

REGINA DE PAULA XAVIER GOMES MARTINS BARBOSA

EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA EM SEMINOMAS PUROS E MISTOS

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2002

REGINA DE PAULA XAVIER GOMES MARTINS BARBOSA

EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA EM SEMINOMAS PUROS E MISTOS

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2002

À minha família, que muito sentiu meu distanciamento, e especialmente ao meu filho, Pedro Henrique, que com sua ternura tornou possível a realização de meus objetivos.

A Napoleão José Gomes, meu pai, e à sua esposa, Roseli Blum Gomes, pelo constante incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha, por quem adquiri, ao longo de cinco anos de estudo, enorme consideração e apreço pela sua inteligência, dinamismo e cordialidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Cirurgia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao PROF. DR. ANTONIO CARLOS L. CAMPOS, coordenador do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Aos MEMBROS da banca examinadora, antecipadamente, pela sua prontidão.

Ao PROF. DR. ANTONIO DE PÁDUA G. SILVA, pelos blocos cedidos.

À Biogen Diagnostics, pelo fornecimento de reagentes e anticorpos.

Aos médicos, professores, residentes e funcionários do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná pela sua inigualável receptividade

À IRASSY MARIA VAZ DOS SANTOS, por sua amizade, auxílio e incentivo.

À SUELI MARIA BURIGO, pela sua consciência e amizade.

À IOLANDA SANCHEZ e MAURÍCIO OLIVEIRA pela confecção das lâminas.

À Universidade Tuiuti do Paraná, especialmente ao Diretor PROF. JOÃO HENRIQUE FARYNIUK e aos Coordenadores JUSSARA MARIA CAVALIERI e NATANAEL R. MATTOS

Ao Centro Universitário Positivo, especialmente à Diretora, PROF^a TÂNIA HELLER e aos Coordenadores SONIA REGINA POMPERMEIER, ROBERTO CEPEDA e ROBERTO BOSCARDIN pela amizade, apoio e confiança.

SUMÁRIO

	LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
	LISTA DE GRÁFICOS	vii
	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
1	INTRODUÇÃO	2
1.1	OBJETIVOS.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	NEOPLASIA GERMINATIVA TESTICULAR.....	5
2.1.1	HISTOGÊNESE DA NEOPLASIA GERMINATIVA.....	5
2.1.2	TIPOS HISTOLÓGICOS E EXPRESSÃO ANTIGÊNICA DAS NEOPLASIAS GERMINATIVAS.....	5
2.1.2.1	SEMINOMA.....	5
2.1.2.2	CARCINOMA EMBRIONÁRIO.....	7
2.1.2.3	TERATOMA.....	8
2.1.2.4	TUMOR DO SACO VITELINO.....	9
2.2	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	10
2.2.1	FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	10
2.2.1.1	CITOQUERATINAS.....	11
2.3	MARCADORES TUMORAIS.....	13
2.3.1	ALFA- FETOPROTEÍNA.....	13
3	MATERIAL E MÉTODO	15
3.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA	15

3.2	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	16
3.3	DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA.....	16
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4	RESULTADOS	18
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO I	44
	ANEXO II	52
	ANEXO III	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DAS NEOPLASIAS GERMINATIVAS.....	7
QUADRO 2	FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS – EXPRESSÃO EM TECIDOS NORMAIS E EM NEOPLASIAS.....	11
QUADRO 3	CITOQUERATINAS – PESO MOLECULAR E DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS NORMAIS.....	12
TABELA 1	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – SEMINOMA PUROS E MISTOS.....	18
TABELA 2	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – VARIANTES DO SEMINOMA PURO.....	19
TABELA 3	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – COMPOSIÇÃO DOS SEMINOMAS MISTOS.....	23
TABELA 4	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7.....	24
TABELA 5	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS PUROS E NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS.....	26
TABELA 6	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS CONFORME AS DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE NEOPLASIAS	27
TABELA 7	POSITIVIDADE DA CITOQUERATINA 7 NA NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS.....	28
TABELA 8	EXPRESSÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA CONFORME O TIPO DE NEOPLASIA.....	30
TABELA 9	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E ELEVAÇÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA NAS DIVERSAS NEOPLASIAS.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – SEMINOMAS PUROS E MISTOS.....	19
GRÁFICO 2	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – VARIANTES DO SEMINOMA PURO.....	19
GRÁFICO 3	DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS – COMPOSIÇÃO DOS SEMINOMAS MISTOS.....	23
GRÁFICO 4	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7.....	24
GRÁFICO 5	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS PUROS E NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS.....	26
GRÁFICO 6	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS CONFORME AS DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE NEOPLASIAS.....	27
GRÁFICO 7	POSITIVIDADE DA CITOQUERATINA 7 NA NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS.....	28
GRÁFICO 8	ELEVAÇÃO DA ALFA-FETOPROTEÍNA CONFORME O TIPO DE NEOPLASIA.....	30
GRÁFICO 9	EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E ELEVAÇÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA NAS DIVERSAS NEOPLASIAS.....	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CONTROLE EXTERNO POSITIVO – DUCTO MAMÁRIO.....	17
FIGURA 2	CONTROLE INTERNO POSITIVO – EPIDÍDIMO.....	17
FIGURA 3	CONTROLE INTERNO POSITIVO – RETE TESTIS.....	17
FIGURA 4	CONTROLE INTERNO POSITIVO – REVESTIMENTO EPITELIAL EM TERATOMA.....	17
FIGURA 5	SEMINOMA CLÁSSICO.....	20
FIGURA 6	SEMINOMA ANAPLÁSICO	20
FIGURA 7	SEMINOMA COM CÉLULAS GIGANTES DO TIPO TROFOBLASTO.....	21
FIGURA 8	TERATOMA	21
FIGURA 9	CARCINOMA EMBRIONÁRIO.....	22
FIGURA 10	TUMOR DO SACO VITELINO.....	22
FIGURA 11	SEMINOMA COM CK 7 POSITIVA – PEQUENO GRUPO CELULAR.....	25
FIGURA 12	SEMINOMA COM CK 7 POSITIVA – NUMEROSAS CÉLULAS..	25
FIGURA 13	NEOPLASIA INTRATUBULAR GERMINATIVA	29
FIGURA 14	NEOPLASIA INTRATUBULAR GERMINATIVA - CK 7 POSITIVA.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	ALFA-FETOPROTEÍNA
C.G.A.	CAMPO DE GRANDE AUMENTO
CE	CARCINOMA EMBRIONÁRIO
CEA	ANTÍGENO CÁRCINO-EMBRIONÁRIO
CK	CITOQUERATINA
EMA	ANTÍGENO DE MEMBRANA EPITELIAL
FAP	FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA
FI	FILAMENTO INTERMEDIÁRIO
GFAP	PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL
HCG	GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
HE	HEMATOXILINA & EOSINA
IHQ	IMUNOHISTOQUÍMICA
kD	QUILODALTON
LDH	LACTATO DESIDROGENASE
ml	MILILITRO
nl	NANOGRAMA
NITCG	NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS
NSE	ENOLASE NEURÔNIO ESPECÍFICA
PAS	ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF
S	SEMINOMA
SA	SEMINOMA ANAPLÁSICO
T	TERATOMA
TI	TERATOMA IMATURO
TM	TERATOMA MADURO
TSV	TUMOR DO SACO VITELINO
µm	MICRÔMETRO

RESUMO

EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA EM SEMINOMAS PUROS E MISTOS

Grande parte da literatura anátomo-patológica relativa às neoplasias testiculares tem tido entre seus principais objetivos elucidar a histogênese e aperfeiçoar a classificação desses tumores. Este trabalho tem como objetivo verificar a expressão de CK 7 e a dosagem de AFP em seminomas puros e mistos, visto existirem fortes evidências de que o seminoma seja o precursor de outras neoplasias germinativas com componentes epiteliais que expressam freqüentemente CKs, bem como casos onde há elevação da AFP a despeito do componente essencialmente seminomatoso do tumor. Para tanto foram selecionados 58 casos de seminomas, sendo 40 deles puros e 18 mistos. O material foi submetido a estudo imunohistoquímico para detecção de CK 7 na porção seminomatosa e nas células da NITCG quando presente. Foram ainda revisados os prontuários dos pacientes para obter as dosagens de AFP. Os resultados obtidos demonstraram que a CK 7 está presente em 39,7% dos casos de seminomas puros e em 55,5% dos seminomas das neoplasias mistas. Nestas, a expressão foi maior naquelas com componente de carcinoma embrionário. A AFP esteve elevada em somente 19% do total de casos, correspondendo a 10% dos seminomas puros e a 38,8% dos seminomas mistos, sendo que em somente 5 casos de neoplasias germinativas onde a AFP apresentou-se elevada a expressão de CK 7 foi positiva. Os dados obtidos reforçam a idéia de que a neoplasia germinativa não seminomatosa, principalmente o carcinoma embrionário, mantenha relação histogenética com o seminoma através da expressão elementos celulares epiteliais porém sem relação com a secreção de marcadores tumorais como a AFP.

Palavras-chave

Citoqueratina 7; alfa-fetoproteína; seminoma; neoplasia germinativa testicular; neoplasia intratubular de células germinativas.

ABSTRACT

CYTOKERATIN 7 EXPRESSION AND ALPHA-FETOPROTEIN VALUES IN PURE AND MIXED SEMINOMAS.

The literature surrounding the field of testicular tumours has primarily been concerned with the puzzling problem of histogenesis and classification of such neoplasms. This paper explores the expression of CK 7 and AFP values in mixed and pure seminomas, as well as in intratubular germ cell neoplasia, because of the evidences that lead us to think in seminoma as a precursor of other germ cell neoplasias. There are also some cases of patients with seminomatous neoplasia who presents with raising values of AFP with no explanation for that. We studied 58 tissue samples of seminomas, being 40 cases of pure seminomas and 18 cases of mixed tumours. The results obtained revealed expression of CK 7 in 39,7% of the cases, being more frequent in the group of mixed tumours, mainly that with embrionary carcinoma. A small percentage of the cases also showed expression of CK 7 in intratubular germ cell neoplasia. The alpha-fetoprotein had elevated values in 19% of all cases evaluated comprehending 10% of pure seminomas and 38,8% of the mixed ones; only 5 cases presented positivity to CK 7 and elevated AFP concomitantly. The results suggest that there may be any kind of histogenetic relation between seminoma and the other germ cell neoplasias, mainly embrionary carcinoma, related to expression of epithelial elements in tumours cells. These finds seem to have no relation to tumours markers values such as AFP.

Keywords

Cytokeratin 7; alpha-fetoprotein; seminoma; testicular germ cell neoplasia; intratubular germ cell neoplasia.

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia testicular acomete indivíduos jovens, principalmente entre 20 e 30 anos de idade, e tanto os fatores etiológicos como muitos aspectos referentes à sua evolução não estão completamente elucidados.

Dos vários tipos de neoplasias que podem acometer o órgão, as de origem no epitélio germinativo são as principais, destacando-se dentre elas o seminoma. Este ocorre geralmente na forma pura e, em um menor número de casos, associado a um ou mais tipos histológicos de neoplasia germinativa, sendo chamado então de misto. O diagnóstico diferencial preciso entre seminoma puro e outra neoplasia testicular germinativa, esta contendo ou não seminoma, é essencial por interferir em medidas terapêuticas e no prognóstico.

As neoplasias testiculares ditas não seminomatosas têm origem ainda controversa, embora muitos estudos tentem esclarecer sua histogênese. Dentre as hipóteses mais prováveis está a que sugere que neoplasias germinativas não seminomatosas como o carcinoma embrionário, o tumor do saco vitelino, o teratoma e o coriocarcinoma originem-se do próprio seminoma (SRIGLEY et al, 1988; CZAJA e ULBRIGHT, 1992; POTTEK et al., 1997; CHEVILLE, 1999; ALGABA, 2000; CHEVILLE et al., 2000), havendo ainda aqueles que sugerem a existência de formas transicionais do seminoma para o carcinoma embrionário (SRIGLEY et al, 1988).

Dentre os métodos de diagnóstico e de estudo utilizados para formular a teoria acima está a imunohistoquímica (IHQ); é um método comumente usado e promissor que, se corretamente indicado e interpretado, pode proporcionar, além de definição histológica da neoplasia, dados sobre a célula de origem. Muitos autores vêm estudando as características IHQs da neoplasia intratubular de células germinativas (NITCG), dos seminomas e de outras neoplasias germinativas (EGLÉN e ULBRIGHT, 1987; SRIGLEY et al., 1988; BAILEY et al., 1991; LACHMANN et al., 1993; SUZUKI et al., 1993; KINUGAWA et al., 1998; CHEVILLE et al., 2000; SCHRADER et al., 2001), porém poucos deram ênfase à detecção das CKs,

principalmente a CK 7 (ALGABA, 2000; CHEVILLE, 2000). As CKs, sendo estruturas características de células epiteliais, não devem estar presentes, normalmente, em outros tipos celulares, sendo que sua presença em células não epiteliais sugere alteração das características ultra-estruturais celulares.

Os marcadores tumorais são também de grande auxílio tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento de pacientes com diversas neoplasias, dentre elas o seminoma. A alfa-fetoproteína (AFP) é uma dessas substâncias e que raramente é detectada em níveis significativos nos pacientes com seminoma puro; elevações discretas são observadas em alguns poucos casos, principalmente naqueles onde há doença metastática e com comprometimento hepático. Há relatos de casos de seminoma puro com dosagens elevadas de AFP que tiveram curso clínico mais agressivo, porém o significado desse achado não está completamente esclarecido (NAZEER, et al., 1998). No entanto, segundo ULBRIGHT (1997), muitos cirurgiões baseiam-se na elevação da AFP para indicar o tratamento de uma neoplasia germinativa testicular, ou seja, pacientes com diagnóstico histológico de seminoma puro, porém com elevação significativa da AFP, são tratados como portadores de neoplasia mista. Ainda, de acordo com estudos histogenéticos das neoplasias germinativas, alguns autores relatam que a elevação da AFP em seminomas supostamente puros sugere sua evolução para neoplasia germinativa mista (JAVADPOUR, 1980; BREDAEL et al, 1982).

Dessa forma, a expressão de antígenos epiteliais como as CKs pela célula seminomatosa testicular, bem como a elevação de marcadores tumorais de neoplasias não seminomatosas como a AFP em seminomas puros, têm sido frequentemente estudados. Até o momento, não obstante, não há avaliação específica quanto à expressão de CK7 nos seminomas puros e mistos e sua eventual relação com a elevação de AFP.

1.1 OBJETIVOS

Através do estudo de 58 casos de seminomas puros e mistos testiculares objetiva-se:

1. Determinar a prevalência de CK 7 nos seminomas puros e mistos.
2. Verificar a presença de NITCG e se há expressão de CK 7 nas células neoplásicas.
3. Determinar a prevalência da elevação de AFP nos seminomas puros e mistos.
4. Verificar se há associação entre a positividade da CK 7 e a elevação de AFP nos seminomas puros e mistos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIA GERMINATIVA TESTICULAR

2.1.1 HISTOGÊNESE DA NEOPLASIA GERMINATIVA

Apesar do grande avanço da patologia molecular e de técnicas como a IHQ, não temos ainda definida a exata origem das neoplasias testiculares puras ou mistas que afetam o homem no período pós-puberal. Não há fator conhecido que determine o desenvolvimento de um ou outro tipo histológico de neoplasia germinativa. A presença de neoplasia intratubular de células germinativas (NITCG) na periferia de diversas neoplasias mistas ou puras, excetuando-se o seminoma espermatocítico, com ou sem componente seminomatoso, e com características histológicas e IHQs semelhantes independentemente do tipo de neoplasia associada, nos leva a pensar na origem comum dessas neoplasias (POTTEK et al., 1999; BOLLS et al., 2000). De acordo com a teoria atual, a NITCG pode permanecer *in situ* na forma de seminoma ou de outra neoplasia, invadir o estroma como seminoma, evoluindo ou não para neoplasia não seminomatosa pura ou mista, ou ainda invadir o estroma e rapidamente transformar-se em outro tipo histológico (CZAJA e ULBRIGHT, 1992). O que determina a diferenciação da NITCG para um ou outro tipo histológico, e se há como prever a possível evolução da NITCG ou de uma neoplasia inicialmente pura, ainda são fatos a serem elucidados.

2.1.2 TIPOS HISTOLÓGICOS E EXPRESSÃO ANTIGÊNICA DAS NEOPLASIAS GERMINATIVAS

2.1.2.1 Seminoma

O seminoma compreende de 35 a 71% das neoplasias germinativas

testiculares (MOSTOFI, 1973) e afeta principalmente indivíduos na faixa dos 40-45 anos. Há apenas raros relatos dessa neoplasia na infância (MOSTOFI, 1973).

É composto de células grandes, uniformes, com citoplasma bastante claro e bem definido, lembrando células germinativas primordiais. O núcleo é arredondado, central e basofílico, com um ou dois nucléolos grandes. O crescimento pode ser difuso ou de aspecto multinodular, sendo freqüente a ocorrência de túbulos normais em meio ou perifericamente à neoplasia. O estroma quantidades variáveis de linfócitos e, ocasionalmente, uma reação granulomatosa. Menos freqüentemente são encontradas células trofoblásticas, o que torna necessário diagnóstico diferencial com coriocarcinoma.

Em estudos especiais vemos que as células do seminoma carregam em seu citoplasma grande quantidade de glicogênio, o que lhes confere positividade à reação pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Na IHQ o seminoma apresenta reatividade à fosfatase alcalina placentária (FAP) em quase todos os casos, mostrando coloração homogênea e difusa da membrana citoplasmática e, menos freqüentemente, do citoplasma (NIEHANS, 1988). A expressão de CKs é variável em diversos estudos e depende fundamentalmente do tipo de CK pesquisada, da técnica utilizada na realização da IHQ e do modo de fixação utilizado, sendo preferíveis os cortes de material congelado (ALGABA, 2000; CHEVILLE, 2000). As queratinas que mais reagem são as tipo 8 e 18, embora outras como a 4 e a 17 sejam vistas ocasionalmente (FOGEL, 1990). A positividade da CK 7 ainda não está bem esclarecida (FOGEL, 1990; ALGABA, 2000), sendo que em alguns estudos chega a 40% de expressão (CHEVILLE, 2000). O antígeno de membrana epitelial (EMA) é negativo nos seminomas, e antígenos como a vimentina, a lactato-desidrogenase (LDH) e a enolase neurônio específica (ENS) podem eventualmente estar presentes (FOGEL, 1990). Ocasionalmente se observa positividade para o hCG, porém não somente nos casos onde há células gigantes do tipo trofoblasto (FOGEL, 1990; ULBRIGHT, 1997). O resultado IHQ esperado habitualmente nos cortes parafinados de seminomas clássicos

está sumarizado no quadro 1. O seminoma anaplásico constitui uma variante do seminoma clássico, diferindo deste apenas pela anaplasia, pelo aumento da atividade mitótica e pela maior agressividade, com maior frequência de metástases e alguma diferença na sobrevida (JOHNSON et al., 1975; KADEMIAN et al., 1977; SHULMAN et al., 1983; COCKBURN et al., 1984; GOIKHBERG et al., 1984; BOBBA et al., 1988; STEIN et al., 1992; SUZUKI et al., 1993). Os estudos IHQs realizados também não demonstraram diferenças significativas entre os seminomas clássico e anaplásico (SUZUKI et al., 1993).

QUADRO 1 - PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DAS NEOPLASIAS GERMINATIVAS

Neoplasia	Pan-queratina	Vimentina	AFP	Ber-H2	FAP	hCG
Seminoma	+/-	+	-	-	+	-
Carcinoma Embrionário	+	-	+/-	+	+	-
Tumor do Saco Vitelino	+	+	+	-	+	-
Coriocarcinoma	+	-	-	...	+/-	+
Teratoma	+	+	+/-	-	+/-	-

AFP – Alfa-fetoproteína; FAP – Fosfatase alcalina placentária; hCG – Gonadotrofina coriônica humana

FONTE: Armed Forces Institute of Pathology

NOTA: Quadro extraído da publicação: Ulbright, T.M.; Amin, M.B. and Young, R.H. **Atlas of tumor pathology: Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord and scrotum**, vol. 25, Washington D.C., 1997, p. 78.

2.1.2.2 Carcinoma embrionário

O carcinoma embrionário isolado em testículo é relativamente raro, compreendendo 2% das neoplasias germinativas (MOSTOFI, 1973; MOSTOFI, 1988). Por outro lado, a grande maioria das neoplasias germinativas testiculares não seminomatosas apresenta algum componente de carcinoma embrionário. A frequência com que essa neoplasia ocorre isoladamente já foi bem maior, possivelmente refletindo o diagnóstico mais acurado atual de neoplasia mista através da detecção de pequenos focos de outra neoplasia germinativa, principalmente com o uso da IHQ (ULBRIGHT, 1997). O carcinoma embrionário acomete em geral indivíduos mais jovens do que aqueles com seminoma clássico, tende a ser mais doloroso e, com

grande freqüência, já invade estruturas extratesticulares ao diagnóstico.

Microscopicamente a neoplasia se apresenta na forma de nódulos ou de distribuição difusa com áreas extensas de necrose coagulativa. Uma variedade de padrões de crescimento pode ocorrer no mesmo tumor, como formação de papilas, estruturas glandulares, formações trabeculares ou padrões sólidos. As células do carcinoma embrionário são geralmente poligonais com citoplasma anfífilico ou fracamente basofílico e limites pouco definidos. Os núcleos são grandes, irregulares, com cromatina grosseira e um ou mais nucléolos volumosos e centrais. A taxa mitótica é geralmente bastante alta.

Quanto à expressão antigênica, vemos que somente um pequeno percentual desses tumores na sua forma pura expressa AFP, diferentemente do que ocorre com aqueles que fazem parte de neoplasias mistas (WITTEKIND, 1983). A positividade de FAP é, como nos seminomas, bastante expressiva. A expressão de CK é bastante comum, observando-se reatividade tanto à AE1/AE3 quanto aos tipos específicos 8, 18 e 19 (NIEHANS, 1988). A CK 7 tem expressão importante no CE, com positividade acima de 80% (CHEVILLE, 2000), bem como o CD-30, presente também em mais de 80% dos casos (FERREIRO, 1994). O carcinoma embrionário, assim como o seminoma, não apresenta reatividade ao EMA.

2.1.2.3 Teratoma

Os teratomas testiculares ocorrem tanto em crianças como em indivíduos adultos. Nos indivíduos adultos sua freqüência é bastante comum, geralmente na forma de componente de tumores mistos, dada a raridade de tumores puros nessa fase de vida. Atinge indivíduos com características semelhantes às daqueles acometidos por carcinoma embrionário: homens jovens, com aumento de volume testicular e, em muitos casos, apresentando metástases como primeira manifestação.

Os teratomas maduros são compostos de diferentes tecidos histologicamente semelhantes aos tecidos maduros, adultos, onde a presença de atipia celular reflete o potencial maligno do teratoma. Em alguns desses tumores maduros, mais raramente, pode aparecer um componente maligno, francamente invasor, não germinativo, como, por exemplo, um adenocarcinoma (WHEELER e RUDY, 1997). Os teratomas imaturos são os que apresentam tecidos de padrão fetal ou embrionário, geralmente de permeio a tecidos maduros. Esses tecidos imaturos são representados freqüentemente por neuroepitélio, por componentes blastematosos, por músculo esquelético imaturo e por tecidos estromais imaturos provavelmente precursores de músculo liso.

O teratoma, pela variedade de tecidos que pode reproduzir, apresenta reação IHQ específica para cada componente; dessa forma, somente alguns antígenos têm maior importância, como a AFP, presente nos tecidos epiteliais glandulares respiratórios e intestinais e nas células com diferenciação hepática; a FAP também tem sido descrita nos teratomas porém com baixa freqüência (ULBRIGHT, 1997).

2.1.2.4 Tumor do saco vitelino

O tumor do saco vitelino ou do seio endodérmico, mais conhecido como *yolk sac tumor*, acomete predominantemente meninos com idade média de 18 meses, e é o tumor testicular mais comum na infância (CARVALHO et al., 1998). Diferentemente do tumor que ocorre em adultos, o tumor do saco vitelino da criança não tem correlação com neoplasia intratubular germinativa ou com criptorquidismo, apresenta evolução clínica diferente e histogênese possivelmente diversa da neoplasia germinativa do adulto; neste ocorre geralmente como parte de neoplasia mista, principalmente as não seminomatosas.

Microscopicamente são observados múltiplos padrões de crescimento, o que, por vezes, dificulta o diagnóstico. Foram reconhecidos até hoje onze padrões distintos

de crescimento: (1) seio endodérmico (ou perivascular), (2) reticular (microcístico, favo-de-mel), (3) papilar, (4) sólido, (5) alvéolo-glandular, (6) mixomatoso, (7) sarcomatóide, (8) macrocístico, (9) polivesicular, (10) hepatóide e (11) parietal (ULBRIGHT e ROTH, 1994). A ocorrência de glóbulos hialinos é comum nos tumores do saco vitelino e pode ajudar no diagnóstico. Consistem em glóbulos de tamanhos variados, entre 1 μm e 50 μm de diâmetro, redondos, eosinofílicos, que se coram positivamente pelo método do PAS. Essas estruturas podem ser encontradas em outros tumores, porém são incomuns no seminoma e no carcinoma embrionário (CHEVILLE, 1999). O mais importante marcador do tumor do saco vitelino é a AFP. Apresenta-se positiva na grande maioria dos casos, chegando a 100% em alguns estudos (MOSTOFI, 1987), porém nem sempre é difusa, podendo ser focal e discreta. Da mesma forma, a concentração de AFP plasmática costuma ser bastante elevada. As CKs, em geral, são difusamente positivas em quase todos os casos (NIEHANS, 1988). A expressão da FAP é muito variável e o EMA geralmente é negativo.

2.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

2.2.1 Filamentos Intermediários

A maioria das células dos mamíferos é provida de um sistema de proteínas citoplasmáticas denominadas filamentos intermediários (FIs). Esses filamentos são, portanto, parte integrante do citoesqueleto e, diferentemente de outras proteínas, apresentam características específicas de acordo com a célula onde estão (LEHTO, et al., 1986), sendo os elementos mais relacionados com a diferenciação celular. Os FIs encontrados em vários tecidos são a desmina, a vimentina, a CK, os neurofilamentos e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (CHEVILLE, 2000). Cada tipo celular apresenta FIs de um determinado tipo e, dessa forma, com o uso de anticorpos específicos para o FI, podemos identificar uma célula neoplásica quanto a sua origem. A distribuição e peso molecular desses FI podem ser observados no quadro 2.

QUADRO 2- FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS – EXPRESSÃO EM TECIDOS NORMAIS E EM NEOPLASIAS

FILAMENTO INTERMEDIÁRIO	PESO MOLECULAR	TECIDOS NORMAIS	NEOPLASIAS
Vimentina	58 kD	Células mesenquimais	Sarcomas
CK	40-68 kD	Células Epiteliais	Carcinomas
Neurofilamentos	68, 160, 200 kD	Neurônios	Ganglioneuromas
GFAP	5 kD	Células gliais	Astrocitomas
		Epêndima	Ependimomas
Desmina	55 kD	Miócitos	Rabdomiossarcoma
			Leiomiiossarcoma

CK – Citoqueratina; GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

NOTA: Tabela extraída da publicação: WOODS, A.E. et ELLIS, R.C. **Laboratory Histopathology: A Complete Reference**, Churchill-Livingstone, New York, v. 2, s. 8.2, 1996.

2.2.1.1 Citoqueratinas

As CK constituem o maior grupo de FI e são as proteínas mais abundantes nas células epiteliais (COULOMBE e OMARY, 2002), incluindo células mesoteliais (RAINBOW, 1996). Em contraste com os outros FI que são compostos por apenas uma subunidade de proteína, as CK constituem uma família complexa de polipeptídeos onde há semelhança bioquímica e imunológica entre os diversos tipos de CK, com expressão variada nos diferentes tipos de epitélios. Existem na forma de rede citoplasmática e têm como função regular a apoptose e proteger as células contra diversos agentes agressores evitando a morte celular, dentre outras (LEHTO, 1986; COULOMB e OMARY, 2002). A sua presença, portanto, é indicativa de origem epitelial e elas estão presentes tanto nas células normais como nas neoplásicas. As CK são encontradas, portanto, em tipos distintos de células epiteliais, sendo subdivididas conforme o seu peso molecular e classificadas numericamente (MOLL et al., 1982) (quadro 3). As CKs de baixo peso molecular, 40-55kD, estão presentes em muitos tipos celulares epiteliais enquanto as de alto peso molecular, 56-70kD, são mais comuns nos epitélios estratificados; dentro destes, por exemplo, conforme a posição da célula, há variação do tipo de CK, refletindo a diferenciação epitelial (RAINBOW,

1996). A identificação da CK pela IHQ pode ser feita através do emprego de vários tipos de anticorpos: anticorpos de largo espectro ou chamados de pan-citoqueratinas (AE1/AE3) que detectam queratinas de alto e baixo peso molecular, anticorpos para CK de baixo peso molecular que identificam células de epitélios simples e glandulares e não o epitélio escamoso, e anticorpos para CK de alto peso molecular que identificam as queratinas presentes nos epitélios escamosos e ductais, não reagindo com o epitélio simples. Existem, ainda, anticorpos para CK específicas, como anti-CK 20, anti-CK 7, etc. Algumas CKs, como a CK 20, embora tenham sua localização mais ou menos definida, por vezes apresentam-se positivas em neoplasias derivadas de tecidos onde sua expressão era negativa (WANG et al., 1995).

A CK 7, especificamente, é uma queratina de 54kD encontrada no epitélio transicional e na maioria dos epitélios glandulares como o mamário, o pulmonar e o de revestimento de ductos. Não é observada, no entanto, nas células epiteliais intestinais e em células epiteliais glandulares prostáticas. Não está presente, também, nos epitélios escamosos (VAN NIEKERK et al, 1991). Da mesma forma, as neoplasias intestinais, prostáticas e epiteliais escamosas também não expressam a CK 7.

2.3 MARCADORES TUMORAIS

Além dos FIs que fazem parte do citoesqueleto celular e que nos auxiliam no diagnóstico de diversas neoplasias, existem substâncias denominadas marcadores tumorais; compreendem antígenos, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios, enfim, moléculas que podem ser detectadas na neoplasia através da IHQ, ou dosadas no plasma e em outros líquidos orgânicos, e que podem auxiliar na detecção, diagnóstico e acompanhamento evolutivo de uma neoplasia. Os marcadores tumorais observados com maior frequência em pacientes com neoplasia testicular são a gonadotrofina coriônica humana (hCG), a AFP, o antígeno carcinoembrinário (CEA), a fosfatase alcalina placentária (FAP) e o CD30. A positividade de alguns marcadores e negatividade de outros, juntamente com a expressão de alguns FIs auxiliam no diagnóstico diferencial das neoplasias germinativas e constituem os chamados painéis

imunohistoquímicos conforme já demonstrado no quadro 1.

QUADRO 3– CITOQUERATINAS – PESO MOLECULAR E DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS NORMAIS

Número de Moll	Peso Molecular	Especificidade
1,2	65-67	Epitélio estratificado / ductal
3	64	Epitélio estratificado / ductal
4	59	Epitélio estratificado / ductal
5	58	Vários
6	56	Vários
7	54	Simples / glandular
8	55	Simples / glandular
9	64	Epitélio estratificado / ductal
10	56.5	Epitélio estratificado / ductal
11	-	-
12	55	Epitélio estratificado / ductal
13	51	Epitélio estratificado / ductal
14	50	Vários
15	50	Vários
16	48	Vários
17	41	Vários
18	45	Simples / glandular
19	40	Simples / glandular
20	46	Simples / glandular

NOTA: Quadro extraído da publicação: Bharat, J.; Schmid, K.W.. **Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology**, Churchill-Livingstone, New York, 1993, p. 57.

2.3.1 Alfa-fetoproteína

A AFP é uma glicoproteína produzida pelo saco vitelino fetal, pelo trato digestório e pelo fígado, sendo a maior proteína sérica do feto humano, inaparente ou

presente normalmente em níveis mínimos (até 10ng/ml) após o nascimento. Essa proteína torna-se detectável no plasma de pacientes com algumas neoplasias como o hepatocarcinoma, carcinomas do trato digestório, mais comumente do cólon e estômago, e certas neoplasias germinativas testiculares (LANGE E FRALEY, 1977).

Dentre as neoplasias germinativas testiculares, a AFP está elevada na maioria dos pacientes com tumor do saco vitelino em níveis que muitas vezes excedem 1000ng/ml (NAZEER, 1998) e em grande parte daqueles com carcinoma embrionário (LANGE E FRALEY, 1977; SCARDINO et al., 1977; JAVADPOUR et al., 1978); raramente está aumentada no seminoma, no teratoma e no coriocarcinoma (KURMAN et al., 1977). Dessa forma, a elevação significativa da AFP em paciente com seminoma supostamente puro é considerada anormal, para muitos significando a presença de outro tipo de neoplasia germinativa não diagnosticada ou a evolução do seminoma para neoplasia mista germinativa (JOHNSON, 1976; BREDAEL, 1982, JAVADPOUR, 1980).

3 MATERIAL E MÉTODO

O material deste estudo compreende 58 amostras de neoplasia testicular germinativa embebidas em parafina, obtidas através de levantamento de casos dos arquivos de três laboratórios da cidade de Curitiba – Paraná, entre os anos de 1994 e 2002, sendo eles: Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (31 casos), Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Trabalhador (8 casos) e Laboratório Citopar S/C Ltda (19 casos).

Foram selecionados casos de neoplasia testicular germinativa que obedecessem aos seguintes critérios: pacientes com idade entre 16 e 45 anos com diagnóstico de neoplasia germinativa seminomatosa pura ou mista e que tivessem dosagem de alfa-fetoproteína prévia ao diagnóstico do tipo histológico e do tratamento do tumor. Os casos selecionados foram então divididos em dois grupos: 40 casos de seminoma clássico puro e 18 casos de neoplasia mista germinativa com componente seminomatoso; estes foram, posteriormente, subdivididos em dois grupos menores pela presença (11 casos) ou não (7 casos) de carcinoma embrionário. Na avaliação do componente não seminomatoso os casos de teratoma maduro e imaturo foram considerados em conjunto.

Os dados de cada caso - idade do paciente, tipo de neoplasia, presença de NITCG, expressão de CK 7 e dosagem de AFP - foram registrados em protocolo específico (Anexo I).

3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os blocos dos casos selecionados foram submetidos a cortes de 4µm de espessura com micrótomo rotativo (American Optical Instruments®) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) (Anexo II). Os preparados histológicos foram então revisados para confirmação diagnóstica e a lâmina com melhor representatividade de seminoma de cada caso foi selecionada para IHQ. O microscópio

utilizado para o estudo foi da marca Nikon®, modelo Eclipse E-400.

3.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Do material selecionado na avaliação histológica foram feitas duas novas lâminas para IHQ. Os cortes em parafina para reação com anti-CK 7 (clone OV-TL 12/30, Lote 50, Dako®, Biogen Diagnostics Inc.), em diluição 1:50, foram submetidos a recuperação antigênica em banho-maria com tampão citrato a 10mmol/L em pH 6,0 para posterior processamento imunohistoquímico (Anexo III).

Para garantir a veracidade da coloração foram realizados controles. Como controle externo positivo foi utilizado fragmento de parênquima mamário com epitélio ductal que se cora fortemente pela CK 7 (figura 1) (BHARAT e SCHMID, 1993) e, como controle interno positivo, quando presentes, células epiteliais do epidídimo (figura 2) e da *rete testis* (figura 3) ou células epiteliais componentes de neoplasia não seminomatosa (figura 4). O estroma da neoplasia e as células linfocitárias no seminoma serviram como controle interno negativo.

A expressão do antígeno foi considerada positiva quando ao menos um grupo de 5 células em toda a área do seminoma apresentasse coloração de membrana e/ou citoplasma positiva (CHEVILLE, 2000).

3.3 DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA

Foram revisados os prontuários dos pacientes dos casos em estudo para obtenção da dosagem de AFP. Para tanto foi observada a data da primeira consulta do paciente, as datas das dosagens de AFP e as datas dos procedimentos terapêuticos para que fosse considerado exclusivamente o valor obtido na primeira rotina investigativa, ou seja, ao diagnóstico clínico da neoplasia, antes de qualquer tipo de terapia clínica ou cirúrgica. Os laudos eram procedentes de diversos laboratórios da cidade de Curitiba e em todos os casos o valor de referência adotado como normal era de

10ng/ml. Para avaliação dos resultados as neoplasias foram divididas em subgrupos quanto à presença ou ausência de tumor do saco vitelino cuja elevação de AFP é sempre marcante.

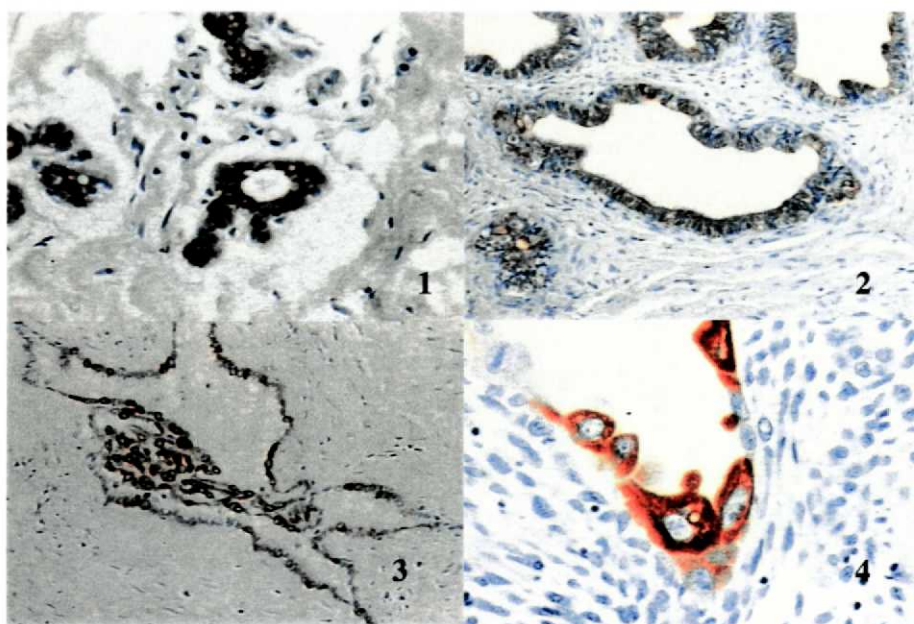


FIGURA 1 - CONTROLE EXTERNO POSITIVO - DUCTO MAMÁRIO (IHQ, 200X)

FIGURA 2 - CONTROLE INTERNO POSITIVO - EPIDÍDIMO (IHQ, 100X)

FIGURA 3 - CONTROLE INTERNO POSITIVO - RETE TESTIS (IHQ, 200X)

FIGURA 4 - CONTROLE INTERNO POSITIVO - REVESTIMENTO EPITELIAL EM ESTRUTURA DUCTAL DE TERATOMA (IHQ, 100X)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabelas e gráficos.

Para a comprovação dos objetivos levantados foi utilizado o teste não-paramétrico “Z” para comparação entre duas proporções e o teste exato de Fisher (obtidos pelos *softwares* Primer of Biostatistics e Epi-Info).

O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram organizados em gráficos e tabelas e então submetidos à avaliação.

Diagnóstico

O seminoma puro, como tumor mais freqüente (tabela 1 e gráfico 1), apresentou duas variantes: além de sua forma clássica (figura 5), mais comum, compreendendo 82,5% dos casos ($p < 0,0001$), foram vistos 2 casos da variante anaplásica (figura 6) e 5 casos (12,5%) com associação de células gigantes trofoblásticas (figura 7) (tabela 2 e gráfico 2). Quanto aos seminomas mistos, quando subdivididos pela associação dos tipos histológicos de neoplasia, a combinação mais comum foi entre seminoma e teratoma maduro ou imaturo (figura 8) com 38,9% dos casos, seguida pela associação entre seminoma e carcinoma embrionário (figura 9) (33,3%); menos freqüentemente observamos associações mais complexas onde havia concomitância de tumor do saco vitelino (figura 10) e carcinoma embrionário (11,1%) e de teratoma maduro ou imaturo com carcinoma embrionário (16,7%) (tabela 3 e gráfico 3). Quando subdivididos em dois grupos quanto a presença ou não de carcinoma embrionário, este figurou como a neoplasia não seminomatosa mais comum (61,1%) ($p = 0,020$) (tabela 3 e gráfico 3).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - SEMINOMA PUROS E MISTOS

Diagnóstico	Número	Percentual
Seminoma	40	69,0
Seminoma misto	18	31,0
Total	58	100,0

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - SEMINOMAS PUROS E MISTOS

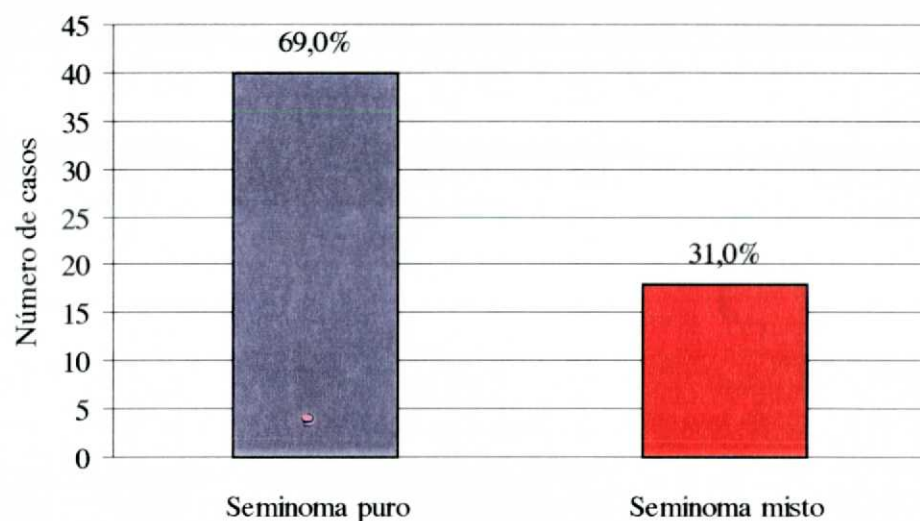


GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - VARIANTES DO SEMINOMA PURO

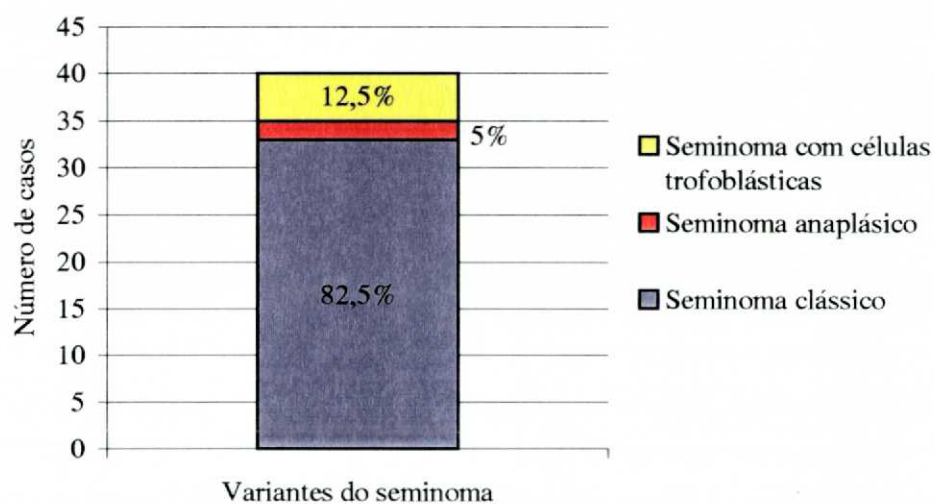


TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - VARIANTES DO SEMINOMA PURO

Tipo de seminoma	Número	Percentual
Clássico	33	82,5
Anaplásico	2	5,0
Células trofoblásticas	5	12,5
TOTAL	40	100,0

Clássico x Anaplásico + Células trofoblásticas $\rightarrow z_{calc} = 5,590$ $p < 0,0001$

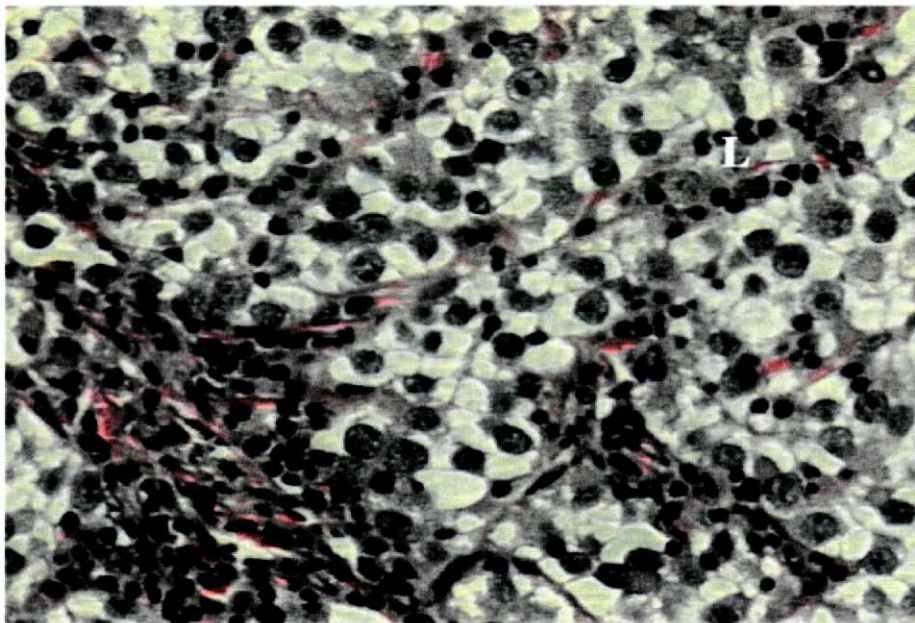


FIGURA 5 - SEMINOMA CLÁSSICO. Grupos de células com citoplasma amplo e claro entremeadas por células linfocitárias pequenas (L). (HE, 200X)

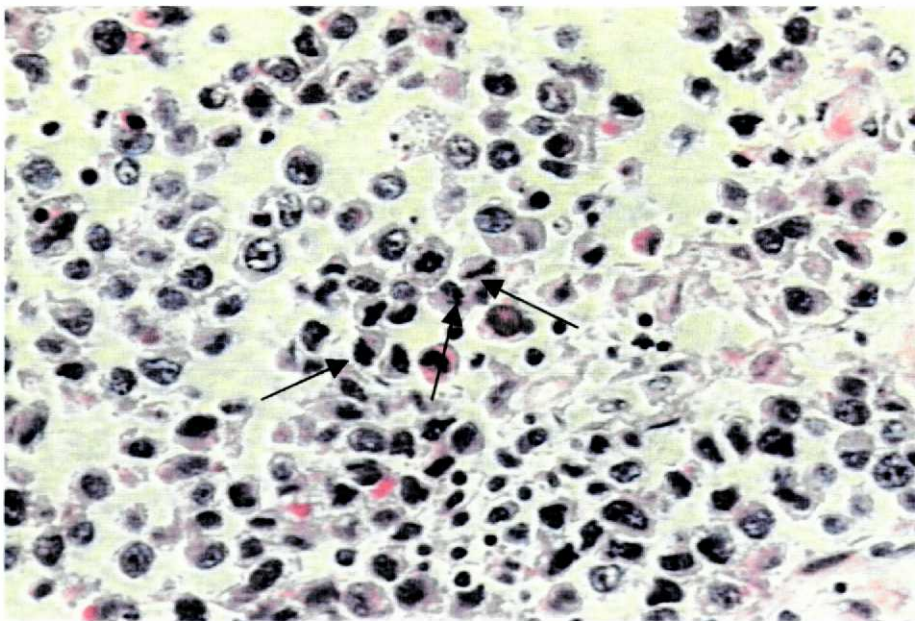


FIGURA 6 - SEMINOMA ANAPLÁSICO. Grupos de células com citoplasma claro entremeadas por células linfocitárias pequenas e com numerosas mitoses (setas). (HE, 200X)

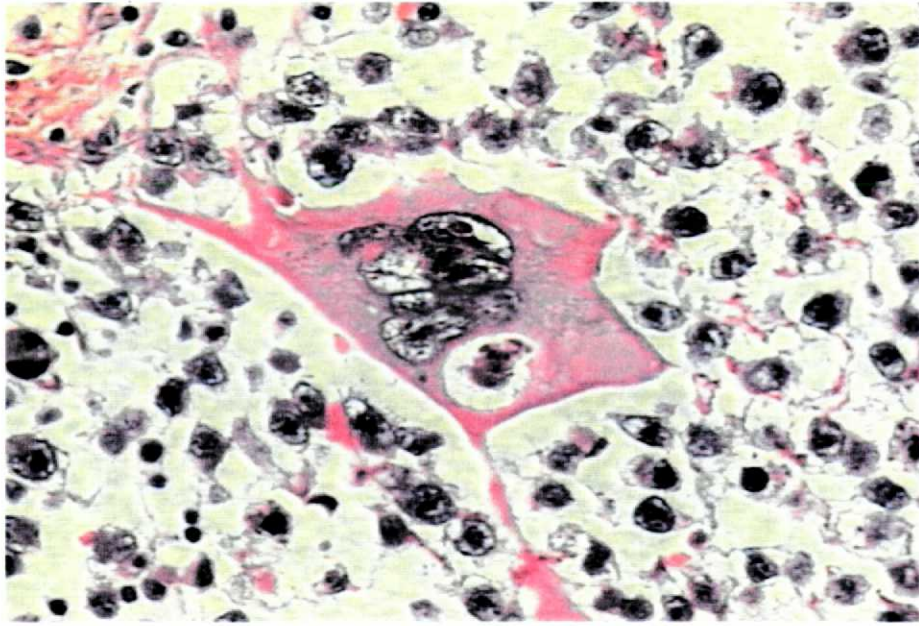


FIGURA 7 - SEMINOMA COM CÉLULA GIGANTE TIPO SINCICIOTROFOBlasto. (HE, 200X)

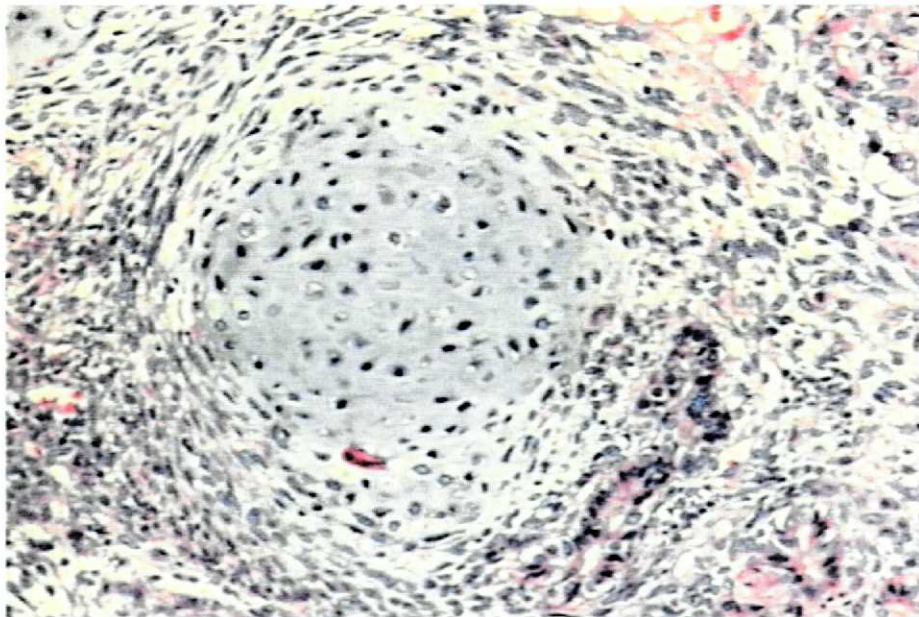


FIGURA 8 - TERATOMA. Estroma neoplásico denso apresentando, no centro da foto, nódulo formado por tecido cartilaginoso e, na periferia deste, estruturas glandulares de padrão digestivo. (HE, 100X)

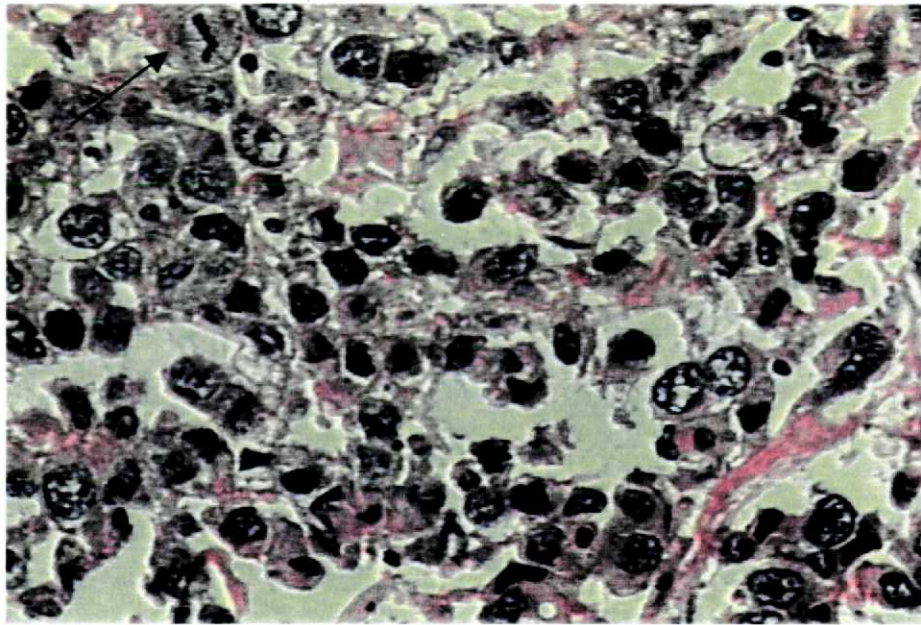


FIGURA 9 - CARCINOMA EMBRIONÁRIO. Células irregulares apresentando núcleos com cromatina grosseira e irregular. Mitose presente no campo (seta). (HE, 200X)

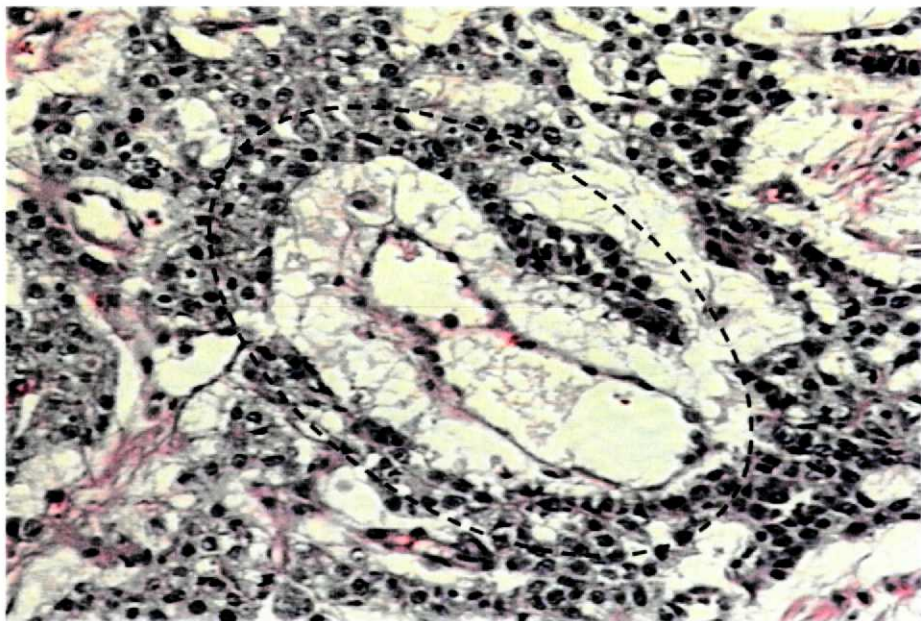
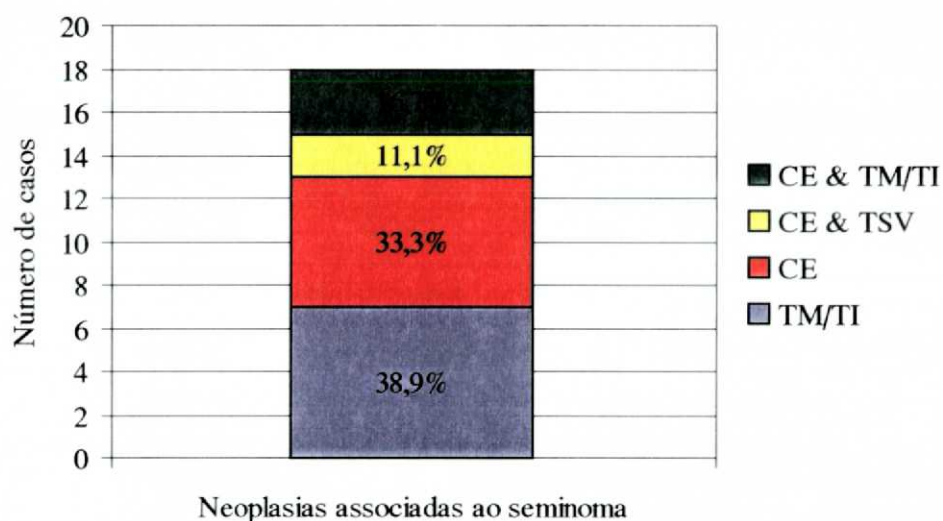


FIGURA 10 - TUMOR DO SACO VITELINO. Corpúsculo de Schiller-Duval (círculo). (HE, 200X)

GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - COMPOSIÇÃO DOS SEMINOMAS MISTOS



Nota: CE - Carcinoma embrionário; TM/TI - Teratoma maduro ou imaturo; TSV - Tumor do saco vitelino.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS - COMPOSIÇÃO DOS SEMINOMAS MISTOS

Neoplasia germinativa associada	Número	Percentual
TM/ TI	7	38,9
CE	6	33,3
CE e TSV	2	11,1
CE e TM/TI	3	16,7
TOTAL	18	100,0

TM/TI x CE $\rightarrow z_{\text{calc}} = 0,003$ $p=0,998$

TM/TI + CE x CE e TSV + CE e TM/TI $\rightarrow z_{\text{calc}} = 2,331$ $p=0,020$

CE + CE e TSV + CE e TM/TI x TM/TI $\rightarrow z_{\text{calc}} = 0,999$ $p=0,318$

Nota: TM/TI - teratoma maduro ou imaturo; CE - carcinoma embrionário; TSV - tumor do saco vitelino.

Expressão de citoqueratina 7

A positividade da CK 7 nos seminomas foi observada em 39,6% do total de casos estudados (tabela 4 e gráfico 4), sendo mais freqüente no seminoma da neoplasia mista ($p=0,744$) do que na sua forma pura (tabela 5 e gráfico 5). Dentre as neoplasias mistas, conforme expresso na tabela e gráfico 6, vemos que aquelas com componente de carcinoma embrionário apresentaram positividade significativamente maior ($p=0,025$). A expressão de CK 7 foi observada na forma de coloração tanto da membrana celular quanto do citoplasma, compreendendo pequenos (figura 11) ou grandes grupos celulares (figura 12).

GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7

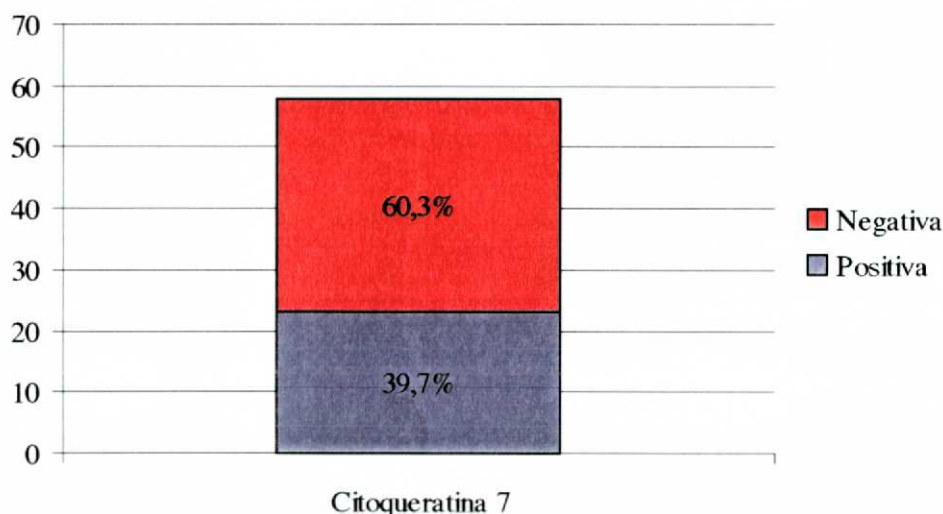


TABELA 4 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7

Imunohistoquímica	Positiva		Negativa		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Citoqueratina 7	23	39,7	35	60,3	58	100,0

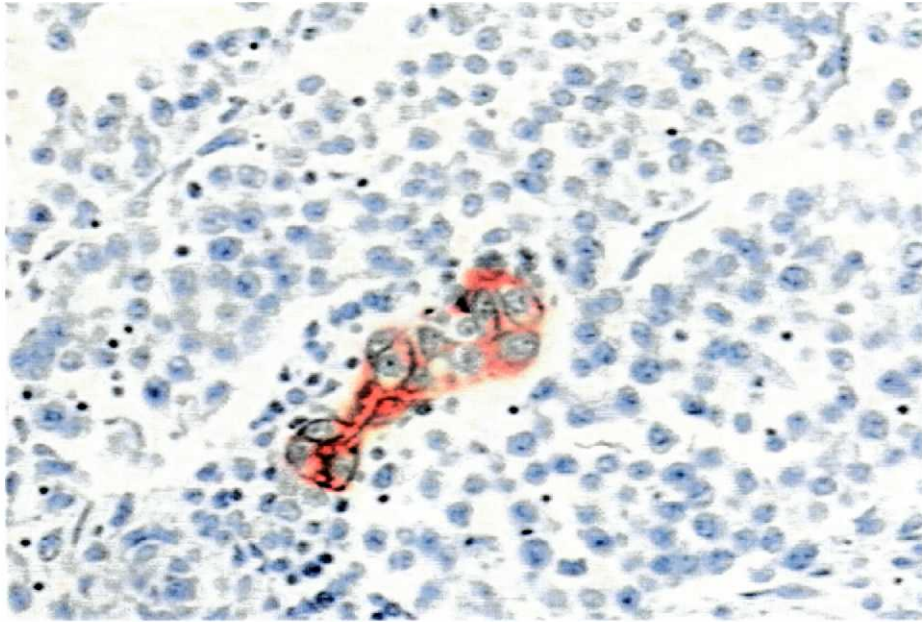


FIGURA 11 - SEMINOMA COM CK 7 POSITIVA - PEQUENO GRUPO CELULAR. Pequeno grupo de células positivas para CK 7 realçadas pela cor marrom. (IHQ, 200X)

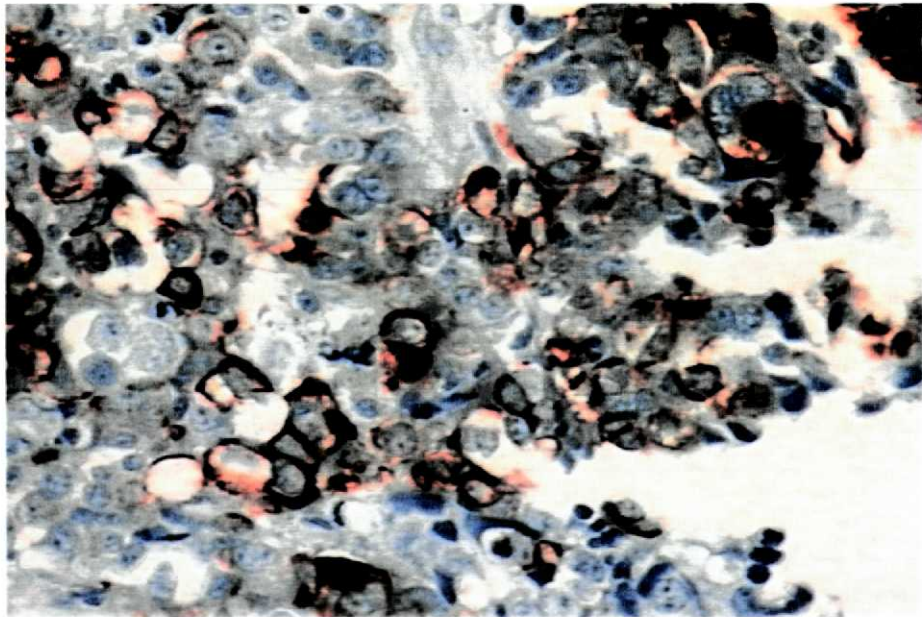


FIGURA 12 - SEMINOMA COM CK 7 POSITIVA - NUMEROSA CÉLULAS. Numerosas células positivas para CK 7 (áreas em marrom). (IHQ, 200X)

GRÁFICO 5 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS PUROS E NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS

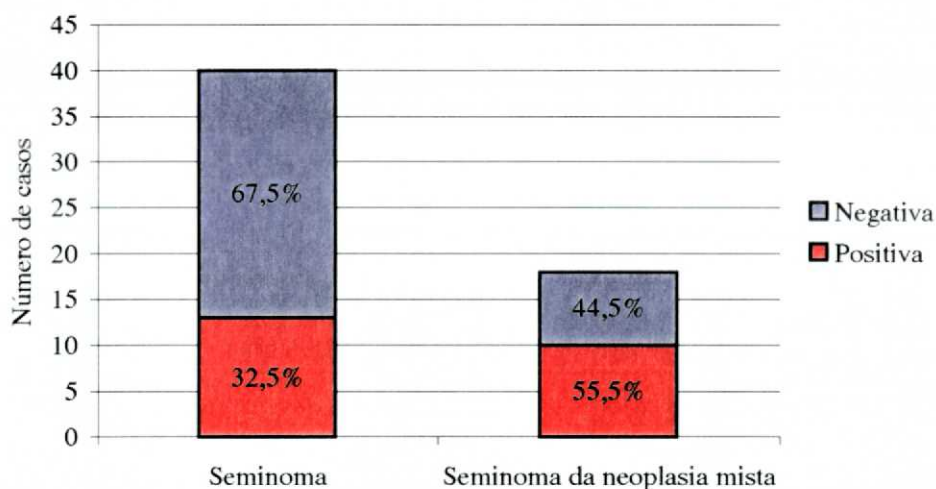


TABELA 5 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS PUROS E NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS

Imunohistoquímica	CK 7 positiva		CK 7 negativa		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Neoplasia						
Seminoma	13	32,5	27	67,5	40	100,0
Seminoma na neoplasia mista	10	55,5	8	44,5	18	100,0
Total	23		35		58	

Seminoma CK 7 positiva x Seminoma na neoplasia mista CK 7 positiva → $z_{\text{calc}} = 1,367$ $p=0,172$

Seminoma CK 7 positiva x Seminoma CK 7 negativa → $z_{\text{calc}} = 2,907$ $p=0,004$

Seminoma na neoplasia mista CK 7 positiva x Seminoma na neoplasia mista CK 7 negativa → $z_{\text{calc}} = 0,327$ $p=0,744$

GRÁFICO 6 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS CONFORME AS DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE NEOPLASIAS

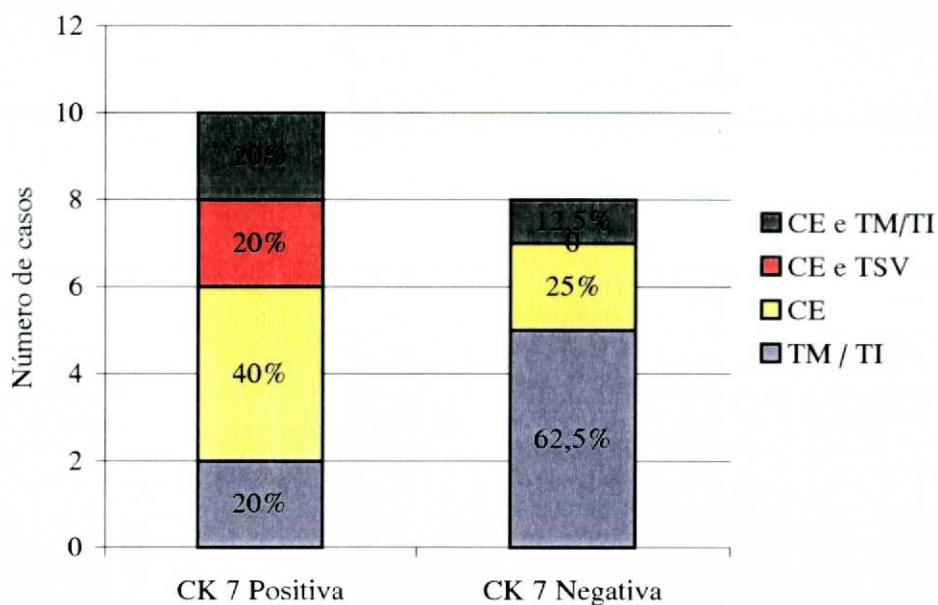


TABELA 6 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 NOS SEMINOMAS DAS NEOPLASIAS MISTAS CONFORME AS DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE NEOPLASIAS

Neoplasia	CK 7 positiva		CK 7 negativa	
	Nº.	%	Nº.	%
TM / TI	2	20,0	5	62,5
CE	4	40,0	2	25,0
CE e TSV	2	20,0	0	0,0
CE e TM/TI	2	20,0	1	12,5
TOTAL	10	100,0	8	100,0

TM/TI CK 7 positiva x CE CK 7 positiva + CE e TSV CK 7 positiva + CE e TM/TI CK 7 positiva $\rightarrow z_{\text{calc}} = 2,236$
 $p=0,025$

Nota: TM/TI - teratoma maduro ou imaturo; CE - carcinoma embrionário; TSV - tumor do saco vitelino.

Dos 58 casos estudados, 27 apresentavam áreas de NITCG (figura 13). Em cinco deles (18,1%) houve expressão de CK7 nas células neoplásicas intratubulares (figura 14). Três dos casos eram seminomas puros clássicos e dois eram mistos (tabela 7 e gráfico 7).

GRÁFICO 7 - POSITIVIDADE DA CITOQUERATINA 7 NA NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS

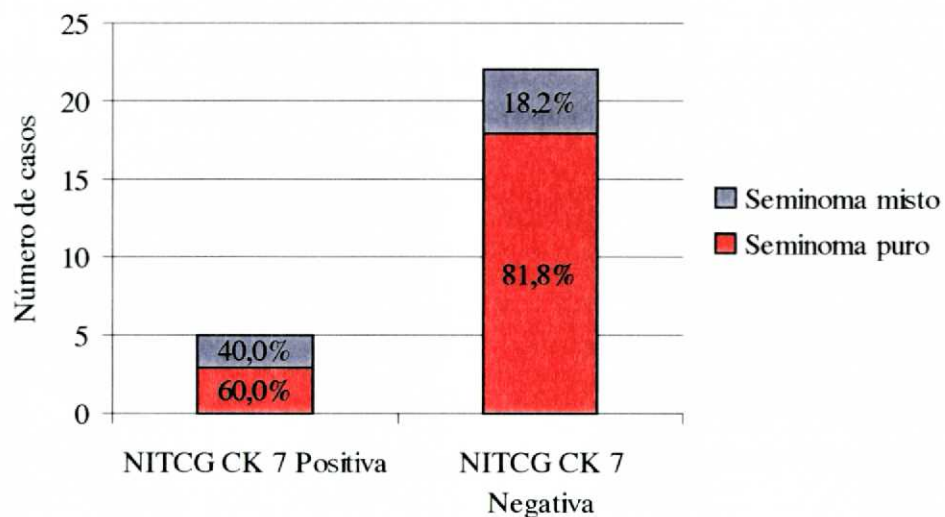


TABELA 7 - POSITIVIDADE DA CITOQUERATINA 7 NA NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS

NITCG	CK7+		CK7-	
	Nº.	%	Nº.	%
Associada				
Seminoma	3	60,0	18	81,8
Seminoma misto	2	40,0	4	18,2
Total	5	100,0	22	100,0

NITCG CK 7 positiva x NITCG CK 7 → Fisher_{calc} p=0,3031

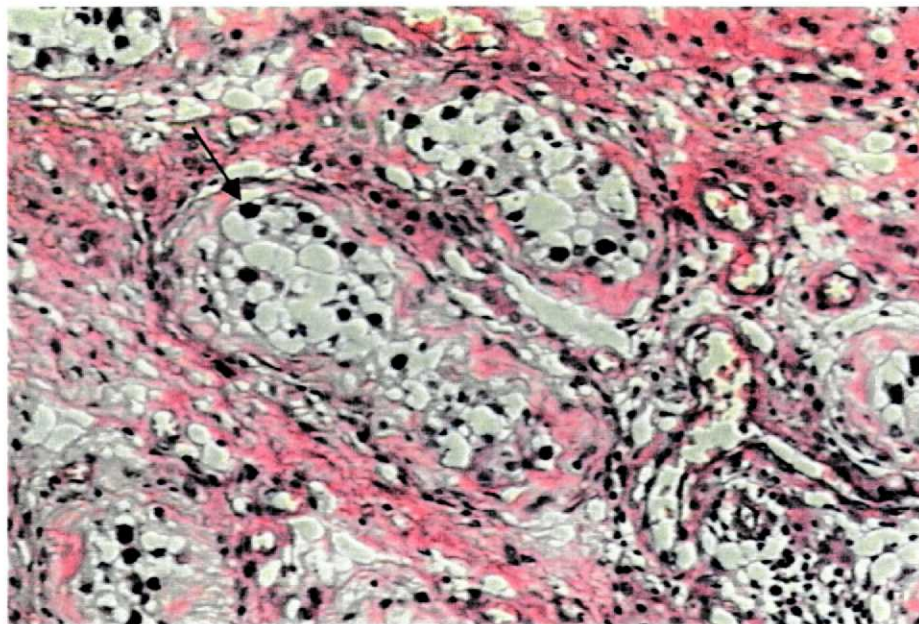


FIGURA 13 - NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS. Túbulos com membrana basal espessa e células germinativas atípicas (seta). (HE, 200X)

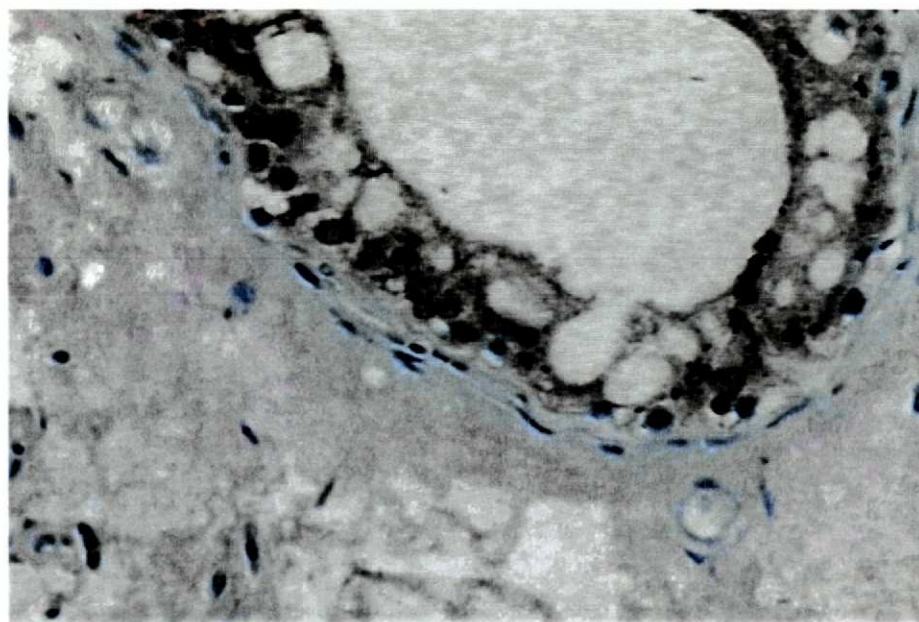


FIGURA 14 - NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS - CK 7 POSITIVA (IHQ, 200X)

Alfa-fetoproteína

A AFP foi considerada dentro dos limites da normalidade em 81% dos casos ($p < 0,0001$), porém sua elevação foi significativamente mais prevalente nas neoplasias mistas quando comparadas às puras ($p < 0,001$) (tabela e gráfico 8). Dos 11 casos onde a primeira dosagem de AFP do paciente estava elevada, 5 (45,4%) apresentavam também expressão de CK 7, porém dois deles tinham, como um dos componentes da neoplasia, tumor do saco vitelino, o que justifica o aumento da AFP. Dessa forma, excluindo-se os casos com tumor do saco vitelino, a associação entre CK 7 e AFP ocorreu em 5,1% dos casos. Os casos com CK 7 negativa e AFP normal predominaram compreendendo 50% do total de casos estudados ($p < 0,001$). A associação entre a expressão de CK7 e a dosagem de AFP com as diferentes neoplasias está sumarizada na tabela e gráfico 9.

GRÁFICO 8 - EXPRESSÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA CONFORME O TIPO DE NEOPLASIA

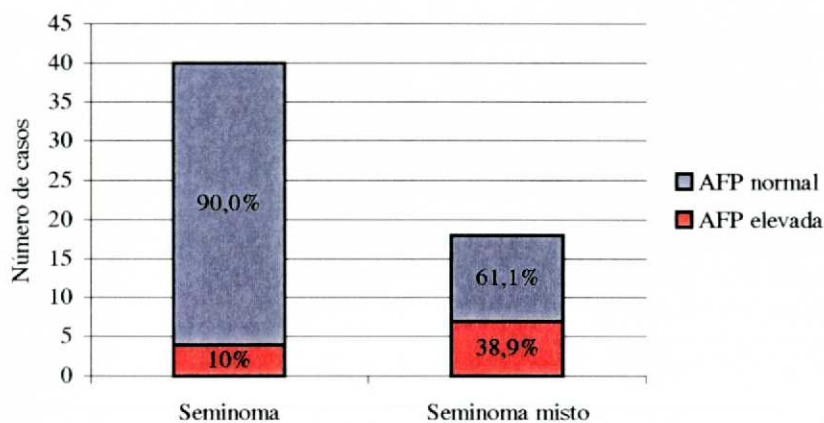


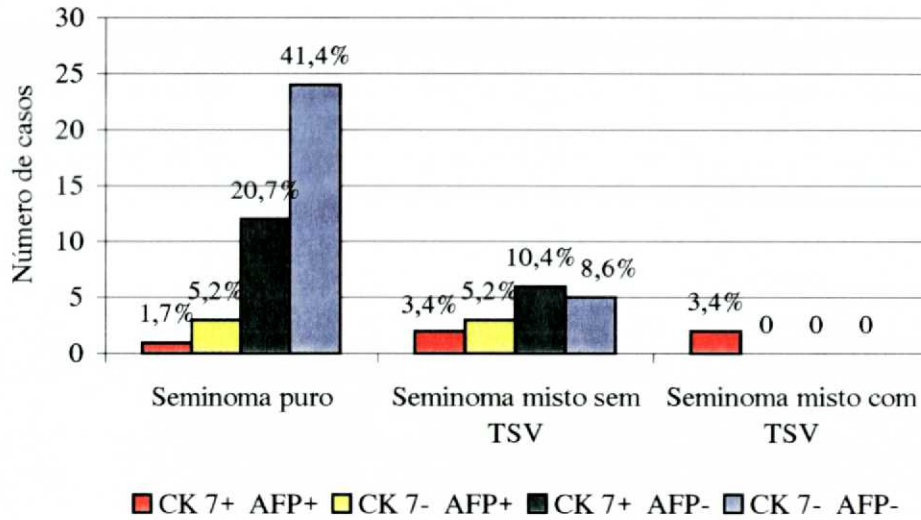
TABELA 8 - EXPRESSÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA CONFORME O TIPO DE NEOPLASIA

Marcador	Seminoma puro		Seminoma misto	
	Nº.	%	Nº.	%
Neoplasia				
AFP positiva	4	10,0	7	38,9
AFP negativa	36	90,0	11	61,1
Total	40	100,0	18	100,0

AFP Negativa X AFP Positiva = $\rightarrow z_{\text{calc}} = 6,492$ $p < 0,0001$

AFP Positiva no seminoma X AFP Positiva no seminoma misto = $\rightarrow z_{\text{calc}} = 3,601$ $p < 0,001$

GRÁFICO 9 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E ELEVAÇÃO DE ALFA-FETOPROTEÍNA NAS DIVERSAS NEOPLASIAS



Nota: TSV - Tumor do saco vitelino.

TABELA 9 - EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7 E DE ALFA-FETOPROTEÍNA NAS DIVERSAS NEOPLASIAS

Neoplasia	CK7+ AFP+		CK7- AFP+		CK7+ AFP-		CK7- AFP-	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Seminoma puro	1	1,7	3	5,2	12	20,7	24	41,4
Seminoma misto sem TSV	2	3,4	3	5,2	6	10,4	5	8,6
Seminoma misto com TSV	2	3,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	5	8,5	6	10,4	18	31,0	29	50,0

CK7 + AFP + = $\rightarrow z_{\text{calc}} = 8,166$ $p < 0,0001$

CK7- AFP - x CK7 + AFP + = $\rightarrow z_{\text{calc}} = 4,895$ $p < 0,001$

Nota: TSV - Tumor do saco vitelino.

5 DISCUSSÃO

O material obtido para exame histopatológico e subsequente estudo IHQ foi representativo exclusivamente de seminomas puros e de neoplasias mistas germinativas com componente seminomatoso, sendo que nestas o material submetido à IHQ era representativo da porção seminomatosa. Os casos estudados eram todos de pacientes com idade entre 16 e 40 anos para excluir casos de neoplasias germinativas da infância cuja histogênese e evolução são diferentes (SKAKKEBAEK et al., 1987), e do indivíduo mais idoso quando há predomínio do seminoma puro e do seminoma espermatocítico, possivelmente sem relação histogenética com as outras neoplasias germinativas; a maioria dos pacientes com neoplasia germinativa tinha entre 20 e 30 anos de idade, dado esse concordante com a literatura (SKAKKEBAEK E PERA, 1993; BARBOSA, 1999).

Dentre as neoplasias seminomatosas puras e mistas estudadas observou-se predomínio significativo do seminoma puro clássico em relação às outras neoplasias germinativas; apenas dois casos de seminoma foram da variante anaplásica, forma essa pouco reconhecida atualmente (COCKBURN, 1984; BOBBA, 1988), pois o principal critério utilizado na distinção entre os dois tumores, o número de mitoses, não é fidedigno nessa separação (VON HOCHSTETTER, 1981). Um maior percentual de casos (12,5%) de seminomas puros apresentou células sinciciotrofoblásticas. Dados de literatura relatam a presença de tais células, em cortes parafinados e corados pelo método de HE, em 4 a 7% dos casos (MOSTOFI, 1985; VON HOCHSTETTER et al., 1985). Essa pequena diferença, possivelmente, resulta da dificuldade em identificar, em muitos casos, a célula trofoblástica, pois trabalhos que utilizaram a IHQ mostram uma incidência de 20 a 25% de células gigantes nos seminomas (VON HOCHSTETTER et al., 1985).

Dentre as neoplasias mistas, a mais comum foi o carcinoma embrionário com percentual um pouco aquém (61,1%) do que se relata na literatura (JACOBSEN,

1986), onde cerca de 90% das neoplasias mistas germinativas exibem carcinoma embrionário; essa incidência relativamente mais baixa de carcinoma embrionário, deve-se, provavelmente, à exclusão de muitas neoplasias germinativas deste estudo por não apresentarem componente seminomatoso. O tumor do saco vitelino, observado em apenas dois casos, tem uma incidência bastante variável em diversos estudos. Embora seja a neoplasia germinativa mais comum na infância, no adulto, com certa regularidade, o tumor do saco vitelino não é observado (ULBRIGHT, 1997), ou por erros de amostragem pela presença de áreas muito pequenas e localizadas da neoplasia, ou por dificuldades diagnósticas enfrentadas pela grande variedade de padrões morfológicos que podem ser exibidos e pela freqüente confusão com carcinoma embrionário (MOSTOFI et al., 1988). O teratoma, de forma genérica, maduro e imaturo, teve sua incidência concordante com a maioria dos dados de literatura (MOSTOFI, 1973).

A expressão de CK7, mais freqüente nos seminomas das neoplasias mistas do que nos clássicos, reforça a evidência de que essas neoplasias originem-se de células seminomatosas (SRIGLEY et al., 1984; JACOBSEN, 1986; EGLIN e ULBRIGHT, 1987; NIEHANS, 1988; CZAJA e ULBRIGTH, 1992; HITTMAIR et al., 1996; KINUGAWA, 1998; ALGABA, 2000). A CK 7, sendo um FI característico das células epiteliais e não das germinativas, mostra que sua presença é indicadora de transformação ultra-estrutural celular, podendo levar a célula a assumir diferentes características, inclusive morfológicas. Muitos autores têm especulado sobre a histogênese das neoplasias germinativas principalmente na tentativa de estabelecer um elo entre o seminoma e o carcinoma embrionário (SRIGLEY et al., 1984; JACOBSEN, 1986; NIEHANS, 1988; CZAJA e ULBRIGTH, 1992; HITTMAIR et al., 1996; ALGABA, 2000). No entanto há muita controvérsia sobre a expressão de CK no seminoma; ALGABA (2000) e RAMAEKERS et al. (1985) refere, positividade de CK no seminoma em menos de 10% dos casos, enquanto os estudos de FERREIRO (1994), EGLIN e ULBRIGHT (1987), HITTMAIR e ROGASTSCH (1996) e CHEVILLE (2000) demonstram maior positividade, em torno de 50%, 43%, 34% e

41% respectivamente; neste último, a expressão principal foi da CK 7 quando comparada à pan-citoqueratina AEI/AEIII com 36%, e à CK 20 que não mostrou expressão. FOGEL (1990), da mesma forma, observou a presença de vários tipos de CK em neoplasias testiculares, algumas características de epitélios ditos simples e algumas, como a 4 e a 17, encontradas normalmente em células epiteliais estratificadas e células epiteliais glandulares mais complexas. LACHMANN et al., em 1993, refere positividade da CK em seminomas e ressalta ainda que a forma de seminoma atípico, levando-se em consideração os aspectos morfológicos e imunocitoquímicos, deve ser considerada como forma de transição do seminoma para o carcinoma embrionário. Há muitos outros autores como SRIGLEY et al. (1988), DENK et al. (1987), CHEN (1996) e MIETTINEN et al. (1985) que demonstraram positividade para CK nos seminomas. A grande variação da expressão de diversos tipos de CK, dentre elas a CK 7 conforme observado por CHEVILLE (2000), deve-se possivelmente a uma série de fatores que são: a fixação do material (ALGABA, 2000; CHEVILLE, 2000), o volume de tumor estudado (HITTMAIR, 1996), o pequeno número de casos na maioria das séries e as variações da técnica IHQ de cada serviço. Dessa forma, os resultados obtidos relativos à positividade da reação, apesar de não apresentarem significância estatística, são condizentes com a maioria dos estudos semelhantes. Dentre as neoplasias mistas, ainda, observamos uma expressiva e significativa positividade da CK 7 nos seminomas associados ao carcinoma embrionário quando comparados àqueles sem esse componente, reforçando ainda mais a idéia de que realmente exista uma progressão do seminoma para as outras neoplasias germinativas, principalmente para o carcinoma embrionário (SRIGLEY et al., 1988; CJAZA e ULBRIGHT, 1992; HITTMAIR, 1996). Uma forma transicional do seminoma tem sido estudada e descrita por diversos autores. Dentre esses estudos destacam-se o de SRIGLEY et al. (1988), que descreve alterações IHQ e ultraestruturais à microscópica eletrônica em seminomas com características precoces de carcinoma, o de LACHMANN et al. (1993) que observa o padrão morfológico e IHQ do seminoma dito atípico, sugerindo a existência da forma de transição da neoplasia, e o de CZAJA e ULBRIGHT (1992), que identificou seis casos de seminoma onde havia focos de transformação

morfológica e IHQ em tumor do saco vitelino. Através do trabalho de SRIGLEY (1988) foi delineado o modelo tetraédrico da histogênese da neoplasia germinativa. Nesse modelo a célula germinativa dá origem ao seminoma clássico, puro, e deste podem ter origem quatro diferentes neoplasias: (1) o seminoma com características precoces de carcinoma, responsável pela origem do carcinoma embrionário; (2) o seminoma com células gigantes sincício-trofoblásticas com possível evolução para o coriocarcinoma; (3) o seminoma associado à elevação de AFP, que pode evoluir para o tumor do saco vitelino e (4) o teratoma imaturo que pode progredir para o teratoma maduro.

Quanto à NITCG, dos 27 casos onde ela estava presente, cinco apresentaram células atípicas, intratubulares, com coloração positiva pela CK 7. Há diversos estudos sobre a NITCG, porém na maioria das vezes com ênfase à expressão de FAP (BAILEY, et al., 1991; JORGENSEN et al., 1993; ALGABA, 2000), ao padrão morfológico (POTTEK et al., 1997) ou a aspectos imunológicos específicos (BOLS, 2000). Poucos são os que tratam de verificar, nas NITCG, a positividade de reagentes comumente usados no estudo das neoplasias germinativas como vimentina, hCG, LDH, NSE, FAP, EMA, AFP, CK e Ber-H2. FERREIRO, em 1994, no entanto, ao estudar a expressão de CD-30 com o anticorpo Ber-H2 nas neoplasias germinativas observou não haver positividade nas NITCG, sendo que o mesmo foi observado por HITTMAIR em 1996; este relata, no entanto, que a similaridade celular entre a NITCG não classificada e o seminoma é bem conhecida e que a expressão de marcadores como CK e FAP é comum a ambas. SOOSAY et al. (1991) observou a expressão de vimentina e de CK de baixo peso molecular na NITCG adjacente a seminomas, teratomas e neoplasias mistas, não obtendo qualquer positividade em nenhuma delas, sugerindo dessa forma que a transformação para essas neoplasias seja posterior à invasão do interstício pelas células neoplásicas. A positividade da CK 7 nas células neoplásicas intratubulares pode significar, por exemplo, sua transformação precoce em outra neoplasia germinativa, visto existir a forma intratubular de carcinoma embrionário (ULBRIGHT, 1997; ULBRIGHT et al., 1997).

A dosagem de AFP nos casos estudados foi pouco expressiva, observando-se claramente a maior elevação nos casos com componente de tumor do saco vitelino, o que é totalmente justificado por ser a principal característica dessa neoplasia (LANGE e FRALEY, 1977; EGLIN e ULBRIGHT, 1987; MOSTOFI, 1987; NAZEER, 1998). Excetuando-se os dois casos com tumor do saco vitelino, observamos sua elevação em 4 casos de seminoma puro e em 5 casos de seminoma associado a outra neoplasia germinativa, sendo um teratoma, três carcinomas embrionários, e um carcinoma embrionário associado a teratoma. Os valores foram mais elevados igualmente nos casos nos casos com carcinoma embrionário. Os seminomas, quando associados com elevação de AFP, apresentaram os valores mais baixos, sendo que o valor mais elevado, de 123ng/ml, foi num caso de seminoma anaplásico, o qual, assim como outros 4, apresentou positividade para CK 7 na neoplasia testicular. NAZEER (1998) avaliou 10 pacientes com seminoma puro e AFP elevada e observou que um deles veio a apresentar metástases de tumor do saco vitelino em íleo e mediastino. Muitos autores vêm tentando explicar a elevação de AFP em neoplasias germinativas sem tumor do saco vitelino, principalmente nos seminomas puros, já que a sua associação com o carcinoma embrionário é mais comum (LANGE e FRALEY, 1977; SCARDINO et al., 1977; JAVADPOUR et al., 1978). As pesquisas encontram barreira sempre na baixa casuística (NAZEER, 1998) e na dificuldade, por vezes, de resgatar dados antigos ou de acompanhar a evolução do paciente. Sabe-se que pacientes com doença metastática principalmente para o fígado, ou mesmo com doença hepática não neoplásica, podem apresentar elevações discretas ou até moderadas de AFP (LANGE e FRALEY, 1977), porém a maioria dos casos descritos na literatura não apresenta doença metastática que corrobore elevações moderadas ou mesmo acentuadas, acima de 500ng/ml (ULBRIGHT et al., 1997; NAZEER, 1998). Muitos consideram que um paciente com seminoma supostamente puro e AFP significativamente elevada deve ser investigado pois a neoplasia pode apresentar pequenas áreas de não seminomatosas como tumor do saco vitelino ou carcinoma embrionário ou, ainda, evoluírem com metástase de neoplasia germinativa (JAVADPOUR, 1980; RAGHAVAN et al., 1982). Esse evento

foi observado por diversos autores como BREDAEL et al. (1982), JOHNSON et al. (1976) e DIXON e MOORE (1953). Estes relataram que 6 de 23 pacientes submetidos a autópsia com diagnóstico prévio de seminoma puro, apresentaram, nas metástases, outra neoplasia germinativa, principalmente o carcinoma embrionário. Especula-se ainda que a cadeia de AFP observada nos pacientes com tumor do saco vitelino seja diferente da cadeia encontrada nos seminomas com AFP elevada (WHEELER e RUDY, 1997), porém o significado dessa observação permanece inexplicado.

Face ao reduzido número de casos deste estudo novas investigações se fazem necessárias para que se chegue ao real significado da expressão de CKs pelos seminomas e da elevação eventual de AFP nos pacientes com seminoma.

6 CONCLUSÕES

1. A expressão de CK 7 nos seminomas puros e mistos é freqüente exibindo discreto predomínio no grupo dos seminomas mistos, principalmente naqueles com componente de carcinoma embrionário.

2. A NITCG é freqüentemente evidente na periferia das neoplasias germinativas seminomatosas, expressando CK 7 em um pequeno número de casos assim como a neoplasia invasora que a acompanha.

3. O aumento da AFP nos seminomas puros é infreqüente e discreto na maioria dos casos, sendo mais comum nas neoplasias não seminomatosas com elevação mais expressiva naquelas com componente de tumor do saco vitelino.

4. Não há associação evidente entre a expressão da CK 7 pelas células dos seminomas puros ou mistos e a elevação da AFP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGABA, A. F. Morphologic keys for the interpretation of the biology of testicular germ tumors. **Arch. Esp. Urol.**, v.53, p.407-421, 2000.
- AYALA, A.G.; RO, J.Y. Testicular tumors: clinically relevant histological findings. **Semin. Urol. Oncol.**, v.16, p.72-81, 1998.
- BARBOSA, R.P.X.G.M. **Alterações histopatológicas no parênquima testicular adjacente à neoplasia testicular de linhagem germinativa.** Curitiba, 1999. 73 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- BAILEY, D.; MARKS, A.; STRATIS, M.; BAUMAL, R. Immunohistochemical staining of germ cell tumors and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to placental alkaline phosphatase and a monoclonal anti-seminoma antibody. **Mod. Pathol.** v.4, p.167-171, 1991.
- BHARAT, J.; SCHMID, K.W. **Immunocytochemistry in diagnostic histopathology,** New York : Churchill-Livingstone. 1993. p.57.
- BOBBA, V. S. Classical and anaplastic seminoma: difference in survival. **Radiology**, v.167, p.849-852, 1988.
- BOLS, B. JENSEN, L.; JENSEN, A.; BRAENDSTRUP, O. Immunopathology of in situ seminoma. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.81, p.211-217, 2000.
- BREDAEL, J.J.; VUGRIN, D.; WHITMORE, W.F. Autopsy findings in 154 patients with germ cell tumors of the testis. **Cancer**, v.50, p.548-551, 1982.
- CARVALHO, F.; LEITÃO, B.; REIS, A. et al.. Tumores testiculares na pre-puberdade. **Acta Med. Port.**, v.11, n.7, p.627-629, 1998.
- CHEN, K.T. Cytokeratin positivity in seminoma. **Diagn Cytopathol**, v. 15, p.182-183, 1996.
- CHEVILLE, J. C. Classification and pathology of testicular germ cell and sex cord-stromal tumors. **Urol. Clin. North Am.**, v. 26, p.595-609, 1999.
- CHEVILLE, J. C.; RAO, S; ICZKOWSKI, K.A. et al. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.113, p.583-588, 2000.
- COCKBURN, A. G. Poorly differentiated (anaplastic) seminoma of the testis. **Cancer**, v.53, p.1991-1994, 1984.
- COULOMBE, P. A.; OMARY, M. B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4, p.110-122, 2002.

CZAJA, J. T.; ULBRIGHT, T. M. Evidence for the transformation of seminoma to yolk sac tumor, with histogenetic considerations. **Am.J.Clin.Pathol.**, v.97, p.468-477, 1992.

DENK, H.; MOLL, R.; WEYBORA, W. et al. Intermediate filaments and desmosomal plaque proteins in testicular seminomas and non-seminomatous germ cell tumours as revealed by immunohistochemistry. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 410, p. 295-307, 1987.

DIXON, F.J.; MOORE, R.A. Testicular tumors: a clinicopathologic study. **Cancer**, v. 6, p. 427-454, 1953

EGLIN, D. E.; ULBRIGHT, T. M. The differential diagnosis of yolk sac tumor and seminoma. Usefulness of cytokeratin, alpha-fetoprotein, and alpha-1-antitrypsin immunoperoxidase reactions." **Am. J. Clin. Pathol.**, v.88, p.328-332, 1987.

FERREIRO, JA. BerH2 expression in testicular germ cell tumors. **Human Pathol.**, v.25, n°5, p. 522-524, 1994.

FOGEL, M.; LIFSCHITZ-MERCER, B.; MOLL, R. et al. Heterogeneity of intermediate filament expression in human testicular seminomas. **Differentiation**, v.45, p.242-249, 1990.

GOIKHBERG, M. I. Clinical course and morphological characteristics of different types of seminoma. **Vopr. Onkol.**, v.30, p.51-58, 1984. Abstract.

HITTMAIR, A.; ROGASTSCH, H. CD 30 expression in seminomas. **Human Pathol.**, v.27, n° 11, p. 1166-1171, 1996.

INFERRERA, A. Therapeutic considerations on a case of mixed teratoma of the testis with seminomatous component. **Arch. Ital. Urol. Androl.**, v. 69, p.61-64, 1997.

JACOBSEN, G.K. Histogenetic considerations concerning germ cell tumours. Morphological and immunohistochemical comparative investigation of the human embryo and testicular germ cell tumours. **Virchows Arch.**, v.408, p.239-247, 1986.

JAVADPOUR, N. The National Cancer Institute experience with testicular cancer. **J. Urol.**, v.120, p.651-659, 1978

JAVADPOUR, N. Management of seminoma based on tumor markers. **Urol. Clin. North Am.**, v.7, p.773-781, 1980.

JORGENSEN, N.; GIWERCMAN, A.; MULLER, J.; SKAKKEBAEK, N.E. Immunohistochemical markers of carcinoma in situ of the testis also expressed in normal infantile germ cells. **Histopathology**, v. 22, p.373-378, 1993.

JOHNSON, D.E.; APPELT, G.; SAMUEL, M.L. et al. Metastases from testicular carcinoma. Study of 78 autopsied cases. **Urology**, v. 8, p.234-239, 1976.

JOHNSON, D. E.; GOMEZ, J. J.; AYALA, A. G. Anaplastic seminoma. **J. Urol.**, v.114, p.80-82, 1975.

- KADEMIAN, M. Anaplastic seminoma. **Cancer**, v.40, p.3082-3086, 1977.
- KINUGAWA, K.; HYODO F.; MATSUKI, T et al. Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, JKT-1. **Int. J. Urol.**, v.5, p.282-287, 1998.
- KURMAN, R.J.; SCRADINO, P.T.; McINTIRE, K.R. et al. Cellular localization of the alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. **Cancer**, v.40, p.2136-2151, 1977.
- LACHMANN, M. F.; RICCI, A; PEDERSEN, C.; CARTUN, R.W. Atypical seminoma-histologic features, immunohistochemical characterization, and correlation with survival. **Conn. Med.**, v.57, p.443-449, 1993.
- LANGE, P.H.; FRALEY, E.E. Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in treatment of patients with testicular tumors. **Urol. Clin. North Am.**, v. 4, p.393-406, 1977.
- LEHTO, V. P.; MIETTINEN, M; VIRTANEN, I. Antibodies to intermediate filaments in surgical pathology. **Arch. Geschwulstforsch**, v.56, p.283-298, 1986.
- MIETTINEN, M.; VIRTANEN, I.; TALERMAN, A. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. **Am J Pathol**, v. 120, p. 402-410, 1985.
- MOLL, R.; FRANKE, W.W.; SCHILLER, D.L. et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell**, v. 31, p. 11-24, 1982.
- MOSTOFI, F.K. Testicular tumors: epidemiologic, etiologic and pathologic features. **Cancer**, v.32, n.5, p.1186-1201, 1973.
- MOSTOFI, F. K.; SESTERHENN, I.A. Pathology of germ cell of the testis. **Progn. Clin. Biol. Res.**, v.203, p.1, 1985.
- MOSTOFI, F. K.; SESTERHENN, I.A.; DAVIS, C.J. Developments in histopathology of testicular germ cell tumors. **Semin. Urol.**, v.6, p.171-188, 1988.
- NAZEER, T.; RO, J.Y.; AMATO, R.J. et al. Histologically pure seminoma with elevated alpha-fetoprotein: a clinicopathologic study of ten cases. **Oncol. Rep.**, v.5, p.1425-1429, 1998.
- NIEHANS, G.A.; MANIVEL, J.C.; COPLAND, G.T. et al. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms, **Cancer**, v.62, p.1113-1123, 1988.
- PARKINSON, C.; BEILBY, J. O. Features of prognostic significance in testicular germ cell tumours. **J. Clin. Pathol.**, v.30, p.113-119, 1977.
- POTTEK, T.; LAUKE, H.; HARTMANN, M. Carcinoma-in-situ in testes with germ cell tumour. Comparison of clinical parameters with histological findings in testicular tissue near to and distant from the tumour. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.424, p.79-80, 1997.

RAGHAVAN, D.; SULLIVAN, A.L.; PECKHAN, M; NEVILLE, A.M. Elevated AFP in seminomas. **Cancer**, v. 50, p. 982-989, 1982.

RAMAEKERS, F.; FEITZ, W.; MOESKER, O. et al.. Antibodies to cytokeratin and vimentin in testicular tumour diagnosis. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 408, p. 127-142, 1985.

SCARDINO, P.T.; COX, H.D.; WALDMANN, T. A. et al. The value of serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. **J. Urol.**, v.118, p.994-999, 1977.

SCHRADER, M.; HEICAPPELL, R.; MULLER, M. et al. Molecular markers in testicular germ cell tumors-objects of clinical research or close to becoming clinical tools? **Onkologie**, v.24, p.144-148, 2001.

SHULMAN, Y. Anaplastic seminoma. **Urology**, v.21, p.379-381, 1983.

SKAKKEBAEK, N.E.; BERTHELSEN, J.G.; GIWERCMAN, A. et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. **International Journal of Andrology**, v.10, n.1, p.19-28, Feb. 1987.

SKAKKEBAEK, N.E.; PERA, M.F. Pathogenesis of testicular germ cell tumours. **European Urology**, v.23, p.2-7, 1993.

SOOSAY, G.N.; BOBROW, L.; HAPPERFIELD, L.; PARKINSON, M.C. Morphology and immunohistochemistry of carcinoma in situ adjacent to testicular germ cell tumours in adults and children: implications for histogenesis. **Histopathology**, v. 19, p.537-544, 1991.

SRIGLEY, J.R.; MACKAY, B.; TOTH, P. et al. The ultrastructure and histogenesis of male germ cell neoplasia with emphasis on seminoma and embryonal carcinoma. **Cancer**, v.54, p.843-848, 1984

STEIN, M. Anaplastic seminoma of the testis. **Harefuah**, v.122, p.4-6, 1992. Abstract.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; NAGURA, H. et al.. Immunohistochemical comparison between anaplastic seminoma and typical seminoma. **Acta Pathol. Jpn.**, v.43, p.751-757, 1993.

ULBRIGHT, T. M. Neoplasms of the testis. in: BOSTWICK, D. G.; EBLE, J.N. **Urological Surgical Pathology**. Missouri : Mosby. 1997. p.567-645

ULBRIGHT, T.M.; AMIN, M.B.; YOUNG, R.H. **Atlas of tumor pathology: Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord and scrotum**, vol. 25, Washington D.C. 1997. p.78.

ULBRIGHT, T.M.; ROTH, L.M. Testicular and paratesticular neoplasms. In: STERNBERG, S.S. **Diagnostic Surgical Pathology**. 2nd ed. New York : Raven Press, 1994. v.2, p.1885-1947.

VAN NIEKERK, C.C.; JAP, P.H.K.; RAMAEKERS, F.C.S. et al. Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin embedded human tissues. **J Pathol**, v. 165, p. 145-152, 1991.

VON HOCHSTETTER, A.R. Mitotic count in seminomas – an unreliable criterion for distinguishing between classical and anaplastic types. **Virchows Arch.**, v.390, p.63-69, 1981. Abstract.

VON HOCHSTETTER, A.R. SIGG, C.; SAREMASLANI, P.; HEDINGER, C. The significance of giant cells in human testicular seminomas. A clinicopathological study. **Virchows Arch.**, v.407, p.309-322, 1985. Abstract.

WANG, P.N.; ZEE, S.; ZARBO, R.J. et al. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. **Appl Immunohistochem**, v. 3, p.99-107, 1995.

WHEELER, J.E.; RUDY, F.R. The testis, paratesticular structures, and male external genitalia. In: SILVERBERG, S.G.; DeLELLIS, R.A.; FRABLE, W.J. **Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p.2237-2293.

WITTEKIND, C.; WICHMANN, T.; VON KLEIST, S. Immunohistological localization of AFP and HCG in uniformly classified testis tumors. **Anticancer Res.**, v.3, p.327-330, 1983.

WOODS, A.E. et ELLIS, R.C. **Laboratory Histopathology: A Complete Reference**, Churchill-Livingstone, New York, v. 2, s. 8.2, 1996.

ANEXO I

TABELAS DE DADOS

IDADE E DIAGNÓSTICO

NUMERO	IDADE	DIAGNÓSTICO
1	35	S
2	34	S
3	22	S
4	36	S
5	34	S
6	40	S
7	38	S
8	40	S
9	34	S
10	25	S
11	19	S
12	35	S
13	26	S
14	40	S
15	23	S
16	18	S
17	17	S
18	29	S
19	30	S
20	39	S
21	37	S
22	22	S
23	24	S
24	40	S
25	28	S
26	30	S
27	23	S
28	28	S
29	35	S
30	19	S

TABELAS DE DADOS**IDADE E DIAGNÓSTICO**

Continuação

NUMERO	IDADE	DIAGNÓSTICO
31	21	S
32	34	S
33	19	S
34	24	S
35	39	S
36	26	S
37	28	S
38	26	S
39	25	SA
40	23	SA
41	40	T
42	39	T
43	28	T
44	38	T
45	24	T
46	34	T
47	32	T
48	30	CE
49	17	CE
50	28	CE
51	39	CE
52	34	CE
53	26	CE
54	32	CE T
55	36	CE T
56	20	CE T
57	27	CE TSV
58	38	CE TSV

EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7

NUMERO	DIAGNÓSTICO	CK7
1	S	-
2	S	-
3	S	+
4	S	-
5	S	-
6	S	+
7	S	+
8	S	+
9	S	+
10	S	-
11	S	+
12	S	+
13	S	+
14	S	-
15	S	+
16	S	-
17	S	-
18	S	+
19	S	+
20	S	+
21	S	-
22	S	-
23	S	-
24	S	-
25	S	-
26	S	-
27	S	-
28	S	-
29	S	-

EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 7

Continuação

NUMERO	DIAGNÓSTICO	CK7
30	S	-
31	S	-
32	S	-
33	S	-
34	S	-
35	S	-
36	S	-
37	S	-
38	S	-
39	SA	+
40	SA	-
41	T	-
42	T	+
43	T	-
44	T	+
45	T	-
46	T	-
47	T	-
48	CE	+
49	CE	+
50	CE	+
51	CE	+
52	CE	-
53	CE	-
54	CE T	+
55	CE T	+
56	CE T	-
57	CE TSV	+
58	CE TSV	+

DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA

NUMERO	DIAGNÓSTICO	AFP DG
1	S	0
2	S	0
3	S	0
4	S	2,8
5	S	0,85
6	S	1,5
7	S	0
8	S	0
9	S	0
10	S	0
11	S	1,6
12	S	3,5
13	S	1,2
14	S	0
15	S	0
16	S	5,4
17	S	0
18	S	0
19	S	0
20	S	0
21	S	41
22	S	8
23	S	0
24	S	0
25	S	0
26	S	0
27	S	0
28	S	0
29	S	1,4

DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA

Continuação

NUMERO	DIAGNÓSTICO	AFP
30	S	79
31	S	3,2
32	S	0
33	S	45
34	S	0
35	S	3,4
36	S	0
37	S	0
38	S	0
39	SA	123
40	SA	2,3
41	T	1,6
42	T	26
43	T	2,1
44	T	5,3
45	T	0
46	T	0
47	T	1,1
48	CE	3,2
49	CE	35
50	CE	0
51	CE	0
52	CE	151
53	CE	102
54	CE T	0
55	CE T	0
56	CE T	98
57	CE TSV	846
58	CE TSV	321

NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS

NUMERO	DIAGNÓSTICO	NITCG	CK 7 POSITIVA
1	S	Presente	-
2	S	Presente	-
3	S	Presente	+
4	S	-	-
5	S	Presente	-
6	S	-	-
7	S	Presente	-
8	S	-	-
9	S	Presente	-
10	S	Presente	-
11	S	-	-
12	S	Presente	+
13	S	-	-
14	S	Presente	-
15	S	-	-
16	S	Presente	-
17	S	Presente	-
18	S	Presente	-
19	S	Presente	+
20	S	-	-
21	S	Presente	-
22	S	-	-
23	S	-	-
24	S	Presente	-
25	S	-	-
26	S	-	-
27	S	-	-
28	S	-	-
29	S	-	-

NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINATIVAS

Continuação

NUMERO	DIAGNÓSTICO	NITCG	CK 7 POSITIVA
30	S	Presente	-
31	S	Presente	-
32	S	-	-
33	S	-	-
34	S	-	-
35	S	Presente	-
36	S	Presente	-
37	S	Presente	-
38	S	Presente	-
39	SA	-	-
40	SA	-	-
41	T	-	-
42	T	-	-
43	T	-	-
44	T	-	-
45	T	-	-
46	T	-	-
47	T	-	-
48	CE	Presente	+
49	CE	Presente	+
50	CE	Presente	-
51	CE	Presente	-
52	CE	-	-
53	CE	-	-
54	CE T	-	-
55	CE T	Presente	-
56	CE T	Presente	-
57	CE TSV	-	-
58	CE TSV	-	-

ANEXO II

HEMATOXILINA E EOSINA

Coloração Hematoxilina e Eosina

Técnica:

- 1) Lavar em água corrente;
- 2) corar em solução de hematoxilina de Harris por 50 segundos;
- 3) lavar em água corrente;
- 4) água amoniacal;
- 5) corar em solução de eosina;
- 6) lavar, desidratar, diafanizar e montar.

Soluções:

A. Hematoxilina de Harris:

- hematoxilina - 5 g;
- álcool etílico - 50 ml;
- alúmen de potássio - 100 g;
- água destilada - 950 ml;
- óxido de mercúrio - 2,5 g;
- ácido acético glacial - 40 ml.

Dissolver a hematoxilina no álcool levemente aquecido (56°C) em banho-maria; dissolver o alúmen de potássio em água destilada aquecida em chama, acrescentar a solução alcóolica de hematoxilina e deixar ferver. Adicionar o óxido de mercúrio e então o ácido acético. Filtrar.

ANEXO III

IMUNOHISTOQUÍMICA

1. Cortes de 4µm em lâminas silanizadas
2. Desparafinização
 - a. Xilol quente por 20 minutos
 - b. Xilol 24° C por 20 minutos
3. Hidratação
 - a. Álcool absoluto
 - b. Álcool absoluto
 - c. Álcool absoluto
 - d. Álcool 95%
 - e. Álcool 90%
 - f. Álcool metílico (200 ml) com 20ml peróxido de hidrogênio por 15 minutos
4. Processamento Imunohistoquímico
 - a. Lavar em água corrente por 5 minutos
 - b. Lavar em água destilada e deixar em repouso por 5 minutos
 - c. Recuperação antigênica com tampão citrato a 10mmol/L em pH 6,0
 - d. Colocar as lâminas nas cubas úmidas e molhar os cortes com água destilada
 - e. Escorrer as lâminas uma a uma e enxugar delicadamente os cortes com papel absorvente e circular com caneta demarcadora (Dako Pen®)
 - f. Cobrir os cortes com a solução *Peroxidase Block* (peróxido de hidrogênio 0,03%) por 10 minutos
 - g. Lavar com água destilada
 - h. Lavar com tampão (TBS) e deixar em repouso por 10 minutos
 - i. Secar as lâminas com papel absorvente
 - j. Aplicar o anticorpo anti-CK 7 (*monoclonal mouse anti-human cytokeratin 7*) em diluição 1:50 e deixar incubando por 30 minutos
 - k. Lavar com tampão (TBS)
 - l. Deixar em repouso por 10 minutos
 - m. Secar as lâminas com papel absorvente

- n. Aplicar a solução *Labelled Polymer* por 30 minutos
 - o. Lavar com tampão (TBS)
 - p. Deixar em repouso por 10 minutos
 - q. Aplicar DAB (3,3 diaminobenzidina) + substrato tamponado + cromógeno sobre os cortes por 5 a 10 minutos
 - r. Lavar as lâminas em água corrente, água destilada e corar
5. Coloração
- a. Colocar hematoxilina sobre as lâminas por 1 minuto – cora núcleos celulares
 - b. Lavar em água corrente
 - c. Água amoniacal por 40 segundos para retirar o excesso de corante
 - d. Lavar em água corrente
 - e. Desidratar em álcool por 2 a 3 vezes
 - f. Clarear em xilol
6. Montar em Entellan
- a. Colocar resina na lamínula com auxílio de um bastão de vidro
 - b. Enxugar o verso das lâminas com um pano e colocá-las sobre as lamínulas
 - c. Identificar a lâmina