminomatosos, mais comum entre 15 – 30 anos. Composto por 4 tipos histológicos:

- Carcinoma Embrionário – Forma bastante indiferenciada, está presente em 40% das neoplasias não seminomatosas, porém a sua forma pura é encontrada em apenas 3 – 4% dos TTCCG. Na sua forma pura usualmente não apresenta elevação de nenhum dos marcadores. A elevação da β -hCG ocorre nos casos mistos com presença de componente Sinciciotrofoblasto ou de Coriocarcinoma, enquanto que a elevação da AFP associa-se com a presença do Tumor do Saco Vitelino.
- Coriocarcinoma – Sua forma pura representa 1% dos TTCCG, neoplasia bastante agressiva com característica de metástases a

distância precoce, ainda com lesões testiculares pequenas. β -hCG encontra-se em níveis bastante elevados em > 90% das vezes.

- Teratoma – Presente em 5 – 10% dos TTCG é constituído por camadas de células germinativas em vários estágios de maturação e diferenciação. Pode apresentar elevação da AFP em 20 – 25% dos casos de diferenciação para glândulas mucinosas ou tecido hepático.
- Tumor do Seio Endodérmico ou Saco Vitelino - Trata-se da forma mais comum de TTCG na infância, em adultos sua ocorrência é mais frequentemente associada com outros tipos histológicos e é presumidamente o responsável pela produção da AFP.

1.3.2 Infertilidade Masculina

A infertilidade acomete aproximadamente 14% dos casais. O homem participa como fator causal, isolado e conjugal, em metade dos casos. Assim, a chance de um homem ter problemas de fertilidade é da ordem de 7% (JARDIM e LORENZINI 2003).

Agentes poluentes industriais e do meio ambiente têm sido relacionados com alterações da fertilidade. A questão da gonadotoxicidade é um desafio e ponto de preocupação para todos aqueles que trabalham com infertilidade. Essa toxicidade é determinada por qualquer agente químico, físico ou biológico que possa alterar o sistema endócrino ou a espermatogênese, causando modificações na fisiologia da reprodução. A interrupção do processo biológico normal pode ocorrer por ação direta do

agente ou de forma indireta, por meio de seus metabólitos (JARDIM e LORENZINI 2003).

Sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas acompanhando a tendência do aumento das neoplasias testiculares e mal-formações do sistema reprodutivo. A infertilidade é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento do TTCG e acomete mais frequentemente indivíduos portadores de criptorquidia, sendo por isso incluído na Síndrome de Disgenesia Testicular (SKAKKEBAEK et al. 2001).

O indivíduo infértil pode apresentar alteração quantitativa (oligospermia), morfológica (teratospermia), motilidade (astenospermia) e mesmo ausência de espermatozóide (Azoospermia), muitas vezes a diminuição da quantidade está associada a alterações morfológicas e da motilidade.

Os indivíduos com Azoospermia são divididos em 2 sub-grupos, de causa obstrutiva (pós-vasectomia / pós-epididimite / obstrução congênita dos condutos do espermatozóide) e não-obstrutiva. Este segundo sub-grupo necessitam de biópsia testicular para extração de espermatozoides objetivando a realização de reprodução assistida (ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóide).

Os padrões histológicos esperados numa biópsia testicular por Azoospermia não-obstrutiva são (MCLACHLAN et al. 2007):

- Hipoespermatogênese - Todas as etapas da espermatogênese estão presentes, mas reduzidas em um grau variável.

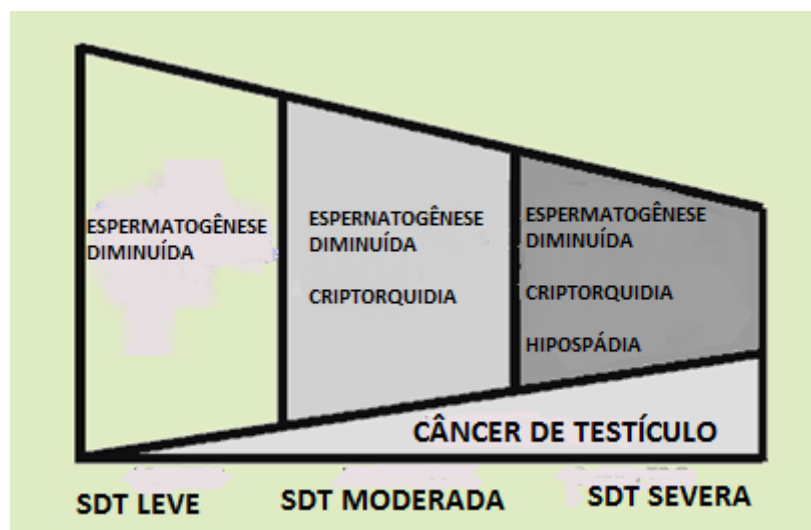
- Parada de Maturação das Células Germinativas - Parada total de maturação em um determinado estágio, na maioria das vezes na fase espermatogônias ou espermatócito primários.

- Síndrome Sertoli-Only - Utilizado quando não existem túbulos contendo células germinativas.

- Hialinização dos túbulos seminíferos (Atrofia Testicular) - Descreve a aparência dos túbulos, ou sem células germinativas ou de células de Sertoli, e é geralmente acompanhada de fibrose peritubular.

1.3.3 Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT)

SKAKKEBAEK et al. em (2001) foram quem inicialmente instituíram o termo para englobar desordens do sistema reprodutivo masculino (Criptorquidia, Hipospádia, Infertilidade e TTCG), hipotetizando causas comuns para as mesmas, de que uma desordem serviria como fator de risco para apresentação de outras e que todos estes fatos tinham origem comum durante a gestação (Figura 2) (SKAKKEBAEK et al. 2001; SHARPE e SKAKKEBAEK 2003).

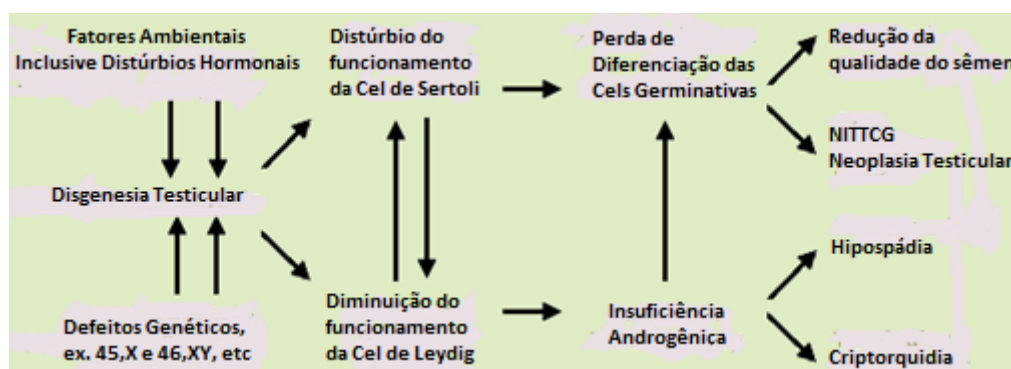


Fonte: Adaptado de SKAKKEBAEK et al. (2001)

Figura 2 - Ilustração da relação entre a frequência relativa dos vários sintomas da síndrome de disgenesia testicular. Notamos que quanto maior a incidência da SDT menor é o grau de severidade e o risco de neoplasia diminui.

Estudos populacionais comparando a incidência destas desordens entre os países do norte europeu, em especial países da Escandinávia (Dinamarca e Finlândia), mostraram que diferenças dos fatores ambientais e estilo de vida, e ou fatores genéticos tinham também papel para o desenvolvimento da SDT (JORGENSEN et al. 2001; RICHIARDI et al. 2004; BOISEN et al. 2004, 2005).

A SDT tem como hipótese que anormalidades no desenvolvimento testicular durante a gestação, que poderiam ocorrer por causas diversas, acarretariam alterações hormonais ou mal funcionamento das células de Leydig e Sertoli durante a diferenciação sexual masculina levando a um aumento das desordens reprodutivas (Figura 3).



Fonte: Adaptado de SKAKKEBAEK et al. (2001)

Figura 3 - Representação esquemática de ligações entre a patogênese e as manifestações clínicas da Síndrome de Disgenesia Testicular

Há uma dificuldade imensa em se testar esta hipótese, principalmente pela inacessibilidade do testículo fetal em seu estágio de formação e organização (8 – 12 semanas da gestação), quando esperamos que ocorra a disgenesia.

Estudos epidemiológicos em adultos com desordens da SDT e mais recentemente, estudos em recém-nascidos com criptorquidia e hipospádia têm sido as principais formas usadas para refinamento da hipótese, mas todos apresentam sérias limitações.

Em outras situações, o modelo animal seria a forma mais satisfatória para resolução destas limitações, porém TTCTG são raros e não reprodutíveis em outras espécies (SHARPE e SKAKKEBAEK 2008).

1.3.4 Hormônio Folículo-estimulante (FSH)

A função reprodutiva no homem é controlada por um eixo que envolve 3 níveis de organização: o hipotálamo, a glândula pituitária (hipófise) e o

testículo. Os dois níveis superiores produzem sinais endócrinos que estimulam a produção hormonal do nível seguinte.

Neurônios hipotalâmicos localizados na área pré-óptica secretam Hormônio Estimulante da Gonadotrofina (GnRH) no sistema venoso Portal que drena para Hipófise. No segmento anterior desta glândula existem células Gonadotróficas especializadas na secreção de Gonadotrofinas com ação estimulada pelo GnRH. As duas gonadotrofinas produzidas pela Hipófise são os Hormônios Luteinizante (LH) e o Folículo-estimulante (FSH) (DE KRETZER et al. 2000).

As duas gonadotrofinas através da corrente sanguínea chegam nos testículos, onde o LH estimula a produção de Testosterona pelas células de Leydig e o FSH atua sobre as células de Sertoli que em associação com a Testosterona dão suporte para a espermatogênese no epitélio seminífero.

Os níveis de secreção da testosterona e seus metabólitos (estradiol), e a produção de espermatozóides atuam determinando um controle negativo para a atividade secretória dos neurônios GnRH e das Gonadotropinas na Hipófise.

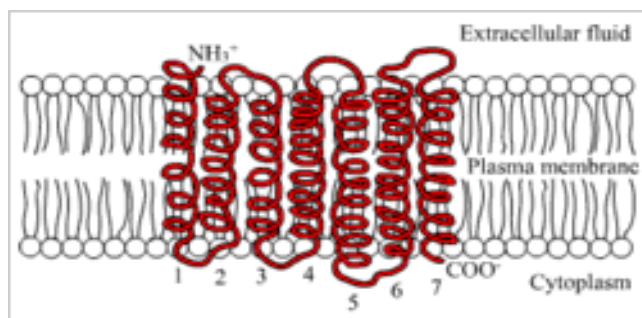
O controle na produção do FSH também passa pela ação de dois hormônios produzidos pela Célula de Sertoli, a Inibina B e a Ativina, ambos atuam sobre as Gonadotrofinas na Hipófise determinando respectivamente inibição e estímulo da produção do FSH.

O FSH exerce a sua ação através da ligação com seu receptor localizado na membrana da célula de Sertoli e nas Espermatogônias presentes na periferia dos Túbulos Seminíferos, desencadeando eventos na

extremidade intra-citoplasmática do receptor de membrana, que em última instância serão responsáveis pela espermatogênese e a espermiogênese.

1.3.5 Receptores do FSH (FSHR)

Trata-se de uma glicoproteína de membrana que se liga ao FSH na sua face extracelular levando a ativação de uma proteína Gs intracitoplasmática (na extremidade interna do receptor), que desencadeia uma cascata de eventos levando ao efeito biológico específico deste hormônio (GUDERMANN et al. 1995).



Fonte: Wikipedia - <http://en.wikipedia.org/wiki/FSH-receptor>.

Figura 4 - Desenho Esquemático do Receptor do Hormônio Foliculo-estimulante (FSHR) consiste em 695 aminoácidos e possui sete domínios α hélices transmembrana.

O gene do receptor de FSH está localizado no cromossoma 2p21 em humanos (ROUSSEAU-MERCK et al. 1993; GROMOLL et al. 1994). Sua localização no homem é exclusiva dos testículos onde se encontra em maior número localizado na membrana das células de Sertoli (FRITZ 1978; KANGASNIEMI et al. 1990) e em menor número nas Espermatogônias

(ORTH e CHRISTENSEN 1978). Também é encontrada em organelas em ambas as células (Sertoli e Espermatogônias), sugerindo que após a sua ação, o complexo hormônio receptor sofra endocitose (BACCETTI et al. 1998).

A regulação da expressão deste receptor está relacionada ao estágio de diferenciação na espermatogênese. Existe uma interação parácrina das células espermatogênicas com a Célula de Sertoli. Ocorre uma maior expressão deste receptor nas fases iniciais da espermatogênese com uma diminuição progressiva durante a diferenciação até espermatozóide. (WEINBAUER e NIESCHLAG 1993).

Embora saibamos que nos vários espectros da SDT os nível sérico do FSH pode estar elevado, não sabemos exatamente como se encontram do ponto de vista quantitativo e qualitativo, o receptor do FSH nos tecido tumoral e peritumoral de indivíduos com TTCG, de inférteis e bem como no parênquima testicular normal (de homens sabidamente férteis).

Como na maioria dos pacientes portadores de TTCG verificam-se alterações de espermatogênese e infertilidade, tampouco sabemos se o tecido testicular peritumoral tem expressão de FSH similar a de homens inférteis ou mesmo daqueles sabidamente férteis.

1.3.6 Mecanismo de Transformação das Células Germinativas

O desenvolvimento das Células Germinativas Primordiais tem sido bem descrita por SKAKKEBAEK et al. (1998), elas dão origem entre a

sétima e oitava semana da vida fetal aos Gonócitos, os quais se diferenciam nas Espermatogônias entre o segundo e terceiro trimestre da gestação.

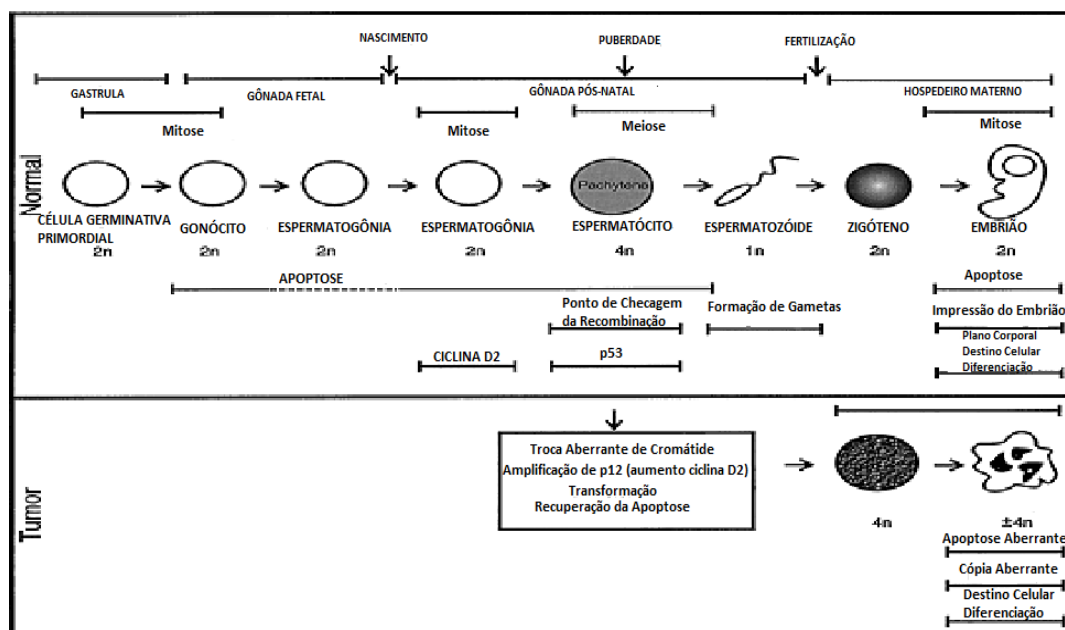
No testículo após o nascimento, as Espermatogônias dentro dos Túbulos Seminíferos sofrem uma série de mitoses consecutivas dando origem sucessivamente a Espermatogônia tipo A, Intermediária e tipo B. A Espermatogônia tipo B sofre uma replicação pré-meiótica formando um grande Espermatócito Primário. Uma seqüência de eventos compreendendo as pró-fases de Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno, Diplóteno e Diacinese, é seguida de meiose I e II originando quatro células haplóides (Espermátides), que se desenvolvem ulteriormente em Espermatozóides (KRETZER et al. 1998).

Extensiva morte celular ocorre durante a Espermatogênese por fatores diversos (MATSUI 1998). A morte celular por apoptose realiza uma importante função durante o desenvolvimento desta linhagem regulando o seu tamanho em relação à necessidade, na dependência de fatores de crescimentos e estímulos hormonais (CONLON e RAFF 1999).

1.3.7 Alterações Biomoleculares Relacionadas com a gênese da Neoplasia Testicular

No período pós-natal em testículos de ratos, a morte celular por apoptose ocorre nas Espermatogônias durante a sua meiose que originaria os Espermatócitos (PACKER et al. 1995). Acredita-se que em testículos de humanos adultos a apoptose ocorra de forma similar. Para o desenvolvimento de TTCG, a transformação teria de ocorrer nas células

germinativas em algum ponto durante seu complexo programa de proliferação e diferenciação regulado pela apoptose (Figura 5).



Fonte: CHAGANTI et al. (1993)

Figura 5 - Diagrama representando o desenvolvimento normal das células germinativas no sexo masculino (quadro superior) e um modelo proposto para a sua transformação neoplásica (quadro inferior). Os eventos genético “chave” que se apresentam no desenvolvimento normal das células germinativas e no desenvolvimento embrionário, são mostrados respeitando suas relações temporais e espaciais.

Análise citogenética e molecular tem evidenciado importantes dados relevantes para o entendimento do mecanismo de transformação das Células Germinativas (CG) (CHAGANTI et al. 1996). Virtualmente 100% das neoplasias exibem aumento do número de cópias do cromossoma 12p, com duplicação “in situ” ou com translocação através do genoma (CHAGANTI et al. 1993). Esta alteração é observada precocemente na Neoplasia Intratubular Testicular de Células Germinativas (NITTCG), uma célula

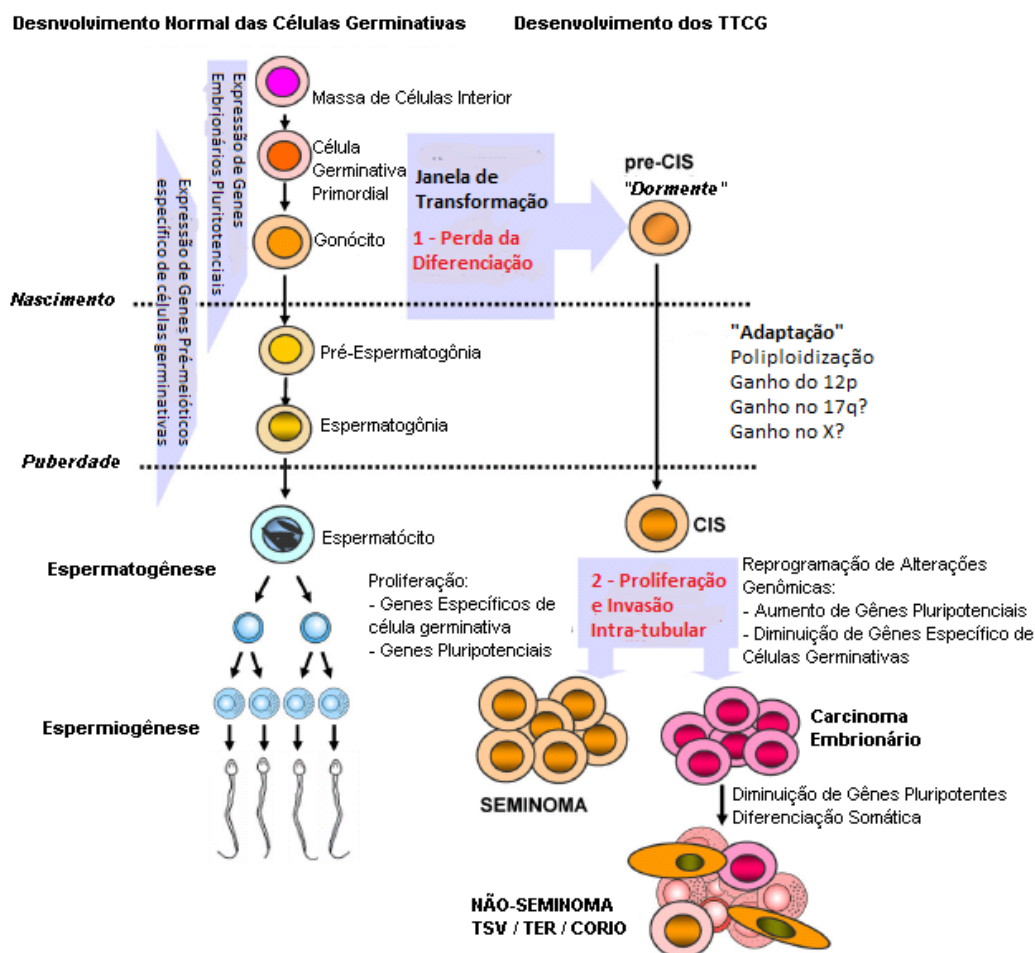
tetraplóide, ao contrário do zigóteno, que é diplóide. Isto sugere que esta transformação ocorra no início da transformação das CG na gênese tumoral (VOS et al. 1990; CHAGANTI et al. 1996).

Recente análise por Hibridização Genômica Comparativa dos TTCG confirmou um aumento universal na expressão do 12p DNA. Neste segmento do cromossomo foram identificados os genes RASK2, SOX5 e JAW1, que mantêm sua função para o desenvolvimento dos TTCG ainda indeterminado (MOSTERT et al. 1998). É esperado que outros genes ainda não identificados e mapeados nesta região possam estar envolvidos no desenvolvimento dos TTCG.

Estudos realizados com material derivados de tecido neoplásicos, sugerem que Ciclina dependente de cinase tipo D 2 (CCND2) seria o gene guia responsável por desencadear os eventos que originam a neoplasia dos TTCG (HOULDSWORTH et al. 1997). A ciclina D2 é um tipo D de Ciclina, a qual, junto com as Cinases 4 e 6 (cdk4 e cdk6) regulam a fosforilação da Proteína Supressora-tumoral Retinoblastoma (pRB) responsável pela checagem de controle durante as fases G1-S do ciclo celular (WEINBERG 1995). A interrupção desta checagem pela expressão aumentada da Ciclina D2, é um importante caminho na fisiopatologia para o desenvolvimento de tumores em humanos (WEINBERG 1995).

Estudos em modelos animais demostram que a produção de ciclina D2 encontra-se na dependência do FSH (SICINSKI et al. 1996), providenciando uma importante ligação entre alterações endócrinas dos

pacientes e alterações genéticas ocorridas durante a evolução clonal no processo de malignização.



Fonte: Modificado de RAJPERT-DE MEYTS (2006).

Figura 6 - Um modelo da origem do Carcinoma "in situ" do testículo em desenvolvimento precoce e caminhos patológicos hipotéticos de progressão para TTG. Os "eventos chave" na origem e progressão dos TTG estão representados em vermelho: (1) A perda da diferenciação das células germinativas primordiais ou Gonócitos e (2) o ganho de invasibilidade com (em Carcinoma Embrionário, CE) ou sem (em Seminomas) perda do fenótipo de célula germinativa. Nos casos dos Não-Seminomas, o CE é presumido como uma célula Tronco. Que pode sofrer regulação negativa e diferenciação somática para componentes não-seminomatosos como o Teratoma (TER) ou Coriocarcinoma (Corio).

Evidências de elevação das Gonadotrofinas séricas (principalmente do FSH) em pacientes com neoplasia testicular (MUELLER et al. 2003), níveis elevados deste hormônio no momento da orquiectomia como fator de risco para o desenvolvimento de tumor contra-lateral (SPIERINGS et al. 2003a, b) e maior risco de desenvolvimento de TTCCG em indivíduos com ginecomastia (LADANYI et al. 1990; SPIERINGS et al. 2003a, b), situação que apresenta níveis elevados de FSH. Estes dados sugerem que o aumento das Gonadotrofinas, em especial o FSH, causaria uma aceleração das perdas do DNA e instabilidade das células tetraplóides da NITTCG, o que poderia causar uma evolução para forma invasiva (OLIVER 2005).

As NITTCG são formas pré-invasivas responsáveis pela formação dos TTCCG. Enquanto que o seminoma é geralmente um tumor uniforme que lembra formas iniciais de células germinativas fetais e também as NITTCG, as neoplasias não seminomatosas são mais heterogêneas. O Carcinoma Embrionário tem a capacidade de diferenciação em uma vasta diversidade de tipos celulares e apresenta fenótipos semelhantes ao das células tronco embrionárias (SOLTER 2006).

Acredita-se então que a NITTCG trata-se da forma pré-invasiva de ambos os tipos histológicos dos TTCCG, no qual o seminoma mantém suas características e para originar os não-seminomas ocorre uma reprogramação (desdiferenciação) dando origem ao Carcinoma Embrionário, que através de inativação ou regulação negativa de genes pluripotências embrionários daria origem as demais formas não seminomatosas -

Coriocarcinoma, Tumor do Saco Vitelino e Teratoma (Figura 6)
(KRISTENSEN et al. 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Delinear os padrões de expressão IHQ do FSHR nos TTCCG, nos seus respectivos tecidos peritumorais e nos diferentes espectros da Síndrome de Disgenesia Testicular e no parênquima testicular normal no adulto.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Comparar a expressão IHQ dos FSHR nas células neoplásicas de portadores de TTCCG seminomatosos e não seminomatosos.
- 2 Analisar a expressão IHQ dos FSHR nos segmentos peritumorais acometidos por NITTCCG (quando presente) em cada um dos grupos avaliados.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizada investigação retrospectiva utilizando-se material obtido de indivíduos tratados no Hospital A.C. Camargo submetidos a orquiectomia radical por neoplasia testicular. Como controle considerado normal selecionamos tecido testicular de homens comprovadamente férteis submetidos à orquiectomia subcapsular para o tratamento de neoplasia de próstata metastática.

Selecionamos blocos de parafina somente de indivíduos do grupo com neoplasia que tivessem também material estocado no banco de tecido fresco do Hospital A.C. Camargo, e tanto para os neoplásicos quanto para o componentes do grupo controle, optamos por material estocado a partir de 2005, garantindo uma maior preservação antigênica do material e com expectativa de uma análise IHQ mais adequada. O material estocado no banco de tecido fresco segue critérios estritos de coleta que otimizam a sua estocagem, com melhor qualidade para análise IHQ e possibilitando futuras análises complementares por outras metodologias.

O material para investigação do grupo infértil foi obtido com colaboração do Hospital Pérola Byington onde são realizados procedimentos de reprodução assistida. Nosso trabalho foi aprovado pelo comitê de ética desta instituição (Anexo 5) e retiramos do seu Departamento de Anatomia Patológica blocos de parafinas de indivíduos sabidamente inférteis para constituir nosso grupo.

Os grupos de pacientes estudado foram assim distribuídos e denominados:

Grupo I – Controle

Grupo II – Inférteis

Grupo III – Peritumoral com ou sem NITTCG:

A - Peritumoral geral

B - Peritumoral seminoma

C - Peritumoral não seminoma

Grupo IV – Tumoral Seminoma

Grupo V – Tumoral Não-seminoma

A - Carcinoma Embrionário

B - Teratoma

C - Tumor do Saco Vitelino

D - Componente Seminoma de tumor não-seminomatoso

Foram confeccionadas lâminas com material da parafina estocada em ambas as instituições após seleção dos segmentos de interesse e submetidas a reação imunoistoquímica para verificação do FSHR nestes materiais.

O tecido peritumoral foi obtido a partir de uma margem macroscópica livre de acometimento tumoral distando 1,0 cm da margem da lesão neoplásica. Nos casos do grupo controle e de indivíduos inférteis a presença de NITTCG foi descartada por análise cuidadosa pelo patologista.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Grupo Normal – Pacientes sem neoplasia testicular com história de paternidade comprovada.
- Grupo Tumoral - Diagnóstico confirmado de TTCCG.
- Grupo Infértil – Casos comprovados na anatomia-patológica de Hipoespermatogênese, Parada de Maturação das Células Germinativas, Síndrome Sertoli-Only e Hialinização dos Túbulos Seminíferos (Atrofia Testicular).

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Tumores testiculares não germinativos ou sarcomas paratesticulares.
- Pacientes previamente submetidos à quimioterapia ou radioterapia para qualquer tipo de neoplasia.
- Pacientes que por qualquer motivo fizeram uso de exógeno de testosterona ou gonadotrofinas.
- Pacientes usando finasterida no momento do estudo ou até dois anos antes.
- Pacientes portadores de hipogonadismo hipo ou hipergonadotrófico, prolactinomas, portadores de distúrbios hipofisários ou usuários de cannabis.

- Uso prévio de análogos do LHRH, estrógenos ou anti-andrógenos nos casos de tratamento tecido testicular obtido de orquiectomia para tratamento da neoplasia de próstata.
- Material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imunoistoquímica.
- Pacientes do grupo tecido normal sem certeza de fertilidade prévia.

3.3 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificaram-se as lâminas histológicas referentes as 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 do interesse da pesquisa.

Os blocos correspondentes às lâminas mais representativas selecionadas, foram seccionados com cortes de 4µm e montados em lâminas convencionais num esfregaço entre vidros selados com Silane e depois secados por 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

Foi realizada reação imunoistoquímica automatizada através da máquina BenchMark[®] XT produzida pela Ventana. O reagente utilizado foi o anti-corpo de FSH de coelho policlonal da Abbiotec[®] numa diluição de 1:300

(determinada após teste com diferentes titulações deste reagente até obtenção da coloração adequada).

As lâminas convencionais foram colocadas na máquina em grupo de 30 por vez e as reações seqüências foram realizadas automaticamente seguindo o protocolo determinado previamente:

- Desparafinização - Com Xileno e EZ PREP (solução de desparafinização, patenteada pela Ventana, livre de álcool) e após re-hidratados com uso banhos sucessivos de Etanol a 100%, a 95%, a 80% e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um.
- Recuperação Antigênica - Utilizada os tampões CC1 (pH alto) e CC2 (pH baixo).
- Aplicação de LCS (Liquid Coverslip) - óleo de baixa densidade que forma a “câmara de reação” e impede evaporação e ressecamento da amostra.
- Desperoxidação Tecidual - com aplicação de solução superóxida (H_2O_2).
- 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 (NaN_3). Após a incubação com esses anticorpos, foi aplicado o sistema de amplificação por polímero não biotinilado Novolink (Novocastra, New Castle Upon Tyne, Inglaterra) seguido de nova lavagem em tampão PBS.

- Incubação com cromógeno e contra coloração - Realizou-se a incubação da lâmina em solução substrato: 3,3-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride(DAB) 100mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 mL de Dimetilsulfódico (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 lavados em água corrente e destilados. 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 seqüência, as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de Etanol a 80%, a 95%, a 100%.
- Controle positivo e negativo - A fidelidade das lâminas sempre foi atestada através de controle positivo em tecido sabidamente positivo para o anticorpo estudado (tecido testicular normal) e controle negativo, obtido pela omissão do anticorpo primário.

3.4 AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

As lâminas foram examinadas por um mesmo patologista sempre ao mesmo microscópio Nikon Labphot[®] e com a mesma intensidade de luz, utilizando-se objetiva de 40x, selecionadas as áreas de maior intensidade da

coloração seguida de uma nova análise em grande aumento (objetiva de 400x) para classificação final.

O esquema de pontuação para a análise imunoistoquímica foi obtido pela combinação da intensidade de coloração e a pontuação da porcentagem de tecido corado. Conforme demonstrado no quadro abaixo (TAYLOR e LEVENSON 2006):

Tabela 1 - Critério de pontuação para análise imunoistoquímica.

Intensidade da Coloração	Porcentagem de Células Coradas				
	0	1 – 25	26 – 50	51 – 75	76 – 100
	(Pont. 0)	(Pont. 1)	(Pont. 2)	(Pont. 3)	(Pont. 4)
0	0	0	0	0	0
1	0	2	3	4	5
2	0	3	4	5	6
3	0	4	5	6	7

O resultado da soma da intensidade de coloração que variou de 0 a 3, com a pontuação da porcentagem de tecido colorido, que variou 0 a 4, propiciou um escore, que variou de 0 a 7 pontos. De acordo com a pontuação obtida eram posteriormente agrupados da seguinte forma:

- 0 ponto – Reação IHQ Ausente
- 2 e 3 pontos – Reação IHQ Fraca
- 4 e 5 pontos – Reação IHQ Moderda
- 6 e 7 pontos – Reação IHQ Forte

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada para cada um dos grupos (Anexo 1 – Grupos III, IV e V / Anexo 2 – Grupo II / Anexo 3 – Grupo I), digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa “Excel 9.0 for Windows”. Na análise estatística foi empregado o software *Stata Statistical Software, versão 10.0, Special Edition, Stata Corporation*.

A distribuição das variáveis clínicas e anatomopatológicas foram apresentadas na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e respectivos desvios-padrão. Com o intuito de se verificar a existência de associação da expressão do receptor de FSH às demais variáveis, foi realizado o teste de T-student. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

3.6 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, introdução de qualquer modificação terapêutica, aplicação de medicação ou método que tenha gerado danos, benefícios ou outras conseqüências 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 e do Hospital Pérola Byington. 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. E habitualmente nas duas instituições os pacientes assinam termos de consentimento livre esclarecido autorizando a utilização de seus materiais biológicos para pesquisas. O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa de ambas as instituições:

- Hospital do Câncer - Aprovado em 17/08/2010. Protocolado com o número nº 1412/2010. (Anexo 4)
- Hospital Pérola Byington – Aprovado em 30/03/2011. Protocolado com o nº 012/11. (Anexo 5)

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

4.1.1 Grupo I – Controle

Composto por 3 portadores de neoplasia prostática submetidos à orquiectomia com objetivo de promover a privação androgênica para o tratamento do adenocarcinoma de próstata e com anatomopatológico de tecido normal com espermatogênese preservada.

Idade média de 77 anos (variando de 71 – 85), todos tinham histórico de prole constituída e apresentavam valores do antígeno prostático específico (PSA - Prostate-specific antigen) elevados e não foi obtido o valor do FSH nestes casos.

A coleta de material testicular de homens jovens (sabidamente férteis) vítima de morte encefálica por poli-traumatismo durante procedimentos de retirada de órgãos para transplante foi idealizado, porém não foi possível, por impedimento do Conselho Nacional de Transplantes em Brasília, Distrito Federal, a despeito de aprovação previa no estado de São Paulo (Anexo 6).

4.1.2 Grupo II – Inférteis

Composto por 18 indivíduos com idade média de 35,9 anos (27 – 52), em apenas 1 dos indivíduos não estava disponível o valor sérico do FSH, nos demais teve uma média de 22,8ng/dl (3 -53), acima do limite normal de

referência (15ng/dl), entretanto vários pacientes tiveram níveis normais. OS valores séricos individuais do FSH e da Testosterona estão elencados na tabela 2. A testosterona apresentou média dentro da normalidade de 422ng/dl.

4.1.3 Grupo III – Peritumoral

Composto por 25 indivíduos, sendo 15 de portadores de neoplasia seminomatosa e 10 do grupo com componente não-seminomatoso. A idade média foi de 30,1 (14 - 46), menor nos não-seminomatosos com 26,1 anos e 33,5 anos nos seminomatosos.

Encontramos NITTCG em 11 dos 25 casos avaliados (44%), com idade média de 32,4 anos, 8/15 (53,3%) dos Seminomas e 3/10 (30%) dos não-Seminomas apresentavam este achado.

4.1.4 Grupo IV – Tumoral Seminoma

Inicialmente selecionamos junto ao Banco de Tecido fresco 20 casos para composição deste grupo, porém em um caso não foi disponibilizado as lâminas e outros 2 os blocos de parafina encontravam-se inadequados para análise (1 dos casos não havia amostra tumoral), resultando na inclusão de 17 indivíduos com idade média de 33,4 anos (25 – 46).

O valor da AFP encontrava-se normal em todos os casos, a β -HCG não foi disponível em um indivíduo e teve valor acima da referência em 7 casos (41%), destes em apenas duas situações (11,7%) apresentava valor superior a duas vezes a referência.

4.1.5 Grupo V – Tumoral Não-Seminoma

Dos 20 casos separados, conseguimos realizar análise em apenas 14 indivíduos, devido à indisponibilidade das lâminas em 3 casos e parafina inadequada em outros 3. Destes a idade média foi de 26 anos (14 – 40).

A presença do componente seminomatoso ocorreu em 3 indivíduos, Carcinoma Embrionário em 10, Tumor do Saco Vitelino em 6 e Teratoma em 7 casos. Tumores puros representaram apenas 3 casos (2 – Carcinomas Embrionários / 1 – Teratoma)

Os marcadores tumorais (β -HCG e AFP) não foram disponíveis no pré-operatório de 2 indivíduos. A β -HCG encontrava-se elevada em 6 situações e a AFP em outras 9. A presença do TSV determinou elevação da AFP em todos os momentos.

4.2 EXPRESSÃO IHQ DO RECEPTOR DE FSH (FSHR)

4.2.1 Grupo I – Normal

O FSHR teve expressão moderada em todos os casos (Figura 7). A média de pontos atingida pelo grupo foi de 4.

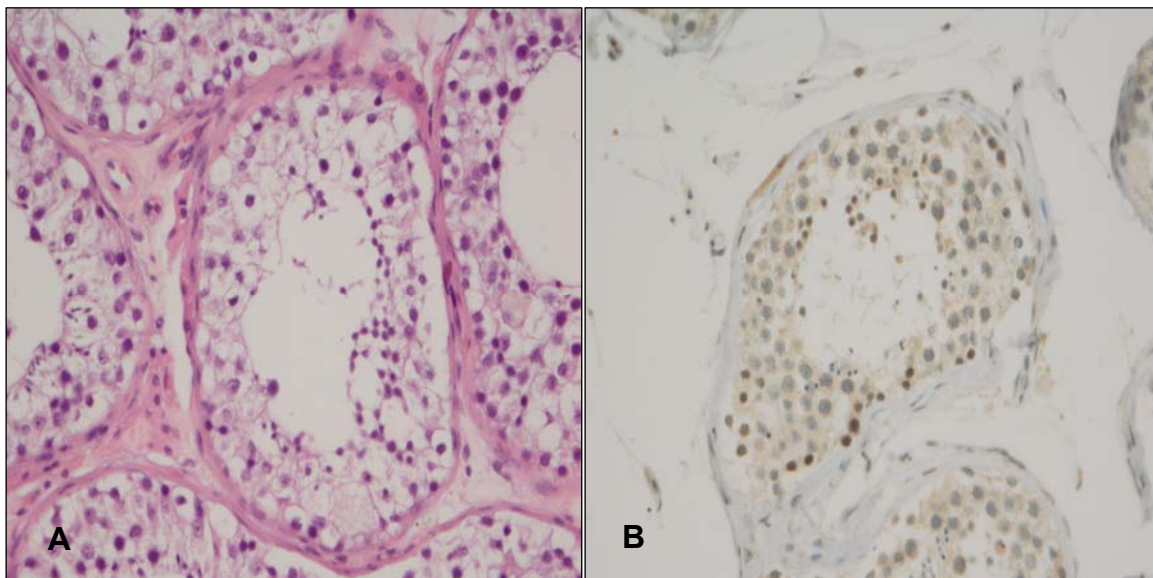


Figura 7 - A - Tecido Testicular Normal com Espermatogênese preservada. B – Reação imunoistiquímica do tecido testicular normal com expressão moderada do receptor de FSH.

4.2.2 Grupo II – Infertilidade

A expressão foi variável com ausência de reação em 3 casos (15%), fraco em 6 (30%), moderada em 9 (45%) e forte em 2 (10%). Sua média de pontos pela IHQ foi de 3,3 semelhante ao grupo controle ($p=0,07$).

Não observamos nestes indivíduos uma relação da idade com a expressão do FSHR, indivíduos com até 35 anos ($n=10$) tiveram pontuação média de 3,6 comparado com 3,0 no grupo com idade superior aos 35 anos ($p=0,49$).

A expressão do FSHR não teve relação com os valores séricos do FSH, comparando grupos com valor normal do FSH (<15 ng/dl) com o de valor acima da referência, observamos uma pontuação média no grupo normal de 2,71 contra 3,58 ($p=0,32$).

Indivíduos com nível de testosterona menor que a referência (n=4) quando comparado com os demais (n=14), observamos uma menor expressão do FSHR nos hipogonádicos (média 1,00) quando comparado aos demais com níveis de testosterona normal. (3,85) (p=0,05).

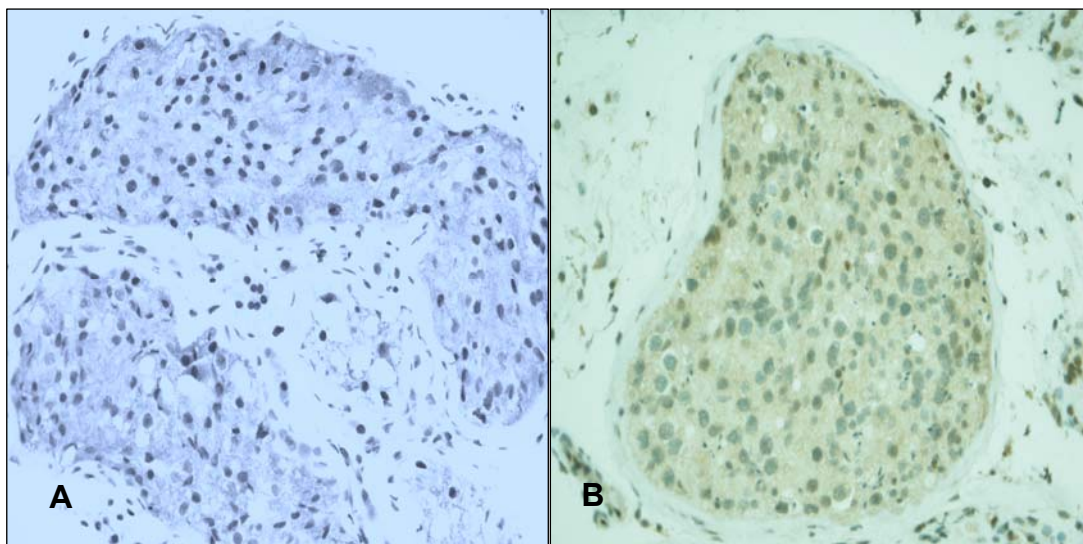


Figura 8 - Tecido Testicular de indivíduo infértil (400x). A - Expressão IHQ moderada. B – Expressão IHQ Fraca

Quanto ao tipo histológico este grupo foi composto por 7 casos de atrofia testicular, dois hipoespermatogênese, 9 parada de maturação, um Sertoli only e outro com espermatogênese preservada (Tabela 2).

Tabela 2 - Características do grupo de indivíduos inférteis.

Caso	Idade	Anatomopatológico	FSH sérico (ng/dl)	Testosterona sérica (ng/dl)	IHQ
1	30	Atrofia Testicular	17,3	608	Forte
2	36	Atrofia Testicular	6,3	559	Moderada
3	39	Atrofia Testicular	53	434	Moderada
4	32	Atrofia Testicular	13,3	414	Fraca
5	43	Atrofia Testicular	1,6	823	Fraca
6	39	Atrofia Testicular	32	313	Moderada
7	61	Atrofia Testicular	2,74	243	Ausente
8	50	Espermatogênese Preservada	2,3	535	Moderada
9	33	Hipoespermatogênese	30,7	332	Forte
10	42	Hipoespermatogênese	31,6	99999	Moderada
11	34	Parada de maturação	17	666	Moderada
12	42	Parada de maturação	30	205	Ausente
13	34	Parada de maturação	26,9	294	Fraca
14	30	Parada de maturação	5,2	437	Fraca
15	32	Parada de maturação	48	536	Fraca
16	31	Parada de maturação	19	273	Moderada
17	27	Parada de maturação	2,46	526	Fraca
18	44	Parada de maturação	99999	99999	Moderada
19	33	Parada de maturação	19,9	230	Moderada
20	52	Sertoli only	32	173	Ausente

Houve apenas um caso de Sertoli only e de espermatogênese preservada com pontuação a IHQ de zero e quatro, respectivamente. A hipoespermatogênese foi descrita em dois casos com IHQ média de 5.

No grupo com atrofia testicular tivemos média de 3,71 sem diferença com o grupo infértil ($p=0,66$) e o controle ($p=0,73$). Nos indivíduos com parada de maturação com média de 2,88 também não observamos diferença em relação aos inférteis ($p=0,18$) e o controle ($p=0,06$).

Os indivíduos inférteis com antecedente de criptorquidia (n=3) apresentaram uma média de pontos na IHQ de 5,33, sem diferença com o grupo controle ($p=0,18$) e maior que os demais inférteis ($p=0,04$).

4.2.3 Grupo III – Peritumoral

A Geral (seminoma e não seminoma agrupados)

O tecido peritumoral teve 1 caso com expressão ausente (4%), fraca em 22 (88%), moderada 1 (4%) e forte também 1 caso (4%). Na presença de NITTCG a expressão esteve ausente em 2 casos (18,2%), fraca 8 (72,7%) e moderada em apenas 1 (9,1%).

A média de pontuação obtida pelo tecido peritumoral no geral foi de 2,47, menor que o grupo controle ($p<0,01$), nos casos da presença de NITTCG foi de 2,09 também menor que o controle ($p<0,01$). A pontuação média dos casos de NITTCG foi menor que a do tecido peritumoral geral sem NITTCG, porém sem significância estatística ($p=0,41$).

B Peritumoral Seminoma

Em 100% dos casos houve expressão fraca no tecido peritumoral e nos casos de NITTCG tivemos expressão ausente em 1 caso (11%), fraca em 7 (77%) e 1 (11%) moderado. A média de pontos atingidos foi de 2,26 para o tecido peritumoral e de 2,37 nos casos de NITTCG.

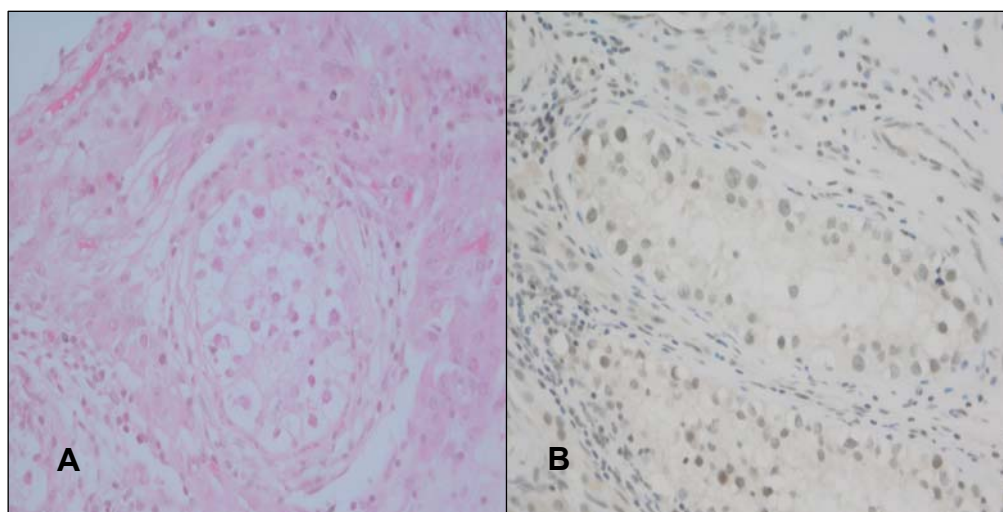


Figura 9 - NITTCG em Tecido peritumoral de Seminoma (400x). A – coloração com HE. B – Expressão IHQ nuclear fraca.

C Peritumoral Não-Seminoma

A expressão no tecido peritumoral deste grupo esteve ausente em 1 (10%) caso, fraca em 7 (70%), moderada em 1 (10%) e forte em outro (10%). A expressão nas NITTCG neste grupo esteve ausente em 1 (33,3%) e fraca em 2 casos (66,6%). Não houve diferença significativa na média de pontos do tecido peritumoral com 2,8 em relação aos casos com NITTCG que foi de 1,33 ($p=0,14$).

4.2.4 Grupo IV – Seminoma

A expressão foi ausente em 5 casos (29,4%), fraca em 6 (35,3%) e moderada em outros 6 (35,3%). A média de pontos deste grupo foi de 2,29 menor que o controle ($p<0,01$).

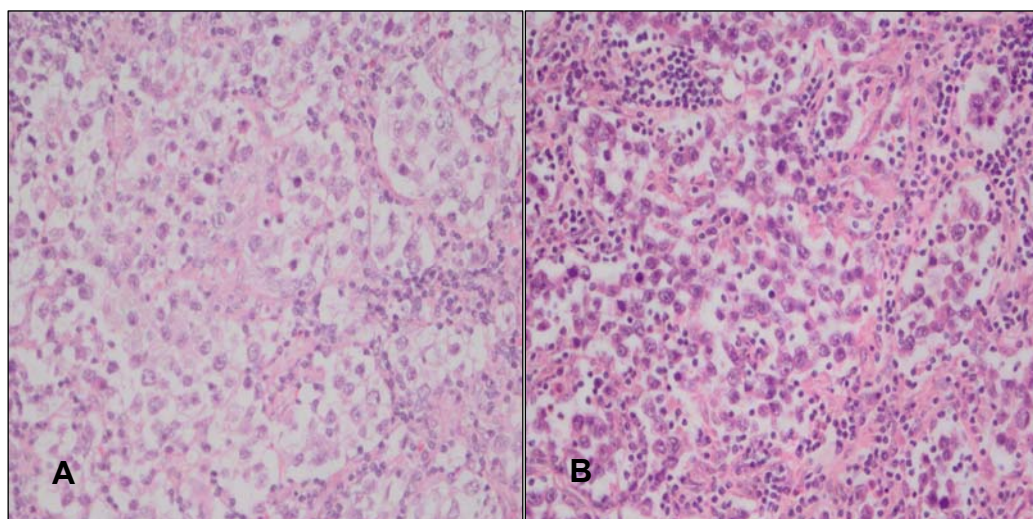


Figura 10 - Neoplasia Seminomatosa (400x) com coloração de HE (A e B)

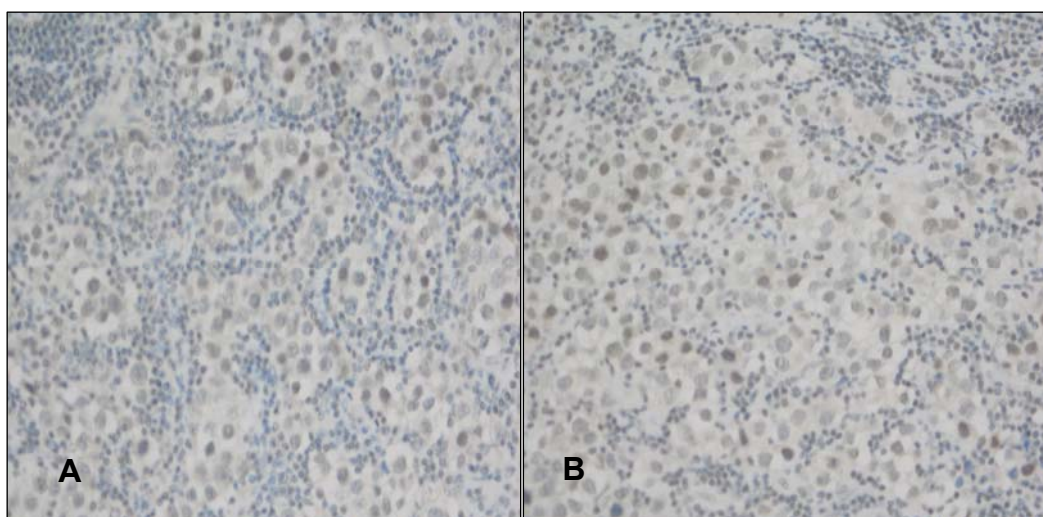


Figura 11 – Neoplasia Seminomatosa (400x) com reação IHQ. A e B – Expressão Fraca

4.2.5 Grupo V – Não Seminoma

A Carcinoma Embrionário

Expressão ausente em 9 casos (90%) e fraca em 1 (10%). Sua média foi de 0,2 menor que o controle ($p < 0,01$).

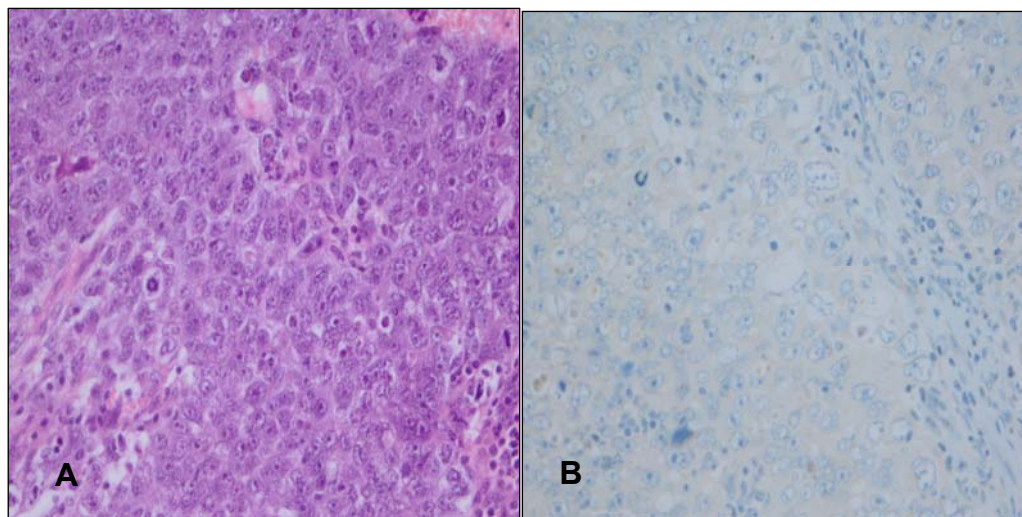


Figura 12 – Neoplasia Não-Seminomatosa - Coriocarcinoma (400x). A – Coloração por HE. B – IHQ com expressão ausente do FSHR

B Teratoma

Expressão ausente em 2 casos (28,6%), 2 fracos (28,6%), 2 moderados (28,6%) e 1 caso forte (14,3%). Sua média de pontos foi de 2,71, sem diferença com o controle ($p = 0,19$).

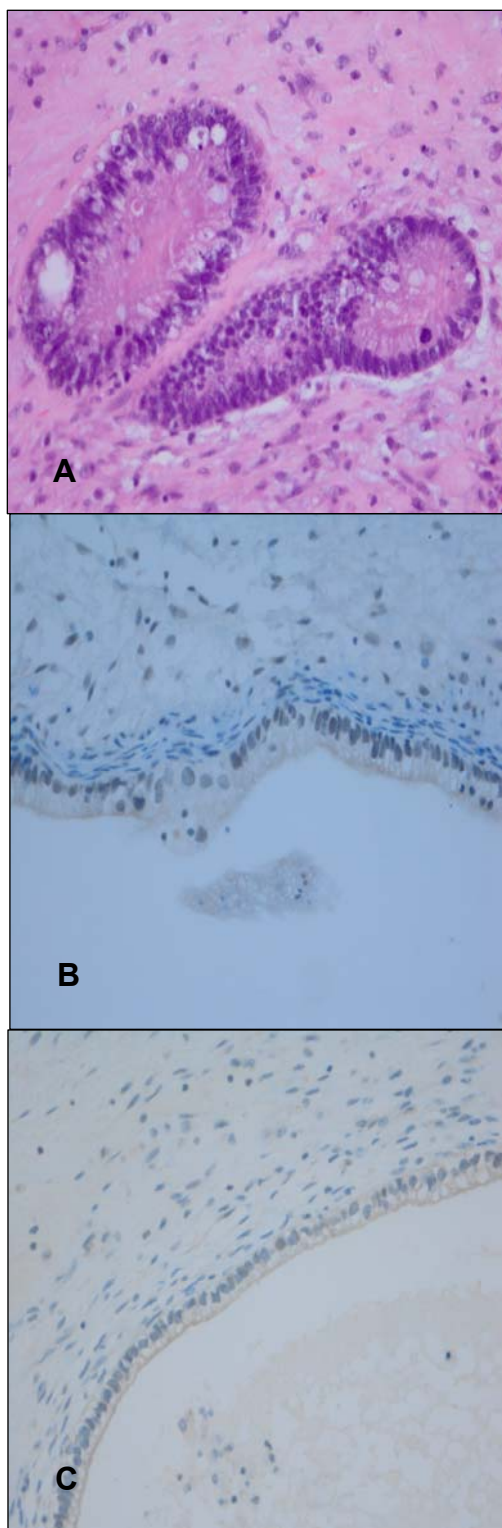


Figura 13 - Neoplasia Não-seminomatosa (400x). Teratoma. A – Coloração com HE. B – IHQ com expressão ausente. C – IHQ com expressão fraca

C Tumor do Saco Vitelino

Expressão ausente em 1 caso (16,7%), fraca em 2 (32,3%), moderados em 2 (32,3%) e forte em 1 caso (16,7%). Sua média de pontos foi de 2,0, menor que o controle ($p=0,01$).

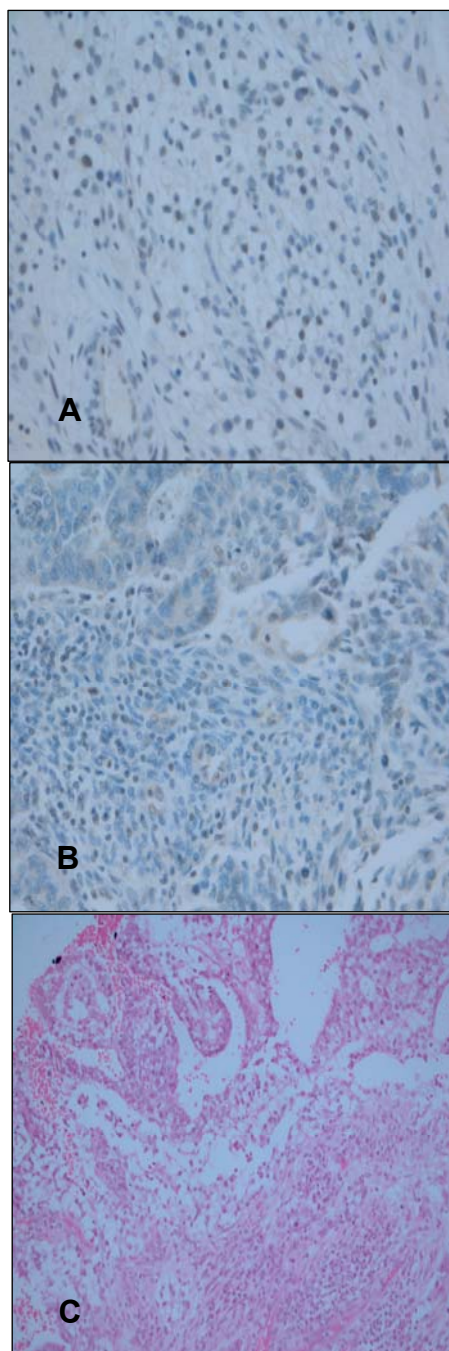


Figura 14 - Neoplasia Não-seminomatosa (400x). Tumor do Saco Vitelino. A - IHQ com reação fraca-B - IHQ com reação fraca. C - Coloração com HE.

D Componente Seminomatoso de Neoplasias não-seminomatosas:

Expressão Fraca em todos os 3 casos, média de 2 pontos inferior ao controle ($p < 0,01$). Na comparação com a expressão do grupo de tumores seminomatosos exclusivos (Grupo IV), não se verificou diferença significativa ($p = 0,51$).

Na Tabela 3 e na Figura 15, abaixo, são apresentadas de forma resumida os níveis de expressão nos grupos estudados.

Tabela 3 - Distribuição dos Grupos Analisados com os respectivos valores de expressão imunoistoquímica do FSHR

FSHR /	Medidas	Resultados
I - Normal *	N	3
	Variação	4
	Mediana	4
	Média ($\pm$ desvio padrão)	4
II - Infértil	N	20
	Variação	0-6
	Mediana	4
	Média ($\pm$ desvio padrão)	3,3 ($\pm$ 0,42)
III - Peritumoral *	N	27
	Variação	0-6
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2,44 ($\pm$ 0,19)
III – Peritumoral com NITTCG *	N	12
	Variação	0-5
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2,08 ($\pm$ 0,37)
IV - Seminoma *	N	16
	Variação	0-5
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2,25 ($\pm$ 0,45)
V - Carcinoma embrionário	N	10
	Variação	0 – 1
	Mediana	0
	Média ($\pm$ desvio padrão)	0,1 ($\pm$ 0,1)
V - Teratoma	N	7
	Variação	0 – 6
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2,71 ($\pm$ 0,89)
V - Tumor do Saco Vitelino	N	6
	Variação	0 – 4
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2 ($\pm$ 0,51)
Componente seminomatoso do Não Seminoma	N	3
	Variação	2
	Mediana	2
	Média ($\pm$ desvio padrão)	2

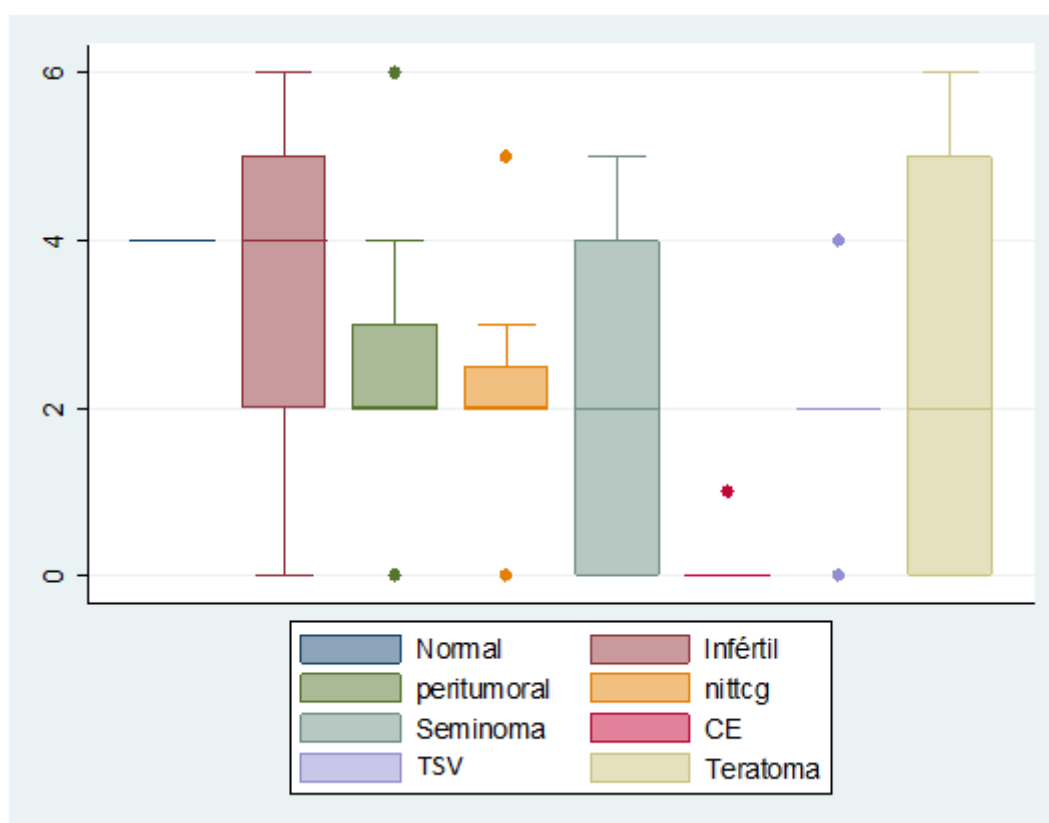


Figura 15 - Representação Gráfica (Boxplot) dos Resultados da Expressão do FSHR nos diferentes grupos histológicos avaliados

5 DISCUSSÃO

O testículo além de órgão fundamental na reprodução humana, pela produção dos espermatozóides, também tem importante papel endócrino e encontra-se sob controle das gonadotrofinas (LH e FSH). O LH atua nas células de Leydig estimulando a produção da testosterona, que além de inúmeras atividades anabólicas e virilizantes, atuam na espermatogênese. O FSH, com ação direta nas células de Sertoli e nas Espermatogônias, junto com a testosterona controla todas as etapas da espermatogênese.

Há muito se observa na prática clínica uma associação entre infertilidade e o desenvolvimento dos TTCCG, sabe-se que grande parte dos portadores desta neoplasia apresentam distúrbios de fertilidade (PETERSEN et al. 1999). E que ambas as afecções apresentam criptorquidia e atrofia testicular como fatores de risco em comum.

Ademais, alterações citogenéticas como a presença da proteína Hiwi, aneuploidia do cromossomo 12, prejuízos no reparo do DNA e instabilidade do cromossomo Y, são eventos comuns na infertilidade e na neoplasia testicular (HOTALING e WALSH 2009).

O advento e propagação dos meios de tratamento de reprodução assistida têm feito com que cada vez mais pacientes inférteis se submetam a exames de investigação etiológica e mesmo em caráter preventivo que incluem um exame físico detalhado e ultrassonografia dos testículos. Não

incomumente ocorre o achado de nódulos testiculares incidentais, e com isso diagnóstico de TTCG em fase inicial ou mesmo de NITTCG.

Nas ultimas décadas, especialmente em países ocidentais, tem sido descrito o aumento tanto de TTCG quanto de Infertilidade. Embora não totalmente comprovado, os estímulos do meio externo parecem desempenhar importante papel neste acontecimento (HORWICH et al. 2006).

Situações que se apresentam com baixos níveis de gonadotrofinas (Hipogonadismo Hipogonadotrófico) nunca desenvolvem neoplasia testicular (WAGNER 1988).

HOULDSWORTH et al. (1997) demonstraram que o desenvolvimento da neoplasia testicular está relacionado a um aumento da produção de ciclina D2 e CDK 4 e 6, cujo gene responsável pela sua produção encontra-se no cromossomo 12p, virtualmente aumentado em 100% dos TTCG (CHAGANTI et al. 1993). SICINSKI et al. (1996) propôs que níveis séricos elevados de FSH poderiam induzir os erros de proliferação celular e favorecer o desenvolvimento dos TTCG, atuando no incremento da produção e na ação de Ciclina D2.

Embora se avenge que níveis séricos elevados do FSH possam estimular a carcinogênese, praticamente inexistem investigações a respeito do papel do seu receptor nesta situação. Não sabemos se nos TTCG e nos demais espectros da STD a expressão dos receptores desta gonadotrofina se encontra aumentada ou diminuída. Tampouco conhecemos possíveis alterações de suas funções.

A hiperatividade da Ciclina D2 com conseqüente inibição do supressor tumoral (gene Retinoblastoma) é passo fundamental na carcinogênese testicular (HOULDSWORTH et al. 1997). A CDK2 tem ação fortemente influenciada pelo FSH (SICINSKI et al. 1996). Talvez FSHR tenha ação fundamental neste passo por intermediar a ação do FSH.

O papel dos receptores hormonais em oncologia é significativo nas neoplasias sólidas. Os receptores de hormônios sexuais em especial dos estrógenos e andrógenos têm sido intensamente estudados. Seus níveis podem representar importante papel no prognóstico e são ainda capazes de influenciar em decisões terapêuticas nas neoplasias de mama e próstata, respectivamente (DAVIES et al. 2011; BIANCHINI e DE BONO 2011).

Estudos que investigam a importância dos receptores hormonais para o desenvolvimento da neoplasia testicular são escassos, porém uma correlação positiva tem sido demonstrado na presença polimorfismo genético em portadores desta neoplasia, inclusive um estudo com investigação do gene do FSHR (FERLIN et al. 2008).

FERLIN et al. (2008) investigaram SNP (single nucleotide polymorphisms) em FSHR de pacientes com neoplasia testicular e identificou um único polimorfismo que predispunha principalmente para o desenvolvimento de neoplasia não seminomatosa, na qual esta SNP fazia com que o receptor apresentasse uma maior atividade a ação do FSH. O autor conclui com este achado (maior efetividade da atividade hormonal) que o FSH teria uma ligação direta com a formação da neoplasia testicular.

Mais recentemente, este mesmo autor provou a correlação do polimorfismo de um gene do metabolismo de esteróides, o 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 4 (HSD17B4), com a gênese da neoplasia testicular. Neste estudo, o risco de neoplasia aumentava 2 vezes por cópia presente de um alelo menor A e 4 vezes com alelo maior A, em substituição pelo alelo maior G neste gene. Esta alteração predispõe a formação de ambos os tipos histológicos, mas de forma mais acentuada para o seminoma. Este achado reforça a idéia de que a tumorigênese testicular sofre importante influência hormonal (FERLIN et al. 2010).

Estudos que investigaram a expressão do receptor de FSH por outras técnicas de biologia molecular, tem avaliado a relação da expressão dos receptores de FSH com o desenvolvimento de neoplasias epiteliais da gônada feminina (ZHENG et al. 1996; MINEGISHI et al. 2000; WANG et al. 2003).

Em condições normais na superfície do epitélio ovariano, no epitélio das trompas de Falópio e nos tumores epiteliais benignos de ovário ocorre a expressão do FSHR (ZHENG et al. 1996; MINEGISHI et al. 2000; WANG et al. 2003). A expressão se acentua de inclusões epiteliais do ovário (lesões benignas) para o cistoadenoma seroso benigno e tumores serosos borderline (WANG et al. 2003). Com o desenvolvimento da neoplasia, verificou-se que a expressão do FSHR reduz gradualmente na dependência da indiferenciação tecidual (WANG et al. 2003). Este fenômeno foi sugerido estar relacionado com um estado independente de estimulação das

gonadotrofinas nas neoplasias ovarianas menos diferenciadas (ZHANG et al. 2009).

No geral, aquele estudo sugeriu que a superexpressão de FSHR pode estar associada com um maior número de vias oncogênicas, que provavelmente também contribuem para a proliferação aumentada das lesões ovarianas benignas (ZHANG et al. 2009).

Frente a essas evidências, fica difícil indissociar o desenvolvimento dos TCG com das alterações da fertilidade humana. Neste sentido SKAKKEBAEK et al. (2001) propuseram a teoria da STD, sustentado por evidências que favorecem um papel de mecanismos endócrinos na gênese das neoplasias testiculares e das outras entidades que constituem os grupos desta síndrome .

Assim nesse estudo inédito objetivamos contribuir para o entendimento de um possível papel do FSHR na STD.e nos TCG Realizamos a investigação da expressão tecidual do FSHR em tipos histológicos distintos de TCG e também nas diversas entidades clínicas englobadas na STD que se apresentam em indivíduos adultos.

Não avaliamos os portadores de hipospádia, uma vez que não seria ético obter amostras de seus parênquimas testiculares e também pelo fato de que nenhum dos homens inférteis e ou portadores de câncer estudados nesta série apresentavam essa malformação, rara na prática diária.

A formação de um grupo com criptorquidia ficou prejudicada pelo fato de que o material que dispunhamos foi proveniente de indivíduos inférteis e com neoplasia, que apresentavam antecedente de criptorquidia.

Para avaliarmos o parênquima testicular criptorquídico sem associação com outras condições clínicas, ou seja, na sua forma pura, teríamos que dispor de tecido de crianças e adolescentes, provenientes de outras intuições, conservadas sob diferentes condições e talvez contendo tecido cicatricial ou inflamatório em grande quantidade, se submetidos à orquiectomia. Se submetidos a pexia testicular, não teríamos agora parênquima para avaliação.

Ademais, existiriam inúmeras variáveis, pois dentre os portadores de criptorquidia há uma miríade de possibilidades: pacientes portadores de criptorquidia uni e bilateral; testículo intrabdominal, inguinal proximal ou distal; pexia pré ou pós puberal; utilização de gonadotrofinas antes da cirurgia e outros não. Ainda assim a maioria dos pacientes submetidos a cirurgia de criptorquidia são crianças, as quais não sofreram estímulos hormonais comuns à puberdade, ao contrário dos demais grupos avaliados.

Em suma acreditamos que um estudo similar, mas preferencialmente prospectivo (para obtenção de material), poderia ser desenhado para análise de gonadotrofinas em parênquima criptorquídico, no qual fatores como a idade de fixação, uso prévio de hormônio (com intuito de estimular a migração testicular), nível e lateralidade da ectopia entre outros devam ser controlados, o que extrapola os escopos de nosso presente estudo.

Entretanto, como nos diversos espectros da STD a criptorquidia é de alta prevalência (devendo ser parte indissociável da síndrome), entedemos que não deveríamos eliminar estes casos, mas apenas consideramos os

antecedentes de criptorquidia como presentes ou ausente em nossos pacientes.

Na comparação de indivíduos inférteis (Grupo II) com e sem antecedente de criptorquidia observamos uma maior expressão do FSHR nos criptorquídeos ($p=0,04$). Esta evidência sugere que estes portadores de criptorquidia apresentam maior expressão do FSHR nestes indivíduos, o que não deve ser extrapolado para demais pacientes inférteis portadores desta afecção gonadal, devido a nossa reduzida amostra.

No grupo com neoplasia (Grupos IV e V) havia 3 indivíduos com antecedente de criptorquidia, dois portadores de neoplasia seminomatosa e um não seminoma.

No caso do não-seminoma, tratava-se de uma neoplasia mista com componentes de Teratoma e TSV. A expressão IHQ do Teratoma foi forte e a do TSV foi moderada. Ambos os tipos histológicos acima caracterizaram-se neste estudo por expressão do FSHR variável e também por tratar-se de um caso único inviabiliza qualquer avaliação da influência da criptorquidia na expressão do FSHR em portadores de neoplasia não-seminomatosa.

Nos dois casos de associação da criptorquidia com neoplasia seminomatosa, observamos uma expressão fraca e outra moderada. No caso da expressão menor chama a atenção que este indivíduo também era portador de infertilidade (espermograma com azoospermia). Porém como acontece com o único caso de não-seminoma, a avaliação de uma correlação da criptorquidia neste grupo fica inviável.

Um ponto importante desta série é o fato de que além, de investigarmos a expressão do FSHR no tecido tumoral, estudamos também nas áreas não afetadas por câncer das respectivas gônadas (tecido peritumoral). Porém, por sabermos que em geral estes pacientes apresentam algum grau de infertilidade ou por aceitarmos que são portadores da STD, não poderíamos considerar este tecido como “normal”, ou mesmo como controle negativo. Assim, optamos por investigar a expressão do marcador no parênquima de homens considerados normais (com prole constituída e histologia preservada) num extremo e num outro extremo, de homens sabidamente inférteis a fim de investigar com qual destes grupos se assemelharia a expressão do tecido peritumoral.

Histologicamente, seu padrão se aproximou ao tecido testicular normal, entretanto, funcionalmente verificamos que expressão do FSHR foi semelhante aos tecidos cancerosos adjacentes. Nem sempre fenótipos considerados celulares normais mantem integridade funcional. Podem concorrer para isso inúmeros fenômenos genético e epigenéticos.

A colaboração de uma instituição voltada a reprodução foi de suma importância para este estudo, dada natureza da nossa instituição, que não dispõe de material de indivíduos inférteis sem câncer. Reiteramos que o material estocado no Hospital Peróla Byigton foi armazenado sob as mesmas condições que na nossa instituição. E teve as reações IHQ aqui realizadas sob metodologia idêntica.

Reconhecemos como limitação do nosso estudo o número reduzido de indivíduos no grupo controle (n=3), com faixa etária diferente da esperada

para o desenvolvimento da neoplasia testicular e que apresentavam neoplasia prostática, doença com importante correlação hormonal (dependência androgênica) e na qual um outro receptor hormonal, o receptor de andrógenos (AR - Androgen Receptor) desempenha funções fundamentais na susceptibilidade ao câncer, no seu comportamento biológico e de modo extremamente importante nas fases em que a doença se torna refratária a castração. Neste período em especial o AR sofre um grande aumento quantitativo, qualitativo e perversões de função (AHMED et al. 2000).

Sendo assim, a expressão moderada dos receptores de FSH em nosso grupo controle poderia ser vista de forma cautelosa. Poderíamos considerar uma possível sub-expressão nestes homens, em comparação ao que seria esperado para indivíduos jovens (15 – 40 anos), férteis e com ausência de qualquer tipo de neoplasia, que em tese seriam os controles ideais.

Todavia conforme consideramos anteriormente, a permissão a nossa solicitação para obtenção de tecido testicular de jovens sadios candidatos a doação de órgãos e tecidos com objetivo de transplantes, não foi obtida junto as autoridades sanitárias e de transplante federais (Anexo 6).

Entretanto, sabemos que nos homens, ao contrário do que ocorre nas mulheres, a capacidade da produção de gametas pouco se altera com o avanço da idade. Trabalhos investigando infertilidade e idade mostra que as alterações no espermograma estão relacionadas com o padrão histológico de cada indivíduo (KÜHNERT e NIESCHLAG 2004) e não com a sua idade,

ou seja, o fator determinante para uma espermatogênese preservada encontra-se na presença de uma histologia testicular normal. DAKOUANE-GIUDICELLI et al. (2006) numa investigação com envolvia indivíduos de 29 a 102 anos, encontrou espermatogênese preservada em indivíduos com idade superior aos 95 anos.

A presença de neoplasia prostática nos indivíduos que compõem o grupo controle, doença que sofre importante influência da testosterona e na quais os receptores de andrógeno têm importante implicação fisiopatológica, prognóstica e terapêutica poderia ser um fator desfavorável ao nosso grupo controle. No entanto, na literatura não existem estudos que correlacionem o desenvolvimento desta neoplasia com a ação de FSH ou mesmo com os níveis séricos desta gonadotrofina. Tampouco encontramos correlações de infertilidade com o desenvolvimento da neoplasia prostática (WALSH 2011).

O número de controles também resultou da dificuldade de obtenção do material, pois obrigatoriamente deveriam ser de indivíduos virgens de tratamento hormonal previamente a orquiectomia e que tivessem paternidade comprovada, sendo que só obtivemos 3 de um total de 40 pacientes pesquisados. Todos os indivíduos selecionados tinham evidências histológicas de espermatogênese preservada com presença de espermatozóides nas lâminas.

A realização de um espermograma com objetivo de provar capacidade reprodutiva preservada nestes controles, só seria possível no período per-operatório imediato a orquiectomia (considerando risco de infertilidade auto-imune e a duração limitada de espermatozóides nas vias

seminais), o que seria impossível e desnecessária em nossa análise retrospectiva, uma vez que se encontravam já castrados.

Em relação ao tamanho da casuística dos indivíduos com neoplasia, a dificuldade para a obtenção do material foi devido a nosso critério de seleção. Objetivando garantir uma reação imunoistoquímica mais fidedigna (reduzindo o risco de falhas do método), selecionamos apenas espécimes parafinados com correspondente material estocado no banco de tecido fresco desta instituição, disponível a partir de 2005 (submetidos a um controle rigoroso na coleta deste material). Outro motivo é que o Hospital AC Camargo trata-se de um hospital terciário, na qual grande parcela dos indivíduos são admitidos já tendo sido submetidos à orquiectomia nos serviços de origem e vem para a instituição com objetivo de realizar o seu tratamento complementar. Os espécimes de outras instituições configuram material coletado e estocado sob condições distintas das nossas.

A análise da expressão IHQ do FSHR nos grupos avaliados mostrou uma perda progressiva da mesma, quando comparamos o grupo controle com os inférteis e com os portadores de neoplasia. Mostrando que a expressão IHQ do FSHR teve correlação inversa com o grau de diferenciação tecidual.

Metade dos indivíduos inférteis apresentou uma menor expressão que o controle, apesar de sem significância estatística, (o que deve ser visto com ressalvas em virtude do tamanho da amostra). Neste grupo, pudemos testar a correlação de outros fatores para a expressão do FSHR: a idade, valor sérico do FSH e da Testosterona, exceto pela ausência ou baixa expressão

em 4 indivíduos hipogonádicos, todos portadores hpogonadismo hipergonadotrófico (casos 7,9,16 e 19 do grupo inférteis), o que denota a falência da gônada como um todo, o que pode justificar esta baixa expressão do FSHR, não houve correlação entre estes fatores e a expressão de FSHR. Ressaltamos que esses indivíduos não apresentavam neoplasia germinativa invasiva ou mesmo NITTCG.

A expressão do tecido peritumoral sem a presença de células com NITTCG encontrava-se diminuída em todos os casos independentes do tipo histológico (seminoma ou não-seminoma) quando comparada com o grupo controle. O mesmo comportamento ocorreu no tecido peritumoral com células com NITTCG. Este tecido provavelmente participa de interações biomoleculares, intercelulares e a nível de matriz extracelular com o tecido maligno adjacente. Provavelmente, desta interação resulte numa expressão do FSHR mais semelhante ao da neoplasia existente, que foi inferior a verificada dos controles normais. Embora fenotipicamente preservadas, as células peritumorais talvez sofram alterações similares nos seus FSHR a verificada do tecido tumoral.

A expressão de FSHR nas células de NITTCG dos tecidos peritumorais, esteve diminuída em relação ao controles e manteve também padrão semelhante ao do tecido peritumoral sem NITTGC, talvez pelas mesmas razões acima.

Sabemos que a NITTCG é encontrada não somente nos testículos com TTCG, mas também nos testículos contra-laterais aos acometidos por TTCG e em diversas afecções benignas testiculares como na criptorquidia

(4%) e indivíduos inférteis (1%) (SKAKKEBAEK et al. 1987), os quais estão correlacionados a entidades clínicas e padrões histológicos adjacentes distintos.

Aproximadamente apenas 50% dos casos de NITTCG progridem para a forma invasiva das neoplasias testiculares num período de 5 anos (JORGENSEN et al. 1990). Deste modo, em nosso estudo devemos ressaltar que os achados de expressão do FSHR, se referem apenas a células de NITTCG do tecido peritumoral. Ou seja, expressa apenas o padrão de pacientes com NITTCG que desenvolveram o câncer. Embora acreditemos que devam ter expressão similar aos demais casos de NITTCG, estes achados não representam de forma inequívoca o padrão de expressão dos casos que não apresentam o TTCG concomitante.

Investigar estes casos seria sobremaneira difícil uma vez que a biópsia testicular para pesquisa de NITTCG é controversa, pois o resultado falso-negativo não é incomum e estes indivíduos necessitam de seguimento, o tratamento com radioterapia causa infertilidade irreversível e distúrbio hormonal em 25% dos casos por prejuízos das células de Leydig. Considerando a ressecção local de tumor metacrônico uma opção viável e efetiva, muitos autores não recomendam mais a realização de biópsia contra-lateral em portadores de neoplasia testicular (Heidenreich 2009). . Nas demais situações em que a NITTCG acompanham moléstias benignas a biópsia não é recomendada. Sua proposição nos parece não-ética e não isenta de morbidade.

O padrão de expressão dos tipos histológicos neoplásicos em nosso estudo parece respeitar em parte os conceitos estabelecidos por estudos de tumorigênese testicular (KRISTENSEN et al. 2008), com diminuição da sua expressão numa correlação inversa a diferenciação tecidual. Estudos de microarranjos que investigam a expressão de genes mostram a que a neoplasia seminomatosa deriva diretamente da NITTCG e que dentre os não seminomas, o CE apresenta expressão de células embrionárias (SPERGER et al. 2003; SANTAGATA et al. 2007).

WANG et al. (2003) utilizando técnicas de biologia molecular em neoplasias epiteliais ovarianas observou uma perda progressiva da expressão do FSH em tecidos de maior indiferenciação. Este achado foi concordante com os nossos achados na neoplasia testicular.

HOULDSWORTH et al. (1997) investigando a expressão imunoistoquímica tecidual de Ciclina D2, observou uma variação dependente da diferenciação tumoral. Esteve ausente no tecido testicular normal, apresentou elevada expressão nas NITTCG, Seminomas e no Carcinoma Embrionário, manteve um padrão variável nos Teratomas e no TSV. Este e o nosso achado mostram que a expressão do FSHR provavelmente tenham uma correlação inversa com a da Ciclina D2, responsável por replicação celular, enquanto que a capacidade de diferenciação determinada pela ação do FSH encontra-se diminuída em neoplasia mais indiferenciadas.

Em recente pesquisa de nosso grupo MONIZ et al. (2012), estudando a presença de marcadores expresso por células tronco tumorais (NANOG, DPPA4, e CCND2) por IHQ em neoplasias não seminomatosas evidenciou

que estes marcadores presentes em célula tronco embrionária (NANOG, DPPA4) e a CCND2, apresentaram maior expressão em NITTCG, CE e seminomas quando comparado com tumores mais diferenciados como o Teratoma, TSV e Coriocarcinoma, os quais tem menor totipotencialidade.

A neoplasia seminomatosa é considerada como um tecido de pouca diferenciação, o que talvez justifique a baixa expressão do FSHR dos tecidos seminomatosos e nas respectivas áreas peritumorais. O mesmo comportamento se verificou nas áreas de componentes seminomatosos dos pacientes com tumores não seminomatosos da nossa amostra (3 pacientes).

Nesta casuística todos os seminomas eram do tipo seminoma clássico. Os tipos anaplásico e espermatocítico não foram representados devido ao acaso por configurarem tipos histológicos bastante raros, representando aproximadamente menos de 15% do total de seminomas (RICHIE e STEELE 2007). O tipo espermatocítico acomete homens mais idosos e tem tumorigênese não relacionada com a presença de NITTCG (VISFELDT et al. 1994), ou seja, em tese não seguem o padrão estabelecido para o Seminoma Clássico.

É aceito que o Carcinoma Embrionário seja o responsável por originar as demais neoplasias não-seminomatosas e que o mesmo tenha origem de um processo de indiferenciação da NITTCG adquirindo um padrão de células tronco embrionária (SPERGER et al. 2003; SANTAGATA et al. 2007), altamente indiferenciadas, o que justificaria a ausência quase total dos receptores neste tipo histológico. O mesmo comportamento verificamos

em nosso estudo com marcadores de células tronco, já descrito acima, de expressão elevada no CE (MONIZ et al. 2012).

Alguns autores defendem que o processo de diferenciação do Carcinoma Embrionário dá origem aos demais tipos histológicos não seminomatosos: TSV, Teratoma e o Coriocarcinoma. Ocorrido através de regulação negativa e inativação de genes pluripotenciais (SKOTHEIM et al. 2005; KORKOLA et al. 2005). Estas neoplasias derivadas do CE apresentam uma vasta diversidade de diferenciação tecidual (HOULDSWORTH et al. 1997).

A expressão do FSHR no Teratoma não respeitou nenhum padrão uniforme, variando desde a ausência até forte expressão. Este fato poderia ser justificado pela alta capacidade de diferenciação em qualquer uma das camadas de tecido embrionário dos teratomas e pela possível suscetibilidade individualizada a ação do FSH dos diversos tipos histológicos especializados resultantes de suas diferenciação.

Um estudo de HONECKER et al. (2006) sobre o TSV mostrou uma alta capacidade de diferenciação deste tipo histológico não-seminomatoso. A expressão do FSHR no TSV foi bastante variável, da mesma forma que foi evidenciado nos teratomas (tipo histológico com alta capacidade de diferenciação tecidual, já diferenciado), porém os valores apresentados pelo TSV foram menores que o do Teratoma, coincidindo com o padrão de diferenciação normalmente observado nestas neoplasias.

Não tivemos nesta casuística componente de coriocarcinoma para análise e de expressão do FSHR. Apesar da seleção inicial de 3 casos

portadores de neoplasia com presença do Coriocarcinoma nas lâminas convencionais, a sua amostra não esteve disponível nas parafinas estocadas. Trata-se de um tipo histológico incomum e usualmente de pequeno tamanho e por vezes associado à hemorragia ou cicatrização.

Um fato curioso é que os TSV e os teratomas tiveram maior expressão em comparação ao carcinoma embrionário. Curiosamente o TSV é o tumor testicular germinativo mais comum na infância, seguido pelo Teratoma. Crianças pré-púberes não sofrem ação de gonadotrofinas, as quais só se estabelecem na puberdade. Assim não sabemos se o receptor de FSH se associa a gênese da doença nos adultos, mas parece que realmente se relaciona com a diferenciação e especialização celular.

Uma vez que indivíduos portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico costumam ter comprometida a espermatogênese. Tomamos o cuidado de excluir os casos de hipogonadismo ou que fizessem uso de drogas que influenciassem o nível sérico da testosterona. Como na prática clínica a dosagem de testosterona, LH e FSH, não fazem parte dos “guidelines” do manejo das TTG, nos baseamos nas informações de prontuários, descartando casos com suspeita clínica. Já no grupo dos inférteis dispúnhamos da dosagem dos mesmos. Ademais o hipogonadismo nestas faixas etárias, é entidade rara na população masculina, o que assegura nossos achados.

Sabemos que a metodologia de imunoistoquímica é passível de inúmeros pontos de falha (ZEQUI 2000; YAZIJI e BARRY et al. 2006, FRITSCHY 2008). O longo tempo e as condições de armazenamento

tecidual, emprego de formol não tamponado, aspectos dos diversos passos desde a desparafinização, desidratação tecidual, recuperação antigênica, ação de corantes endógenos e qualidade de anticorpos primários e secundários, a espessura do material seccionado, a adesivagem das lâminas, tudo isto pode influenciar positiva ou negativamente a antigenicidade tecidual e qualidade das reações. A experiência e motivação dos indivíduos envolvidos na leitura e interpretação do material permitem também viése de subjetividade.

Ressaltamos que nesse estudo o material foi coletado a partir de 2005 sofrendo mínima ação do tempo, foi estocado e parafinado sob condições ideais com formol tamponado e com técnica esmerada nesta instituição. A leitura do material se deu por pessoal experimentado e colaborativo.

Ainda sim, diversos eventos biomoleculares, proteômicos ou genômicos podem influenciar a hipo ou a hiperexpressão de um determinado marcado a imunoistoquímica. Deste modo, faz-se necessária a comprovação e validação de nosso achados com emprego de metodologias não sujeitas as variáveis acima listadas. Assim, já se encontra em andamento a análise desta série pela técnica de Real Time - Polymerase Chain reaction (RT PCR), que em breve nos permitirá futuras avaliações e comparações com os achados de FERLIN et al. (2008) autor italiano que descreveu polimorfismos dos receptores em sua série. Por este motivo, selecionamos material parafinado de casos que tivessem em correspondência material fresco estocado.

Vislumbramos futuramente avaliar de forma prospectiva o FSHR e receptores de Andr geno em conjunto com dosagens séricas do FSH e Testosterona, bem como correlacionar seus níveis de expressão com marcadores tumorais (B-HCG, AFP E DHL). Uma vez que na STD várias etapas da atividade da gônada masculina estão envolvidas, sabemos que a testosterona exerce controle na espermatogênese e na espermiog nese, e em última instância sofre regula o do LH, acreditamos que essa gonadotrofina e seu receptor devam ser objetos futuros de investiga o.

6 CONCLUSÕES

Observamos nas entidades representadas da SDT um padrão de perda progressiva da expressão do FSHR com uma relação inversa a diferenciação tecidual.

A expressão do FSHR em relação aos tipos histológicos neoplásicos manteve um padrão no Carcinoma Embrionário (ausente) e tendeu a fraca no Seminoma. Observamos uma expressão variável no Teratoma e no TSV, sendo que neste último há uma tendência a menor expressão que no Teratoma e no Seminoma.

As células com NITTCG peritumoral tem expressão do FSH inferior aos controles e aos inférteis. Seu nível de expressão se assemelha ao do respectivo tecido tumoral adjacente sem diferença significativa entre os seminomas e os não-seminomas.

O tecido peritumoral tem níveis de expressão do FSHR similares em áreas com e sem NITTCG.

O FSHR parece estar associado aos processos de diferenciação celular na neoplasia germinativa testicular de adultos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, et al: Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:658-65.

Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al. **Guidelines on testicular cancer: European Association of Urology**. 2011. Available from: <URL:http://www.uroweb.org/gls/pdf/10_Testicular_Cancer.pdf> [2012 jan 12].

Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E, et al. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. **FASEB J** 1998; 12:1045-54.

Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, et al. Increase in testicular cancer in six European countries: a birth cohort phenomenon. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:727-33.

Bianchini D, de Bono JS. Continued targeting of androgen receptor signalling: a rational and efficacious therapeutic strategy in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Eur J Cancer** 2011; 47 Suppl 3:S189-94.

Boisen KA, Kaleva M, Main KM, et al. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. **Lancet** 2004; 363:1264-9.

Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, et al. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:4041-6.

Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. **N Engl J Med** 1997; 337:242-53.

Chaganti RS, Rodriguez E, Bosl GJ. Cytogenetics of male germ-cell tumors. **Urol Clin North Am** 1993; 20:55-66.

Chaganti RSK, Murty VVVS, Bosl GJ. Molecular genetics of male germ cell tumors. In: Vogelzang NJ, Shipley WU, Scardino PT, Coffey DS, editors. **Comprehensive textbook of genitourinary oncology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1996. p.932-40.

Conlon I, Raff M. Size control in animal development. **Cell** 1999; 96:235-44.

Dakouane-Giudicelli M, Bergère M, Albert M, et al. Late paternity: spermatogenetic aspects [abstract]. **Gynecol Obstet Fertil** 2006; 34:855-9.

Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet** 2011; 378:771-84.

de Kretser DM, Meinhardt A, Meehan T, et al: The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. **Mol Cell Endocrinol** 2000; 161:43-6.

Ferlin A, Pengo M, Selice R, Salmaso L, Garolla A, Foresta C. Analysis of single nucleotide polymorphisms of FSH receptor gene suggests association with testicular cancer susceptibility. **Endocr Relat Cancer** 2008; 15:429-37.

Ferlin A, Ganz F, Pengo M, Selice R, Frigo AC, Foresta C. Association of testicular germ cell tumor with polymorphisms in estrogen receptor and steroid metabolism genes. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:17-25.

Fritz IB. Sites of action of androgens and follicle-stimulating hormone of cells of the seminiferous tubule. In: Titwack G, editor. **Biochemical action of hormones**. New York: Academic Press; 1978. v.5. p.249-81.

Fossa 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.

Fritschy JM Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. **Eur J Neurosci** 2008; 28:2365-70.

Gromoll J, Ried T, Holtgreve-Grez H, Nieschlag E, Gudermann T. Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. **J Mol Endocrinol** 1994; 12:265-71.

Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. **J Mol Med (Berl)** 1995; 73:51-63.

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

Honecker F, Stoop H, Mayer F, et al. Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. **J Pathol** 2006; 208:395-400.

Horwich A, Shipley J, Huddart R. Testicular germ-cell cancer. **Lancet** 2006; 367:754-65.

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.

Hotaling JM, Walsh TJ. Male infertility: a risk factor for testicular cancer. **Nat Rev Urol** 2009; 6:550-6.

Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. **BMJ** 2000; 321:789-92.

Jardim CRF, Lorenzini F. Fatores de risco e prevenção da infertilidade no homem. **Int Brz J Urol** 2003; 29(Suppl.5):7-9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

Jorgensen N, Müller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Clinical and biological significance of carcinoma in situ of the testis. **Cancer Surv** 1990; 9:287-302.

Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F. Regional differences in semen quality in Europe. **Hum Reprod** 2001; 16:1012-9.

Kangasniemi M, Kaipia A, Toppari J, Perheentupa A, Huhtaniemi I, Parvinen M. Cellular regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) binding in rat seminiferous tubules. **J Androl** 1990; 11:336-43.

Korkola JE, Houldsworth J, Dobrzynski D, et al. Gene expression-based classification of nonseminomatous male germ cell tumors. **Oncogene** 2005; 24:5101-7.

Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. **Hum Reprod** 1998; 13(Suppl 1):1-8.

Kristensen DM, Sonnea SB, Ottesena AM, et al. Origin of pluripotent germ cell tumours: The role of microenvironment during embryonic development. **Mol Cell Endocrinol** 2008; 288:111-8.

Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. **Hum Reprod Update** 2004; 10:327-39.

Ladanyi M, Samaniego F, Reuter VE, et al. Cytogenetic and immunohistochemical evidence for the germ cell origin of a subset of acute leukemias associated with mediastinal germ cell tumors. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82:221-7.

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.

Matsui Y. Regulation of germ cell death in mammalian gonads. **APMIS** 1998; 106:142-8.

McGlynn KA, Cook MB. Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. **Future Oncol** 2009; 5:1389-402.

McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. **Hum Reprod** 2007; 22:2-16.

Minegishi T, Kameda T, Hirakawa T, Abe K, Tano M, Ibuki Y. Expression of gonadotropin and activin receptor messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial neoplasms. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2764-70.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Tipos de câncer: testículo.** 2009. Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/testiculo>> [2012 jan 12].

Moniz RR, Costa WH, Fanni VSS, et al. Immunohistochemical expression of cancer stem cell markers OCT3/4, NANOG, DPPA4, and CCND2 in testicular germ cell tumors. In: **Proceedings of the Genitourinary Cancers Symposium – ASCO**; 2012. Abstract ID:333. February 2-4, 2012, in San Francisco, California

Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, et al. Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. **Oncogene** 1998; 16:2617-27.

Mueller T, Voigt W, Simon H, et al. Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. **Cancer Res** 2003; 63:513-21.

Oliver T. Epidemiology of testis cancer. In: Vogelzang NJ, Shipley WU, Scardino PT, Coffey DS, editors. **Comprehensive textbook of genitourinary oncology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 2005. p.547-58.

Orth J, Christensen AK. Autoradiographic localization of specifically bound 125I-labeled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. **Endocrinology** 1978; 103:1944-51.

Packer AI, Besmer P, Bachvarova RF. Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. **Mol Reprod Dev** 1995; 42:303-10.

Petersen PM, Skakkebaek NE, Vistisen K, Rørth M, Giwercman A. Semen quality and reproductive hormones before orchiectomy in men with testicular. **J Clin Oncol** 1999; 17:941-7.

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.

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 e Hoei-Hansen CE. From gonocytes to testicular cancer the role of impaired gonadal development. **Ann NY Acad Sci** 2007; 1120:168-80.

Richiardi L, Bellocco R, Adami HO, et al. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:2157-66.

Richie JP, Steele GS. Neoplasms of the testis. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. **Campbell-Walsh urology**. 9th ed. Philadelphia: W B Saunders; 2007. p.893-935.

Rousseau-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. **Genomics** 1993; 15:222-4.

Santagata S, Ligon KL, Hornick JL. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:836-45.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. **Pure Appl Chem** 2003; 75:2023-38.

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

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. **Fertil Steril** 2008; 89(Suppl 1):e33-8.

Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, et al. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. **Nature** 1996; 384:470-4.

Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. **Int J Androl** 1987; 10:19-28.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? **APMIS** 1998; 106:3-11; discussion 12.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Hum Reprod** 2001; 16:972-8.

Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. **Nat Rev Genet** 2006; 7:319-27.

Sperger JM, Chen X, Draper JS, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:13350-5.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. **Cell Death Differ** 2003a; 10:808-22.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. **J Pathol** 2003b; 200:137-48.

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.

Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology** 2006; 49:411-24.

Visfeldt J, Jorgensen N, Muller J, Moller H, Skakkebaek NE. Testicular germ cell tumours of childhood in Denmark, 1943–1989: incidence and evaluation of histology using immunohistochemical techniques. **J Pathol** 1994; 174:39-47.

Vos A, Oosterhuis JW, de Jong B, Buist J, Schraffordt Koops H. Cytogenetics of carcinoma in situ of the testis. **Cancer Genet Cytogenet** 1990; 46:75-81.

Wagner G. Grundlagen, aufgaben und Ziele der epidemiologischen krebsforschung [abstract]. **Med Welt** 1988; 39:348-52.

Walsh TJ. Male reproductive health and prostate cancer risk. **Curr Opin Urol** 2011; 21:506-13.

Wang J, Lin L, Parkash V, Schwartz PE, Lauchlan SC, Zheng W. Quantitative analysis of follicle-stimulating hormone receptor in ovarian epithelial tumors: a novel approach to explain the field effect of ovarian cancer development in secondary mullerian systems. **Int J Cancer** 2003; 103:328-34.

Weinbauer GFW, Nieschlag E. Hormonal control of spermatogenesis. In: De Kretser D, editor. **Molecular biology of the male reproductive system**. San Diego, CA: Academic Press; 1993. p.99-142.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell** 1995; 81:323-30.

Yaziji H, Barry T. Diagnostic Immunohistochemistry: what can go wrong? **Adv Anat Pathol** 2006; 13:238-46.

Zequi SC. **Correlação entre os fatores clínicos e anatomopatológicos associados aos índices de proliferação celular como prognósticos em portadores de câncer do rim tratados por cirurgia**. São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Zhang Z, Jia L, Feng Y, Zheng W. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor facilitates the development of ovarian epithelial cancer. **Cancer Lett** 2009; 278:56-64.

Zheng T, Holford TR, Ma Z, Ward BA, Flannery J, Boyle P. Continuing increase in incidence in germ-cell testis cancer in young adults: experience from Connecticut, USA, 1935-1992. **Int J Cancer** 1996; 65:723-9.

Anexo 1 - Formulário de Pesquisa – Grupo Normal

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1 NOME: _____ (_____)sigla

1.2 PRONTUÁRIO: _____ (_____)registro

1.3 DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ IDADE : (_____)idade

2) DADOS CLÍNICOS:

2.1 Etiologia: __ (1) Neoplasia Prostática (2) Infertilidade _____
(_____) etiologia

2.2 FSH PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____) fsh_pré

2.3 Prolactina PRÉ-OP: __ (99) ignorado _____ (_____) prolac_pré

2.4 Teste PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____) Teste_pré

2.5 PSA PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)psa_pré

Anexo 2 - Formulário de Pesquisa – Grupo Infértil

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1 NOME: _____
(_____)sigla

1.2 PRONTUÁRIO:
(_____)registro

1.3 DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ IDADE :
(_____)idade

2) DADOS CLÍNICOS:

2.1 FSH PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)fsh_pré

2.2 Prolactina PRÉ-OP: __ (99) ignorado _____ (_____)prolac_pré

2.3 Teste PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)Teste_pré

2.4 CRIPTORQUIDIA: (0) não (1) sim (99) ignorado _____ (_____)cripto

3) DADOS DO ANATOMOPATOLÓGICO:

3.1 DATA DA CIRURGIA: _____ (____ / ____ / ____)data

3.2 HISTOPATOLÓGICO: (1) Parada da Maturação (2) Sertoli-only (3) Atrofia
(4) Hipoespermato gênese _____ (_____)histop

3.3 – ESPERMATOZÓIDE: (0) Ausente (1) Presente _____ (_____)sptz

Anexo 3 - Formulário de Pesquisa – Grupo Neoplasia

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1 NOME: _____ (_____)sigla

1.2 PRONTUÁRIO: _____(_____)registro

1.3 DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ IDADE : (_____)idade

2) DADOS CLÍNICOS:

2.1 FSH PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)fsh_pré

2.2 LH PRÉ-OP: __ (99) ignorado _____ (_____)lh_pré

2.3 DHL PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)dhl_pré

2.4 α -feto PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____) α _pré

2.5 β -HCG PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____) β _pré

2.6 Testo PRÉ-OP: _ (99) ignorado _____ (_____)Testo_pré

2.7 PATERNIDADE: (0) não (1) sim (99) ignorado _____ (_____)patern

2.8 CRIPTORQUIDIA: (0) não (1) sim (99) ignorado _____ (_____)cripto

2.9 TUMOR CONTRA-LATERAL: (0) não (1) sim (99) ignorado (_____) ant_tu

3) DADOS DO ANATOMOPATOLÓGICO:

3.1 DATA DA CIRURGIA: _____ (___/___/___)data

3.2 LATERALIDADE: (1) Esquerdo (2) Direito _____ (_____) lat

3.3 HISTOPATOLÓGICO: (1) Seminoma (2) Não-seminoma (3)

Misto (_____) histol

3.3.2 – NÃO-SEMINOMA: (1) Embrionário (2) Coriocarcinoma_____

(3) Saco Vitelíneo (4) Teratoma_____ (_____)n_semin

3.3.3 – MISTO: (1)Seminoma (2) Embrionário (3)Coriocarcinoma_____

(4)Saco Vitelíneo (5) Teratoma_____ (___/___/___)misto

3.5 – NEOPLASIA INTRA-TUBULAR: (0) Ausente (1) Presente _____

(_____) NITTCG

3.6 - ESTADIO _____ (_____)pTNM

Anexo 4 - Aprovação do Projeto junto ao CEP do Hospital AC Camargo

**Hospital
A.C. Camargo**
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 17 de Agosto de 2010.

Ao
Dr. Stênio de Cássio Zequi

OK! lançada!

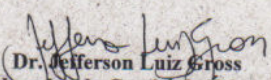
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1412/10
"Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido testicular tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/08/2010, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/05/2010, aprovaram a realização do projeto em referência, e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Apêndice 1 – Consentimento pós-informado grupos I, II, III e IV + grupo V (indivíduos tratados para câncer de próstata);
- Apêndice 2 – Justificativa para a não aplicação de um TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) para as amostras prospectivas (Grupo V) – Sequência de e-mail que comprovam o comprometimento da Central de Transplante de São Paulo em colaborar com a pesquisa e condições para a colaboração;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Patologia do Centro de Referência da Saúde da Mulher/Hospital Pérola Byington;

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


(Dr. Jefferson Luiz Gross)
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06
Rua Prof. Antônio Prudente, 214 – Liberdade – São Paulo, SP – 01509-900
Telefone: (11) 2189-5000
www.accamargo.org.br

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1412/10

Título: "Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido testicular tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis"

Pesquisador Responsável: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Co-Pesquisadores: Rafael Malagoli Rocha e Sidney Glina

Aluno: Victor Silvestre Soares Fanni (Mestrado)

Patrocinador: Será solicitado auxílio financeiro à FAPESP

Comentários gerais:

Os tumores testiculares de células germinativas (TTCG) compreendem cerca de 2% das neoplasias no sexo masculino, sendo a mais comum na faixa etária entre 20 – 40 anos. Sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas no mundo ocidental. O aumento da incidência das neoplasias testiculares ocorreu concomitante com o de distúrbios reprodutivos e má formação do sistema reprodutor masculino (criptorquidia), estas entidades tem sido associadas numa Síndrome de Disgenesia Testicular (SDT), que pode se apresentar como um indivíduo saudável com discreta alteração do espermograma até apresentação da neoplasia testicular em um indivíduo estéril com antecedente de criptorquidia. Condições associadas com alto risco de desenvolvimento de TTCG (Criptorquidismo, Atrofia Testicular e Infertilidade) são também caracterizadas por altos níveis plasmáticos do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e situações que se apresentam com baixos níveis de gonadotrofinas (Hipogonadismo Hipogonadotrófico) nunca desenvolvem tal neoplasia (Wagner et al – 1988). O objetivo deste estudo é ajudar no entendimento da função do FSH para o desenvolvimento dos TTCGs, através do estudo da expressão imuno-histoquímica de seus receptores em diferentes tecidos testiculares que representam fases distintas da Síndrome de Disgenesia Testicular, o tecido normal (ausência da síndrome), pacientes inférteis (manifestação menor) e tecido neoplásico (manifestação maior).

Pendências apontadas em parecer anterior:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

O Pesquisador solicitou a dispensa da apresentação do TCLE, pois o material que será utilizado para o referido projeto (grupos I, II, III e IV) faz parte do arquivo da Anatomia Patológica do Hospital AC. Camargo e do Hospital Pérola Byington.

Apesar de estar descrito no projeto que o TCLE apresentado no apêndice 3 não será aplicado aos familiares e/ou responsável pelo paciente doador de órgãos, salientamos que é necessária a apresentação de uma declaração com justificativa para a não aplicação do TCLE para as amostras que serão coletadas prospectivamente (grupo V).

Local de pesquisa:

Não foi apresentada a Declaração de Ciência e Comprometimento do Hospital Pérola Byington em colaborar com a Pesquisa.

Pendências da Comissão de Pesquisa:

A proposta de trabalho ora apresentada é bastante interessante e apresenta mérito científico. Entretanto o texto apresentado carece de revisão ortográfica, além de alterações de ordem conceitual.

- É dito que serão alocados 20 indivíduos por grupo avaliado, mas não é informado como esse número foi calculado. Foi dito também que se empregará o método da biotina-estreptavidina, entretanto este método não está mais sendo empregado pela anatomia patológica desta instituição. Sugerimos que este tópico seja revisto.
- Foi informado que a expressão de FSH será validada por PCR, mas na verdade será empregado Real Time PCR. Há necessidade de esclarecer qual o método será empregado para avaliar a expressão relativa do FSH (Livak? Pfaffl?).
- GAPDH, b-actina, TBP, B2M e a HPRT são normalizadores e não controles endógenos.

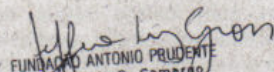
Comentários Finais:

Todas as questões foram esclarecidas pelo pesquisador, e as alterações feitas no texto de maneira adequada. Os documentos faltantes foram providenciados e se encontram anexados ao projeto.

Perante resposta adequada de todas as questões apontadas, consideramos o projeto aprovado.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador

Anexo 5 - Aprovação junto ao CEP do Hospital Pérola Byington



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Protocolo de Pesquisa: **“Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido Testicular Tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis”**, foi avaliado por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerado **APROVADO** sem restrições.

Para tal aprovação, foram seguidas as exigências das Resoluções nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto, foram devidamente enfatizados itens que correspondem ao objetivo do Estudo e seu racional; adequação dos materiais e métodos; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do estudo, bem como possibilidade de interrupção do estudo no caso do paciente julgar conveniente.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da legislação 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

Atenciosamente

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

TÍTULO DO ESTUDO: “Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido Testicular Tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis”.

DECLARAÇÃO

Eu, Victor Silvestre Soares Fanni , venho por meio desta garantir que o uso dos dados coletados serão utilizados exclusivamente para os propósitos do estudo.

São Paulo, 14 de Abril de 2011.

Dr. Victor Silvestre Soares Fanni
Pesquisador



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

TÍTULO DO ESTUDO: "Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido Testicular Tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis".

DECLARAÇÃO

Declaro que fui informado e li na íntegra a Resolução 196 de outubro de 1996 e a Resolução 251 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde e concordo em cumprir os termos destas.

São Paulo, 14 de abril de 2011.

Dr. Victor Silvestre Soares Fanni
Pesquisador



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 14 de Abril de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 30/03/2011

Protocolo nº: 012/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido Testicular Tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis".

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Victor Silvestre Soares Fanni

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa, tendo sido a referida aprovação constado em ata.

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM

Anexo 6 - Parecer Favorável da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – Sistema Estadual de Transplante



**Secretaria de Estado da Saúde
Sistema Estadual de Transplantes**

Of. C.Tx nº 1698/10

São Paulo, 10 de novembro de 2010

Prezado Senhor,

Considerando o Projeto de Pesquisa Nº 1412/10, "Expressão imuno-histoquímica dos Receptores de FSH em tecido testicular tumoral, peri-tumoral, normal e de pacientes inférteis", orientado pelo Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi com vistas à obtenção de título de Mestre do pós-graduando Victor Silvestre Soares Fanni;

Considerando o Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer do Hospital A.C. Camargo, ao projeto acima enunciado, aprovando sua realização;

Considerando as disposições da Lei Nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, do Decreto Nº 2.268, de 30 de junho de 1997, da Lei Nº 10.211, de 23 de março de 2001 e da Portaria GM Nº 2.600 de 21 de outubro de 2009, a qual Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes;

Considerando a Lei Nº 9.434, onde em seu Parágrafo único, determina: "Para os efeitos desta Lei, não estão compreendidos entre os tecidos a que se refere este artigo o sangue, o esperma e o óvulo.";

Considerando o Decreto Nº 2268, onde em seu Parágrafo único, que igualmente determina: "Não estão compreendidos entre os tecidos a que se refere este Decreto o sangue, o esperma e o óvulo.";



Secretaria de Estado da Saúde Sistema Estadual de Transplantes

Considerando o Decreto N° 2268 , onde em seu Art. 4º determina: "A retirada de tecidos, órgãos e partes do corpo de pessoas falecidas para transplantes ou outra finalidade terapêutica, dependerá da autorização do cônjuge ou parente, maior de idade, obedecida a linha sucessória, reta ou colateral, até o segundo grau inclusive, firmada em documento subscrito por duas testemunhas presentes à verificação da morte."

Considerando o Decreto N° 2268, onde em seu Art. 8º determina: "Após a retirada de tecidos, órgãos e partes, o cadáver será imediatamente necropsiado, se verificada a hipótese do parágrafo único do art. 7º, e, em qualquer caso, condignamente recomposto para ser entregue, em seguida, aos parentes do morto ou seus responsáveis legais para sepultamento."

Considerando a Resolução SS N° 151 de 13 de agosto de 2010, em especial na utilização do Termo de Consentimento a Doação de Órgãos e Tecidos e, finalmente,

Considerando que este projeto e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa foram recebidos e avaliados por esta Coordenação, **cumpre-nos informar:**

1. A Coordenação da Central de Transplantes não se opõe à obtenção de 20 amostras de tecido testicular de doadores falecidos, desde que cumpridas as normativas legais e éticas, incluindo manifestação do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), ao qual sugerimos consultar;
2. Que esta Coordenação não promoverá, possibilitará ou autorizará, que as equipes e profissionais responsáveis pela obtenção das amostras realizem qualquer contato com os familiares que autorizaram a doação;

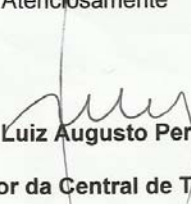


Secretaria de Estado da Saúde Sistema Estadual de Transplantes

3. Que esta Coordenação, por força da Lei e por entendimento ético e bioético não tem poder de autorizar a utilização do tecido em questão, por tratar-se de conteúdo que versa sobre células germinativas e, finalmente,
4. Que esta Coordenação entende que a manipulação, utilização e armazenamento do material em questão deverão encontrar sustentação em legislação vigente de que trata o assunto.

Aproveitando para renovar votos de estima e consideração, subscrevemo-nos.

Atenciosamente


Dr. Luiz Augusto Pereira

Coordenador da Central de Transplantes

**Ilmo. Prof. Dr.
Stênio de Cássio Zequi**



Dr. Stênio de Cássio Zequi
CRM - SP 69356