



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Francisco Carlos Quevedo

**TUMORES TESTICULARES GERMINATIVOS
NÃO-SEMINOMAS:
IMUNOEXPRESSÃO PROTÉICA DE EGFR, Her2 E c-Kit**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida C. Domingues
Coorientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Botucatu

Francisco Carlos Quevedo

**TUMORES TESTICULARES GERMINATIVOS NÃO-SEMINOMAS:
IMUNOEXPRESSÃO PROTÉICA DE EGFR, Her2 E c-Kit**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora. Professora Maria Aparecida Custodio Domingues
Coorientador: Dr. João Lauro Viana de Camargo

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Quevedo, Francisco Carlos.

Tumores testiculares germinativos não-seminomas :
imunoexpressão proteica de EGFR, HER-2 E KIT / Francisco
Carlos Quevedo. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Aparecida Custodio Domingues
Coorientador: João Lauro Viana de Camargo
Capes: 2060000

1. Testículos - Tumores. 2. Células germinativas.
3. Imuno-histoquímica. 4. Expressão gênica. 5. Amplificação
de genes. 6. Oncogenes.

Palavras-chave: Amplificação de genes; Células germinativas;
Expressão gênica; Imuno-histoquímica; Testículos; Tumores.

Dedicatória

À minha esposa Maria Ângela e a meus filhos André e Fernando.

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos pacientes que forneceram o material analisado neste estudo.

Aos colegas dos Departamentos de Urologia e de Patologia, Dr. Renato Prado Costa, Dr. Guilherme Prado Costa, pelo estímulo e colaboração na viabilização desse estudo.

Ao Sr. Donald Botelho Veneziano, do RHC do Hospital Amaral Carvalho, pelo levantamento e organização dos dados tabulados, objeto deste estudo.

Sra. Adriana Biffe Broti, minha secretária, por sua dedicação e paciência.

Dra. Erika Raduam, pela disponibilidade em realizar as fotomicrografias desse trabalho.

Sra. Vânia Soler, Secretária do Programa de PG em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelas orientações administrativas exigidas pelo Programa.

Prof (a). Dra. Cristiane Murta Ramalho Nascimento, Prof (a). Assistente Doutora do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelos comentários e análise epidemiológica dos pacientes que constituíram esse estudo.

Meus agradecimentos à Dra. Isabela Werneck pela atenção, carinho nas atividades junto ao Hospital A.C. Camargo;

Ao meu coorientador Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela amizade, envolvimento e paciência.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Aparecida C. Domingues pela atenção e carinho.

*“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior.”
(Sua Santidade Dalai Lama)*

Resumo

As neoplasias testiculares constituem aproximadamente 1% dos cânceres masculinos. Dentre eles, os tumores que têm origem nas células germinativas (TTCG) são os mais frequentes. Por sua natureza, esses tumores têm padrão morfológico variado, sendo distribuídos em dois subgrupos: os seminomas e os não-seminomas. Esses últimos, por sua vez, são classificados em carcinomas embrionários, tumores do seio endodérmico, coriocarcinomas, teratomas e tumores mistos de células germinativas. Há consenso na literatura de que a invasão vascular verificada histologicamente no tumor primário é o melhor indicador preditivo de progressão da doença e recidiva. Estudos recentes demonstram o papel dos fatores de crescimento e seus receptores para avaliação prognóstica dos TTCG, no que o uso da imuno-histoquímica é fundamental. O presente estudo procurou avaliar pela técnica imuno-histoquímica a ocorrência da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), do Her2 e do c-Kit em uma série de TTCG não-seminomas primários de testículo. Além disso, explorou a possível relação entre a expressão desses marcadores com a evolução dos pacientes após terapêutica convencional. A série foi constituída de amostras parafinadas existentes no Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, totalizando 103 pacientes que receberam o diagnóstico de tumor testicular de células germinativas não-seminomas (TTCGNS) no período 1996-2010. Dentre os 103 casos, predominaram os TTCGMNS (57,3%). Nestes, observou-se o predomínio de marcação para EGFR e c-Kit. O EGFR foi expresso quando o componente coriocarcinoma era predominante e o c-Kit no componente epitelial do teratoma. A hipótese do estudo, que os casos positivos para os marcadores analisados estariam correlacionados com sobrevida menor, não foi confirmada pela análise estatística de Kaplan-Meier; seria necessário um maior número de casos para se chegar a uma conclusão quanto à sobrevida. Superexpressão, amplificação gênica e mutações ativadoras são frequentes em tumores testiculares germinativos; deste modo, o uso da técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para avaliação dos eventos gênicos relativos a imunoexpressão proteica, observada pelos resultados encontrados no estudo imuno-histoquímico. Somente um caso, classificado como TTCGM, apresentava amplificação para gene EGFR. Este caso apresentou bom prognóstico. Considerou-se que, a ausência de amplificação observada na maioria dos casos, deve-se a qualidade inadequada do material parafinado e estocado. Conclui-se que, na série estudada, os TTCGNS expressam os marcadores EGFR, Her2 e c-Kit, a depender do subtipo histológico; entretanto, estas proteínas não tiveram impacto prognóstico. A amplificação gênica para o EGFR pode ocorrer de forma isolada, porém devido a condições técnicas restritivas, não foi possível observá-la nos demais casos positivos para EGFR pela técnica de imuno-histoquímico.

Palavras Chaves: germinativos; não-seminomas; tumores testiculares.

Abstract

Testicular neoplasms constitute approximately 1% of male cancers. Among these, germ cell tumors (TGCT) are the most prevalent. These tumors show varied morphological patterns and are distributed into two subgroups: seminomas and non-seminomas. The latter, in turn, are classified as embryonal carcinomas, endodermal sinus tumors, choriocarcinomas, teratomas and mixed germ cell tumors. The consensus in the literature is that histological verification of vascular invasion (VI) in the primary tumor is the best predictor of disease progression and recurrence. However, recent studies have highlighted the role of growth factors and their receptors for prognostic evaluation of TGCT, in which the use of immunohistochemistry is fundamental. This study sought to evaluate the occurrence of epidermal growth factor receptor (EGFR), Her2 and c-Kit in a series of primary non-seminoma TGCTs. In addition, possible relationships between the expression of these markers and patient evolution following conventional therapy was investigated. The series consisted of paraffin-embedded samples from the Laboratory of Anatomical Pathology and Cytology of Amaral Carvalho Hospital in Jaú, SP, Brazil, of 103 patients diagnosed with testicular non-seminoma germ cell tumor (NSGCT) over a 15-year period (1996-2010). Among the 103 cases, testicular NSGCT predominated (57.3%), and among these, staining for EGFR and c-Kit predominated. EGFR was expressed when the choriocarcinoma component was predominant, and c-Kit when the epithelial component of the teratoma was predominant. The initial hypothesis that positive cases for any marker would be correlated to lower survival was not confirmed by Kaplan-Meier survival probability studies. A larger number of cases is required to reach any conclusions concerning survival. Gene overexpression and amplification and activating mutations are common in testicular germinal tumors, thus fluorescent in situ hybridization (FISH) was used to validate the genic events results obtained in the immunohistochemical study. Only one case, classified as mixed TGCT, showed EGFR gene amplification, and this case presented good prognosis. The lack of amplification observed in most cases was due to the inadequate quality of the stored, paraffin-embedded materials. In conclusion, in the series studied, testicular NSGCT expressed EGFR, Her2 and c-Kit markers depending on the histological subtype; however, these proteins had no prognostic impact. Gene amplification for EGFR may occur in isolation, but due to the limited technical conditions, it was not observed in the other cases positive for EGFR using immunohistochemistry.

Keywords: germ cell; non-seminoma; testicular tumors.

Sumário

<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	12
1. Introdução	12
2. Classificação e descrição dos TTCG	12
3. Subtipos	14
4. Marcadores Teciduais	17
5. Tratamento	18
<i>ESTUDO</i>	20
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Série e Critérios de Inclusão	23
2. <i>Tissue Microarray (TMA)</i>	24
3. Protocolos de imuno-histoquímica para EGFR, Her2 e c-Kit	24
4. Avaliação das expressões imuno-histoquímicas	25
5. <i>FISH</i> (hibridação por fluorescência in situ) para pesquisa de amplificação gênica EGFR, KIT, HER2	25
6. Análise estatística	26
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICES	47

Abreviaturas:

TTCG: Tumor Testicular de Células Germinativas;

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana;

NITCG: Neoplasia Intratubular de células Germinativas;

TSE: Tumor do Seio Endodérmico;

NITCGI: Neoplasia de Células Germinativas Intratubular não classificável;

NCGIS: Neoplasia de Células Germinativas *in situ*;

CE: Carcinoma Embrionário;

β -HCG: Fração Beta da Gonadotrofina Coriônica Humana;

AFP: Fração Alfa da proteína fetal Humana;

TE: Teratoma;

TTCGM: Tumor Testicular de Células Germinativas Misto;

TTCGNS: Tumor Testicular de Células Germinativas Não-Seminoma;

PLAP: Fosfatase Alcalina Placentária;

DHL: Desidrogenase Láctica;

CEA: Antígeno Carcino Embrionário;

IV: Invasão Vascular;

FISH: Hibridização Fluorescente *in situ* ;

RPLND: Dissecção dos Linfonodos Retroperitoneais;

TK: Tirosina quinase;

EGFR ou ErB-1: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico I ;

HER2/ c-neu ou ErB-2: Receptor de Crescimento Epidérmico II (relativo ao gene);

Her2: Receptor de Crescimento Epidérmico II (relativo ao marcador tecidual, o anticorpo ou a proteína);

IMH: Imuno-histoquímica;

KIT: Proto oncogene receptor de tirosina quinase (relativo ao gene, também denominado c-KIT e CD117);

c-Kit: relativo a proteína codificada pelo gene KIT;

TMA: Micro arranjo de tecidos (*Tissue microarray*).

REVISÃO DA LITERATURA

I. Introdução

As neoplasias testiculares constituem aproximadamente 1% dos cânceres masculinos (1). Estão entre as neoplasias malignas mais comuns em homens entre 15-45 anos. A incidência mundial da doença é de 7,5 por 100.000 habitantes, mas as taxas de incidência variam consideravelmente entre diferentes países e etnias (2). Nos países escandinavos observam-se as maiores taxas: 5,3; 9,2 e 9,6/100.000 habitantes na Suécia, Dinamarca e na Noruega, respectivamente. Nos Estados Unidos da América a incidência é de 5,7/100.000 habitantes em 2001, segundo dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results*. No Brasil, a incidência é de 2,2/100.000 habitantes. Os tumores testiculares de células germinativas (TTCG) representam 94-96% de todas as neoplasias testiculares, enquanto que os originados nos cordões sexuais constituem de 4-6% (3).

As causas dos TTTCG ainda permanecem desconhecidas. Fatores de risco conhecidos incluem história familiar da doença, tumor de células germinativas prévio, subfertilidade, testículo ectópico (4) e microlitíase testicular (5). Casos familiares têm sido observados, particularmente entre gêmeos (6). Criptorquidismo e síndrome de Klinefelter também são fatores predisponentes ao desenvolvimento de tumores de células germinativas originados do testículo e mediastino respectivamente (7). A orquidopexia realizada antes da puberdade reduz o risco de TTTCG e facilita a observação clínica macroscópica do testículo. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) parece resultar em maior incidência de tumores de células germinativas, mas a consistência desta associação requer maiores estudos (8). Apesar de possível evidência clínica de que a exposição ao dietilestilbestrol poderia induzir o desenvolvimento de TTTCG (5,6), estudos epidemiológicos falharam em identificar uma associação entre esse estrógeno não-esteróide sintético e os tumores testiculares (9).

II. Classificação e descrição dos TTCCG

A lesão precursora de todos os TTCCG é a neoplasia intratubular de células germinativas (NITCCG), com exceção do seminoma espermatocítico, tumor do seio endodérmico (TSE) pré-puberal e teratoma. A NITCCG é observada, na grande maioria dos casos, onde são encontrados túbulos seminíferos residuais ao redor de um TTCCG invasivo (10). Está presente em aproximadamente 5% dos casos de criptorquidismo (11), 5% dos pacientes com um TTCCG contralateral (11) e frequentemente em gônadas disgenéticas.

Os TTCCG têm sido classificados em duas categorias principais, baseados em seu padrão histológico: seminomas e não-seminomas. Os seminomas são constituídos por células que se assemelham às células germinativas primordiais, enquanto os não-seminomas são compostos de tecidos neoplásicos exibindo aspectos somáticos embrionários e ou extra-embrionários (12,13). O seminoma é a neoplasia testicular mais comum e compreende de 40-50% de todos os TTCCG (14–16). Uma rara variante histológica é o seminoma espermatocítico, não associado com a neoplasia de células germinativas intratubular não classificável (NITCCGI); assim, sua relação com os outros tumores de células germinativas é incerta (17).

Os tumores não-seminomas tem pico de incidência na terceira década de vida, estando representados pelo carcinoma embrionário, tumor do seio endodérmico (TSE), coriocarcinoma, teratoma e tumores mistos. Em 2016, a Sociedade Internacional de Consulta em Patologia Urológica, Câncer Testicular e Peniano, por solicitação da Organização Mundial da Saúde, fez uma revisão da classificação de 2004. As principais alterações estão associadas e derivadas da patogenia, previamente mencionada. Utiliza a terminologia neoplasia de células germinativas in situ (NCGIS) como um novo nome para a lesão precursora e, a distinção de tumores pré-púberes (não NCGIS) de tumores pós-púberes (NCGIS derivado); reconhece ainda, a existência de um raro Teratoma Benigno do tipo pré-púbere, no testículo pós-púberes. O termo tumor espermatocítico é adotado como um substituto para o seminoma espermatocítico, para evitar confusão potencial com o seminoma usual. O espectro de tumores trofoblásticos, continua a expandir-se, incluindo: tumores

trofoblásticos de epitélio e placenta análogos aos do tracto ginecológico. Os termos “anaplasia” ou “imaturidade” não são necessários, uma vez que não têm importância prognóstica demonstrável. Por outro lado, o crescimento excessivo de um componente teratomatoso (malignidade de tipo somático) e transformação sarcomatosa no tumor espermatocítico, indicam comportamento mais agressivo, e devem ser relatados.

III. Subtipos:

1. O Carcinoma Embrionário (CE) possui o tipo celular mais indiferenciado dentre esses tumores germinativos, com capacidade para se diferenciar nas outras variantes não-seminoma. Representa algo mais que 3% dos TTCG, embora aproximadamente 40% de todos os TTCG contenham um componente de CE (14). Mais de 50% dos tumores, seja na forma pura ou nos com predomínio do padrão CE, se apresentam com doença metastática. As formas puras do CE ocorrem mais comumente durante as terceira ou quarta décadas de vida, em indivíduos com idade média de trinta e dois anos (14), sendo raro antes da puberdade (18). As metástases mais comumente ocorrem nos nódulos linfáticos retro-peritoniais, com consequente dor na região dorsal, mas 20% dos doentes, com doença metastática, apresentam comprometimento supra-diafragmático (19). O CE não está associado com a elevação da β -HCG (*β -human chorionic gonadotropin*) sérica ou da α -fetoproteína (AFP) (19). Alguns relatos sugeriram que a associação da elevação desses marcadores seria provavelmente devida ao diagnóstico equivocado do tumor que não teria reconhecido variantes do tumor do seio endodérmico. De maneira semelhante, o CE não deve expressar imunoreatividade para nenhum desses marcadores.

2. O Tumor do Seio Endodérmico (TSE) é caracterizado por padrões morfológicos múltiplos que recapitulam o saco de *Yolk*, o alantóide e o mesênquima extra-embriônico. Sua incidência tem picos com distribuição bimodal de acordo com a idade; crianças nos primeiros anos de vida e anos subsequentes, e jovens do sexo masculino na pós-puberdade. Eles representam 75% dos TTCG da infância, quando comumente ocorrem dentro dos primeiros dois anos de vida na sua forma morfológica pura. No período pós-puberal raramente se apresentam em forma pura, mas estão presentes em

aproximadamente metade dos TTCG (20). Em muitas, crianças em estádios iniciais da doença (estádio I), a orquiectomia radical é curativa. Mesmo nas crianças, com doença mais avançada o prognóstico é melhor do que em adultos, sugerindo um grau maior de sensibilidade à quimioterapia. Existe alguma evidência de que adultos, com o componente de TSE em TTCG, têm maior frequência da doença no estágio I (21-23). Contudo, a presença de elementos do TSE no câncer testicular metastático tem sido associada com pior prognóstico, sugerindo que o TSE tem um potencial metastático menor, mas é menos quimiosensível que o CE (12). Não é incomum que elementos do TSE sejam o único componente ou o componente predominante em pacientes, com doença refratária à quimioterapia. Os pacientes com TTCG com componente de TSE tem elevação sérica da AFP em 95% a 100% dos casos (24).

3. O Coriocarcinoma (CC) é composto de sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e outras células trofoblásticas. Compreende menos de 1% dos TTCG em sua forma pura; contudo, pode ser encontrado como componente dos TTCG mistos em mais do que 15% dos casos (14,19). Em sua forma pura esses tumores extremamente malignos ocorrem na segunda e terceira décadas da vida, quando comumente se apresentam com altos níveis de β -HCG sérica e metástases. Estas podem ocorrer em locais comuns aos demais tumores testiculares que se disseminam por via linfática, mas também se disseminam por via hematogênica para vísceras, incluindo pulmão, fígado, trato gastrointestinal, baço, cérebro e adrenais. Ao contrário dos outros TTCG, pacientes com CC puro mais comumente apresentam sintomas relacionados com a metástase e não com a massa testicular. Isto é devido à disseminação precoce antes do desenvolvimento de lesão palpável. Mesmo após a constatação de um coriocarcinoma metastático, um significativo número de pacientes não apresentam anormalidades palpáveis nos testículos. Os sintomas apresentados são hemoptise secundária às metástases pulmonares, dor dorsal em consequência do comprometimento retroperitoneal e sintomas neurológicos devidos ao envolvimento do sistema nervoso central (25). Raros pacientes apresentam metástases cutâneas (26)

4. O Teratoma (TE) é uma neoplasia de células germinativas que se diferencia em qualquer um dos três padrões de natureza somática: ectoderma

(19), mesoderma (3) ou endoderma (4). Tumores compostos de apenas um desses componentes são referidos como teratomas monodérmicos. O TE pode apresentar tecidos maturos, embrionários ou mistura de ambos. Historicamente, eram classificados em imaturos e maturos de acordo com seu grau de diferenciação, atualmente a Organização Mundial de Saúde recomenda que estas morfologias sejam consideradas como entidade única baseadas na superposição de fatores genéticos e clínicos (3). Os TE testiculares ocorrem antes da puberdade ou na idade adulta, cada um com seu comportamento biológico próprio. Na idade pré-puberal, em geral antes dos dois anos e raramente após quatro anos de idade, representam 20% do total de TE, usualmente aparecem na forma pura e são invariavelmente benignos. Esses tumores não estão associados com neoplasia de células germinativas intra-tubular e são provavelmente diploides. Após a puberdade em geral comparecem como componentes dos TTCG mistos, sendo raras as formas puras (<7%). Sejam maturos ou imaturos, esses tumores, são considerados malignos pois ocorrem tanto no sítio primário como nas metástases. No adulto, esses tumores comumente são aneuplóides e exibem como marcador um isocromossomo no braço curto do cromossomo 12 i(12p) que, inclusive, tem importância diagnóstica e prognóstica. Na criança são neoplasias normais citogeneticamente, benignas, diploides (27). Se os componentes maturos de um teratoma são capazes de produzir metástases ou se a sua presença no local da metástase representa diferenciação dentro de um clone mais primitivo da metástase, como no CE ou TSE, é discutível. Os componentes do TE podem ser o único tumor residual reconhecível após regressão espontânea ou terapia sistêmica (10). Em pacientes com TE puros, os marcadores séricos são, em geral, negativos, embora alguns pacientes adultos possam ter elevações devidas a histologias discordantes entre o testículo e as metástases. Por outro lado, vários estudos têm documentado que componentes endodérmicos do TE podem ser AFP positivos pela imuno-histoquímica (28,29). Crianças, com idade menor que oito meses, podem ter níveis fisiologicamente elevados de AFP não relacionados com o tumor (30). O TE é mais bem tratado pela cirurgia, pois todas as formas são quimioresistentes (10).

5. Os tumores mistos de células germinativas (TTCGM) constituem entre 35% e 54% dos TTCG, excluindo-se o seminoma espermatocítico com sarcoma

(19). São raramente vistos em gônadas pré-puberais. Todas as variantes morfológicas previamente descritas podem ser encontradas com exceção do seminoma espermatocítico. As combinações mais comuns são CE/TE (26%), CE/seminoma (16%) e CE/TSE/TE (11%) (14,29). Os casos que contêm o componente seminoma tendem a ocorrer mais tardiamente do que aqueles que não o possuem. Nos laudos diagnósticos de cada caso devem ser citados todos os componentes, com suas respectivas proporções em porcentagem (31), especialmente a porcentagem do CE. Tumores com predominância do CE (mais do que 55%) são quatro vezes mais propensos a desenvolver doença metastática, usualmente para o retroperitônio. O poliembrioma é uma variante encontrada em TTCGM no qual os componentes CE e TSE estão organizados em um padrão semelhante ao do embrião (corpos embrióides) de antes do décimo oitavo dia do desenvolvimento (31).

IV. Marcadores Teciduais nos TTCG:

Os marcadores séricos tumorais mais utilizados em TTCG são: AFP, β -hCG, fosfatase alcalina placentária (PLAP) e a desidrogenase láctica (DHL). A elevação de AFP é vista em 40% a 60% dos homens com tumores não-seminoma; em geral, são TTCG mistos. A elevação de β -hCG é encontrada em aproximadamente 14% dos pacientes, com seminoma estágio I e em metade dos pacientes, com seminoma metastático, assim como no CC puro. PLAP apresenta-se elevado nos seminomas e não-seminomas, assim como o DHL (32,33).

Os principais marcadores tumorais teciduais são: PLAP e CD117 para os seminomas, PLAP, AE1/AE3, CD30 e OCT4 para os CE, AFP e Glypican 3 para os TSE. Os coriocarcinomas são positivos para β -HCG, EMA e citoceratina de baixo peso molecular. O TE expressa os marcadores conforme os componentes que constituem a neoplasia, a saber: CEA nos epitélios, PLAP em alguns componentes glandulares, Glypican 3 em elementos imaturos, p53 nos epitélios (10). Assim, marcadores teciduais têm importância na caracterização diagnóstica dos TTCG.

V. Tratamento nos TTCGNS:

Até recentemente, o tratamento de escolha para os TTCGNS era orquiectomia radical seguida de dissecação retroperitoneal de nódulos linfáticos (RPLND, *retroperitoneal lymph node dissection*). Após o advento da quimioterapia de alta eficiência, a disponibilidade de marcadores tumorais séricos sensíveis, assim como de técnicas mais precisas de estadiamento, a orquiectomia solitária seguida de acompanhamento rigoroso tornou-se opção viável para alguns pacientes. No entanto, estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes tratados desta maneira apresentarão recidiva em um ano após a orquiectomia, usualmente no retroperitônio.

Estudos demonstram que a invasão vascular (IV), observada histologicamente no tumor primário, é o melhor indicador preditivo de recidiva. Sua presença define a neoplasia como estadiopatológico pT2, mesmo se confinada ao testículo (10). O impacto do padrão histológico do tumor na chance de recidiva permanece controverso, mas muitos autores têm sugerido que a forma pura, ou quando o componente predominante é o CE, há maior risco de ocorrerem metástases (21-23). A extensão do tumor para a *rete testis*, tecidos moles do hilo e anexos não tem influência no estadiamento patológico ou na frequência de recidiva (10).

Refinamentos nas técnicas citogenéticas nos últimos 30 anos, particularmente o desenvolvimento da técnica da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), têm permitido aumento sensível na detecção de anormalidades cromossômicas em doenças malignas hematológicas, promovendo avanços significativos tanto no diagnóstico como na pesquisa do processo neoplásico (34). As técnicas de bandas cromossômicas revolucionaram a análise citogenética e têm sido centrais na compreensão das doenças constitucionais e adquiridas, em particular das anormalidades cromossômicas específicas de leucemia. Contudo, a resolução da análise de bandas pode detectar somente rearranjos que envolvam DNA maior que 3Mb (34). Assim, as técnicas de bandas são limitadas a células com atividade mitótica, com o problema adicional das dificuldades envolvidas na decifração de rearranjos cromossômicos complexos usando um padrão de banda monocromático. A introdução da técnica

do FISH, no final da década de 1980 possibilitou, com o auxílio de sondas de DNA para cromossomos específicos, a detecção de trissomias e translocações tanto em células em metáfase como em interfase. A partir de então ficou evidente a importância das técnicas citogenéticas no diagnóstico de doenças humanas (34,35). As elevadas sensibilidade e especificidade, a rapidez do ensaio, e suas numerosas aplicações, levou essa técnica a ter aceitação geral (36).

É inegável a importância do uso da imuno-histoquímica nos TTCCG. Na atualidade, nenhum centro de referência deixa de utilizá-la, pois é indispensável para o diagnóstico e consequente planejamento terapêutico. Por exemplo, o seminoma puro é tratado apenas pela orquiectomia, e o teratoma, em qualquer porcentagem que esteja presente no tumor, exige a dissecação dos linfonodos retroperitoneais (RPLND).

Nos TTCCGNS há necessidade de análises entre marcadores teciduais e prognóstico, uma vez que há poucos estudos que consideram esta possibilidade, diferente de outras neoplasias malignas onde o HER-2, EGFR são propostas bem consolidadas, a saber, os carcinomas mamários e pulmonares. Com esta concepção, de busca de marcadores prognósticos e análise de expressão proteica nos TTCCGNS, sugerimos os objetivos deste trabalho.

TUMORES TESTICULARES GERMINATIVOS NÃO-SEMINOMAS:

IMUNOEXPRESSÃO PROTEICA DE EGFR, Her2 E c-Kit

INTRODUÇÃO

As neoplasias de células germinativas são as mais quimiossensíveis de todos os tumores sólidos, sendo altamente curáveis com quimioterapia baseada em cisplatina (37). Contudo, 30% dos pacientes não obtêm remissão completa e necessitam de tratamento de resgate. Dentre estes, aproximadamente 50% morrem da doença (38).

Estudos recentes têm focado o papel dos fatores de crescimento e seus receptores na progressão dos tumores de células germinativas e de outros tipos de câncer. Moroni et al. (2001) documentaram pela primeira vez a expressão de EGFR e Her2 em TTCCG positivos para β -HCG. Eles enfatizaram a importância clínica destes fatores para a possibilidade de terapias alvo contra EGFR e Her2, o que demonstra a importância do uso da imuno-histoquímica nestas neoplasias (39).

A superexpressão de EGFR e do HER2/neu têm sido descritas em muitos tipos de tumores, associada com a resistência à terapia citotóxica e à progressão tumoral em muitos casos (41).

Embora a transição entre a homeostase tecidual e o início do desenvolvimento tumoral seja instigada mais pelas mutações oncogênicas do que pelos fatores de crescimento, estes últimos são os reguladores de todos os passos subsequentes da progressão da neoplasia, como a expansão clonal,

invasão, através das barreiras teciduais, angiogênese e colonização em locais distantes (42).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor transmembrana tirosina quinase da família Erb-B que está expresso primariamente em células de origem epitelial (43) e anormalmente ativado em muitos tumores epiteliais (44-47). O gene EGFR, um dos oncogenes do cromossomo 7, tem sido implicado na patogenia e progressão de muitas neoplasias malignas. Sua sinalização está envolvida na proliferação de células tumorais, apoptose, angiogênese, invasão e metástases (48). A superexpressão do EGFR em vários tipos de carcinoma levou ao desenvolvimento de agentes direcionados ao seu bloqueio. Terapias-alvo têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de tumores colorretais e dos carcinomas pulmonares não pequenas células. Muitos carcinomas superexpressam EGFR, com ou sem amplificação gênica, incluindo os de cabeça e pescoço, esôfago, mama, cólon, pulmão, próstata, rim, ovário, estômago e bexiga (49). A expressão aumentada de EGFR também foi relatada em TTCG (16,27). Wang et al. (2008) descreveram 21 casos de carcinoma embrionário testicular refratário à quimioterapia, dos quais 9 revelaram positividade para EGFR pela imuno-histoquímica. A pesquisa de amplificação gênica (FISH), efetuada nos 21 casos, revelou amplificação em 1 caso (5%), polissomia em 15 casos (71%) e padrão dissômico normal em 5 casos (24%) (51), o que vem demonstrar a importância do FISH nestes estudos, pois demonstra o evento gênico específico. Shuin et al. (1994) encontraram expressão elevada de EGFR em teratomas comparados a outros subtipos histológicos de TTCG (50). Hechelhammer et al. (2003) encontraram expressão aumentada de EGFR na maioria dos componentes de teratoma dos TTCG mistos (61).

O Her2 é codificado pelo gene CERB-2 (inicialmente chamado HER-2/neu) que tem expressão em 25-30% dos carcinomas de mama (52). Sua expressão está correlacionada com prognóstico pior para esses pacientes: sobrevida curta pela agressividade do tumor (53) e resistência à quimioterapia convencional (52). Expressão aumentada de HER2 tem sido demonstrada em vários outros tumores humanos, incluindo cânceres do trato gastrointestinal (54), fígado (55), pulmão (56), ovário (57), útero (58), bexiga (59) e próstata (60). No

entanto, o significado potencial da expressão do HER2 nos TCG é desconhecido. Mandóky et al. (2004) revelaram que a expressão aumentada da proteína Her2 ocorre em 25% dos componentes teratoma dos TCG. A superexpressão estava restrita aos padrões histológicos mais diferenciados dentro do tumor, como os componentes de teratoma e coriocarcinoma. Em uma série maior de teratomas puros e de tumores mistos de células germinativas testiculares contendo componentes de teratoma a expressão de Her2 foi determinada por IHC e FISH, de modo que a superexpressão da proteína pudesse ser comparada com a amplificação gênica nos tumores primários. Em nenhum dos casos foi encontrada amplificação gênica definida, mas os autores sugeriram que a superexpressão de Her2 está associada a evolução clínica desfavorável e que seria um fator prognóstico nos TCG. Foi observada associação estatisticamente significativa entre o “status” do Her2 e o estágio clínico da doença. Mais estudos seriam necessários para se avaliar o exato papel da expressão do HER-2/neu nos regimes de tratamento destas neoplasias (62). Ghavamnasiri et al. (2010) observaram cerca de 33% de positividade do Her2 em TCG não-seminoma, especialmente do subtipo teratocarcinoma, comparados com os TCG mistos ou com o carcinoma embrionário (63).

O proto-oncogene KIT também codifica um receptor transmembrana com atividade tirosina quinase. Após a junção do ligante SCF (fator derivado de células primordiais), o KIT se dimeriza, é fosforilado e inicia uma cascata de sinalização que induz o crescimento celular (64). As vias de sinalização do KIT regulam a sobrevivência, proliferação e migração de células germinativas primordiais e, assim, está fortemente envolvida nos TCG. Mutações do KIT são as mais frequentes em TCG. Superexpressão, amplificação e mutações ativadoras são mais frequentes em seminomas (até 20%) do que em não-seminomas (até 2%), estando também presentes nas neoplasia de células germinativas intratubulares não classificável (65). Madani et al (2003) descrevem positividade para KIT em 11 de 21 casos de TCG refratários à quimioterapia. Mutações gênicas que provocam ativação do KIT foram encontradas na mastocitose humana (66) e nos tumores estromais gastrointestinais (67,68); amplificação de KIT também está descrita em disgerminoma do ovário (69), tumores do estroma gastrointestinal (70) e melanomas acrais e de mucosa (71).

Avanços recentes, usando terapias dirigidas a alvos moleculares em tumores malignos humanos, especialmente com quimioterápicos visando KIT (72,73), EGFR (73) e HER2 (37) levantam a possibilidade de que estes alvos terapêuticos possam ser utilizados em tumores de células germinativas, especialmente nas formas refratárias à cirurgia e/ou quimioterapia (29,54). Daí a importância de se caracterizar o imunofenótipo desses tumores, inicialmente por imunohistoquímica e, em seguida, pelo FISH.

OBJETIVOS

1. Avaliar imunexpressão proteica do EGFR (Her-1), Her2 e c-Kit em tumores testiculares primários de células germinativas não-seminomas pela técnica imuno-histoquímica;
2. Analisar, nos casos positivos, a existência de amplificação gênica, utilizando a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH);
3. Verificar a relação da expressão desses marcadores com a evolução dos pacientes, após terapêutica convencional, a fim de estimar o valor prognóstico destes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Série e Critérios de Inclusão

O desenho do presente estudo foi o de uma coorte histórica. A série foi constituída de amostras histológicas incluídas em blocos de parafina existentes no arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia (LAPC) do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP, totalizando 103 indivíduos que receberam o diagnóstico de tumor testicular de células germinativas não-seminomas (TTCGNS) no período 1996-2011 (15 anos). Foram incluídos todos os casos que possuíam blocos de parafina da biópsia ou peça cirúrgica contendo tumores não previamente tratados, com viabilidade histológica. Além disto, deveriam possuir prontuários, com acompanhamento clínico até o momento de realização do estudo (2012). Assim, foram incluídos todos os casos que:

a) possuíam blocos de parafina no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Amaral Carvalho; b) com tumores histologicamente representativos; c) dados clínicos e evolução registrados nos prontuários médicos (detalhes de casos individuais, Tabelas 1 e 2 do Apêndice).

Os casos foram agrupados segundo padrão histológico dos tumores primários não-seminomas, estadiamento e protocolos de tratamento (Tabela 1 em Resultados). Os tumores foram também reanalisados quanto ao tipo histológico, tamanho, ocorrência de invasão angiolinfática, de *rete testis* ou epidídimo, cordão espermático, margem cirúrgica e caracterização do estadiamento patológico (pTNM). Também, foi analisado o tempo decorrido entre o diagnóstico histológico e o óbito do paciente por qualquer causa.

2. Tissue microarray (TMA)

Confecção da plataforma de *Tissue Microarrays*, foi realizada no serviço de patologia do Hospital A.C. Camargo. Os blocos de parafina contendo os tecidos neoplásicos fixados em formaldeído foram selecionados para a confecção do TMA utilizando o *tissue microarrayer* (Beencher Instruments, Silver Spring, USA). As áreas de interesse, previamente marcadas nas lâminas e identificadas nos blocos doadores foram retiradas e transferidas para os blocos receptores. O bloco receptor, com todos os tecidos, foi subsequentemente cortado em seções que foram transferidas para lâminas de vidro silanizadas para processar a imuno-histoquímica. Os cortes foram representados em duplicata, com 1.0 mm de diâmetro e espaçados a cada 0.2 mm. Um mapa mostrando a identificação detalhada de cada corte foi usado como referência.

3. Protocolos de imuno-histoquímica para EGFR, Her2 e c-Kit

Cortes histológicos de 4 micra de espessura do material incluído em parafina foram montados em lâminas previamente silanizadas, desparafinados e reidratados. A recuperação antigênica foi feita em câmara pressurizada Pascal (Dako, Glostrup, Denmark) em tampão citrato pH 6,0 a 125°C por 15 minutos, seguido de resfriamento por 20 minutos até 90°C. Após lavagem e neutralização da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% e imersão em tampão fosfato (PBS) as lâminas foram incubadas com cada anticorpo primário por 30

minutos nas seguintes diluições: EGFR (Invitrogen), 1:100; Her2 (SPRING), 1:200; c-Kit (DAKO), 1:300. A seguir, foi realizada a incubação com polímero EnVision®, Dako e com a DAB (Diaminobenzidine, Dako). Os controles positivos para EGFR e Her2 foram cortes histológicos de carcinoma de mama; para o c-Kit, cortes histológicos de seminoma. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi uma secção de testículo não neoplásico.

4. Avaliação das expressões imuno-histoquímica

As lâminas submetidas à reação de imuno-histoquímica foram analisadas em microscópio óptico binocular, quando foi percorrida toda a extensão do tecido e registradas a ocorrência ou não de marcação. A intensidade da imunomarcação para EGFR, Her2 e c-Kit foi classificada em 4 categorias: Negativa (0+), Fraca (1+), Moderada (2+), Forte (3+). Imunorreatividade foi definida no tumor como expressão de EGFR, Her2 e c-Kit de 1+ a 3+.

5. FISH para pesquisa de amplificação gênica EGFR, HER2, KIT

A técnica de FISH foi realizada no serviço de Patologia do Hospital A.C. Camargo de acordo com Sato-Kuwabara et al. (2009). Os cortes foram incubados a 56°C *overnight* e desparafinados por lavagem em xileno, etanol e água destilada. Após a incubação com HCl 0.2M em temperatura ambiente por 20 minutos, eles foram aquecidos a 80°C em tampão citrato (2xSSC, pH 6.0) por 1 a 1 hora e meia. Posteriormente, foram digeridos com pepsina por 8 a 14 minutos e incubados em 2xSSC por 2 minutos, ambos procedimentos em temperatura ambiente. Os cortes foram desidratados em etanol 75, 80 e 100% por 2 minutos. As sondas para os genes EGFR (EGFR PROBE Vysis, Abbott Molecular) e KIT (KIT Probe, Vysis, Abbott Molecular) e HER2 (HER2 PROBE Vysis, Abbott Molecular) foram adicionadas sobre os cortes, os quais foram cobertos com lamínula e vedados com *rubber cement*. As lâminas foram incubadas a 82°C por 5 minutos para que ocorra a desnaturação e hibridadas a 45°C por cerca de 18 horas. Após este período foram lavadas em ureia 0.1x SSX a 45°C por 30 minutos e em 2x SSC em temperatura ambiente por 2 minutos. As lâminas foram recobertas com diamidino-2-fenilindole (DAPI) e, finalmente, o corte foi coberto com lamínula, após desidratação em etanol. A análise foi

realizada em microscópio de fluorescência buscando pontos de amplificação/ganho em cada *core* da plataforma de *TMA*.

O número mínimo de células neoplásicas consideradas para a leitura foi de quarenta células/ *core* e a positividade considerada quando ao menos 5,0% de alteração foram observada.

6. Análise Estatística

Primeiramente foi realizada uma análise descritiva por meio de tabelas de frequência no caso de variáveis qualitativas e cálculo de medidas de tendência central e de dispersão para as quantitativas. Essa análise foi desenvolvida pela Profa. Dra. Cristiane Murta Ramalho Nascimento, do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Algumas categorias das variáveis qualitativas foram às vezes agregadas, a fim de se evitar a presença de frequências muito baixas. Para a análise da sobrevivência, utilizou-se, inicialmente, o estimador produto limite de Kaplan-Meier (KAPLAN & MEIER, 1958). Também foram elaborados os respectivos gráficos. Para comparar a sobrevivência entre dois ou mais grupos foi utilizado o teste *log rank* (MANTEL, 1966).

A variável tempo de sobrevivência foi determinada como a diferença em meses, entre a data do óbito e a data do diagnóstico histológico do câncer de testículo, considerando a morte por qualquer causa como falha. Para aqueles pacientes que foram perdidos foi considerado tempo de sobrevivência a diferença entre a última data em que comprovadamente estavam vivos e a data do diagnóstico. Os pacientes vivos depois de 31/12/2012 também foram considerados censurados. O *software* utilizado para a análise de sobrevivência foi o STATA (versão 10.0).

RESULTADOS

A TABELA 1 mostra a distribuição dos casos estudados segundo as características selecionadas. Dentre os 103 casos revistos, predominaram os tumores mistos de células germinativas (57,3%), seguidos por carcinomas embrionários (23,3%), teratomas (13,5%) e tumores do seio endodérmico (5,8%). Treze casos (12,6%) apresentaram invasão vascular (IV).

A FIGURA 1 mostra o padrão característico de cada marcador imuno-histoquímico. A TABELA 2 apresenta a distribuição dos casos segundo esses marcadores.

TABELA 1 - Distribuição dos pacientes com tumores testiculares de células germinativas não-seminoma segundo as características selecionadas.

Características	n	%
Tipos histológicos		
Carcinoma embrionário	24	23,3
Teratoma	14	13,5
Tumor misto	59	57,3
Tumor seio endodérmico	6	5,8
Invasão vascular		
Não	90	87,4
Sim	13	12,6
Invasão <i>rete testis</i>		
Não	99	96,1
Sim	4	3,9
Invasão epidídimo		
Não	95	92,2
Sim	8	7,8
Invasão do cordão		
Não	99	96,1
Sim	4	3,9
Invasão de margem cirúrgica		
Não	101	99,0
Sim	1	1,0
Estádio patológico - Tumor		
T1	84	81,6
T2	14	13,6
T3	3	2,9
T4	2	1,9
Estádio patológico - Nódulo		
N0	41	39,8
N1	21	20,4
N2	14	13,6
Nx	27	26,2
Estádio patológico - Metástases		
M0	97	94,2
M1	6	5,8

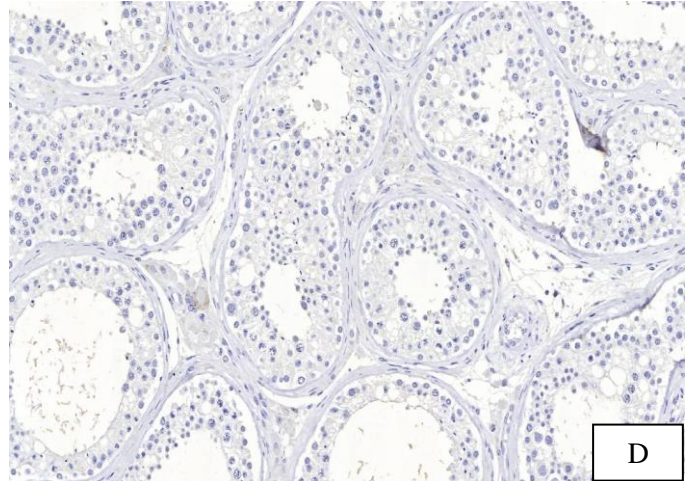
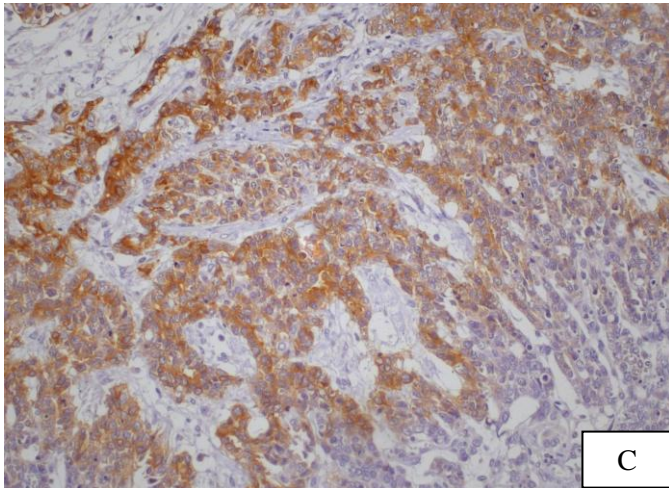
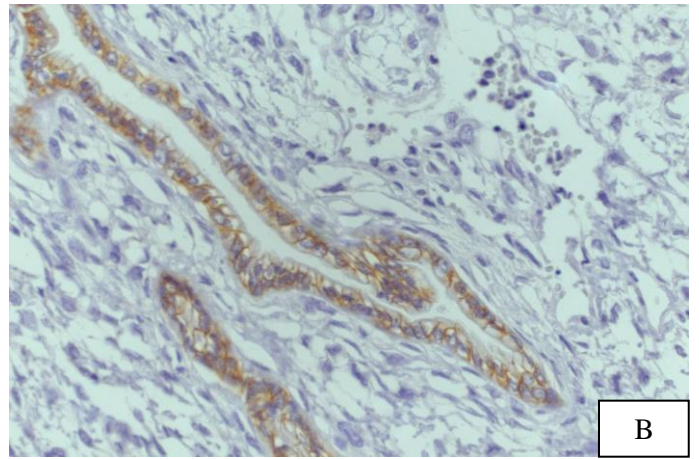
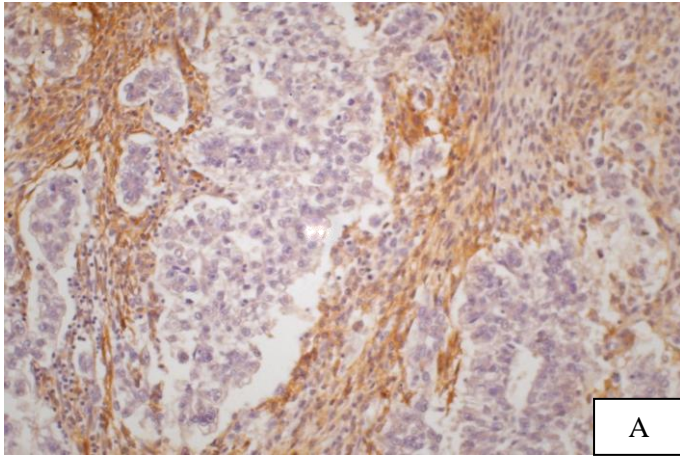


Fig.1. A) Tumor testicular de células germinativas misto (não seminoma): EGFR positivo, com predomínio no mesênquima; B) Tumor testicular de células germinativas (não seminoma), componente epitelial em teratoma: Her2 positivo; C) Tumor testicular de células germinativas misto (não seminoma), componente epitelial: Kit positivo. 200X, IMH. D) Testículo não tumoral (controle): Negativo para EGFR, Her2 e c-Kit. 100X, IMH.

TABELA 2 - Distribuição quantitativa dos casos com tumores testiculares de células germinativas (TTCG) não-seminoma segundo a intensidade de marcação imuno-histoquímica.

Marcadores	n	%
EGFR		
Negativo	62	60,2
Positivo 1+	24	23,3
Positivo 2+	17	16,5
Her2		
Negativo	91	88,3
Positivo 1+	11	10,7
Positivo 2+	1	1,0
c-Kit		
Negativo	67	65,0
Positivo 1+	22	21,4
Positivo 2+	14	13,6

As TABELAS 3, 4 e 5 mostram as associações entre a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos e as variáveis estudadas. O EGFR não mostrou associação significativa com qualquer das variáveis estudadas, porém, ficou próximo da significância ($p = 0,053$) em relação aos tipos histológicos dos tumores.

TABELA 3. Associação entre positividade para EGFR e as características dos casos de tumores testiculares de células germinativas (TTCGNS).

	Total	EGFR - positivo		Valor de p*
		n	%	
Tipos histológico				0,053
Ca embrionário	24	5	20,8	
Teratoma	14	8	57,1	
Misto	59	27	45,8	
Tu seio endodérmico	6	1	16,7	
Invasão angiogênica				0,557
Não	90	37	41,1	
Sim	13	4	30,8	
<i>Rete testis</i>				0,149
Não	99	41	41,1	
Sim	4	0	0	
Invasão epidídimo				0,472
Não	95	39	41,1	
Sim	8	2	25,0	
Invasão cordão				0,149
Não	99	41	41,4	
Sim	4	0	0	
Invasão margem cirúrgica				1,000
Não	101	41	40,6	
Sim	1	0	0	
Estádio patológico – Tumor				0,843
T1	84	34	40,5	
T2	14	6	42,9	
T3-T4	5	1	20,0	
Estádio patológico – Nódulos				0,258
N0	41	19	46,3	
N1-2	35	10	28,6	
Nx	27	12	44,4	
Estádio patológico – Metástases				0,680
M0	97	38	39,2	
M1	6	3	50,0	

*Teste exato de Fisher.

A marcação pelo Her2 esteve significativamente associada ($p= 0,046$) aos tipos histológicos dos tumores, mas com nenhuma outra das variáveis selecionadas (TABELA 4).

TABELA 4. Associação entre positividade para Her2 e as características dos casos de tumores testiculares de células germinativas não seminomas (TTCGNS).

	Total	Her2 - positivo		Valor de p*
		n	%	
Tipos histológico				0,046
Ca embrionário	24	0	0	
Teratoma	14	4	28,6	
Misto	59	8	13,6	
Tu seio endodérmico	6	0	0	
Invasão angiogênica				0,646
Não	90	10	11,1	
Sim	13	2	15,4	
<i>Rete testis</i>				1,000
Não	99	12	12,1	
Sim	4	0	0	
Invasão epidídimo				0,591
Não	95	12	12,6	
Sim	8	0	0	
Invasão cordão				1,000
Não	99	12	12,1	
Sim	4	0	0	
Invasão margem cirúrgica?				1,000
Não	101	12	11,9	
Sim	1	0	0	
Estádio patológico - Tumor				0,830
T1	84	10	11,9	
T2	14	2	14,3	
T3-T4	5	0	0	
Estádio patológico - Nódulos				0,801
N0	41	6	14,6	
N1-2	3	3	8,6	
Nx	3	3	11,1	
Estádio patológico - Metástases				0,534
M0	97	11	11,3	
M1	6	1	16,7	

*Teste exato de Fisher

Com relação ao c-Kit, sua marcação esteve significativamente associada ($p=0,019$) aos tipos histológicos dos tumores, e a nenhuma outra das variáveis estudadas (TABELA 5).

TABELA 5. Associação entre positividade para c-Kit e as características dos casos de tumores testiculares de células germinativas não seminomas (TTCGNS).

	Total	c-Kit - positivo		Valor de p*
		n	%	
Tipos histológico				0,019
Ca embrionário	24	4	16,7	
Teratoma	14	5	35,7	
Misto	59	22	37,3	
Tu seio endodérmico	6	5	83,3	
Invasão angiogênica				0,370
Não	90	30	33,3	
Sim	13	6	46,2	
<i>Rete testis</i>				0,122
Não	99	33	33,3	
Sim	4	3	75,0	
Invasão do epidídimo				0,710
Não	95	34	35,8	
Sim	8	2	25,0	
Invasão do cordão				0,610
Não	99	34	34,3	
Sim	4	2	50,0	
Invasão margem cirúrgica				0,343
Não	101	34	33,7	
Sim	1	1	100	
Estádio patológico – Tumor				0,343
T1	84	27	32,1	
T2	14	6	42,9	
T3-T4	5	3	60,0	
Estádio patológico – Nódulos				0,320
N0	41	11	26,8	
N1-2	35	13	37,1	
Nx	27	12	44,4	
Estádio patológico – Metástases				0,419
M0	97	33	34,0	
M1	6	3	50,0	

*Teste exato de Fisher

Com relação à sobrevida, dentre os 103 indivíduos do sexo masculino com câncer de testículo que foram estudados, 18 casos (17,5%) morreram durante o período de seguimento. A causa do óbito não foi determinada para qualquer deles. O tempo mediano de seguimento foi de 44,7 meses (mínimo=0,03 meses e máximo=186,22 meses). Não foram detectadas associações significativas entre qualquer marcador e a mortalidade desses pacientes.

TABELA 6. Associação entre mortalidade e expressão dos marcadores EGFR, Her2 e c-Kit em casos de tumores testiculares de células germinativas não-seminoma (TTCGNS).

Marcadores	Total	Óbitos		Valor de p*
		n	%	
EGFR				0,1414
Negativo	62	9	11,9	
Positivo	41	9	6,1	
Her2				0,4917
Negativo	91	17	16,1	
Positivo	12	1	1,9	
c-Kit				0,4744
Negativo	67	11	12,4	
Positivo	36	7	5,6	

*Teste log-rank

Com relação à probabilidade de sobrevivência acumulada, foi possível analisar os dados dos casos que expressaram EGFR e c-Kit. Não foi possível fazer a análise gráfica Kaplan-Meier com os casos Her2 porque houve somente um óbito de caso positivo. A FIGURA 2 mostra a probabilidade de sobrevivência acumulada quando foram considerados todos os pacientes deste estudo. Essa análise indica que cerca de 30% dos pacientes evoluíram para êxito letal antes do oitavo ano de acompanhamento. Embora a análise sugira que houve um acréscimo de mortalidade nos casos EGFR positivos, não foi possível detectar diferenças significativas em relação aos casos negativos (FIGURA 3). Observação similar pode ser feita com relação a expressão do c-Kit (FIGURA 4).

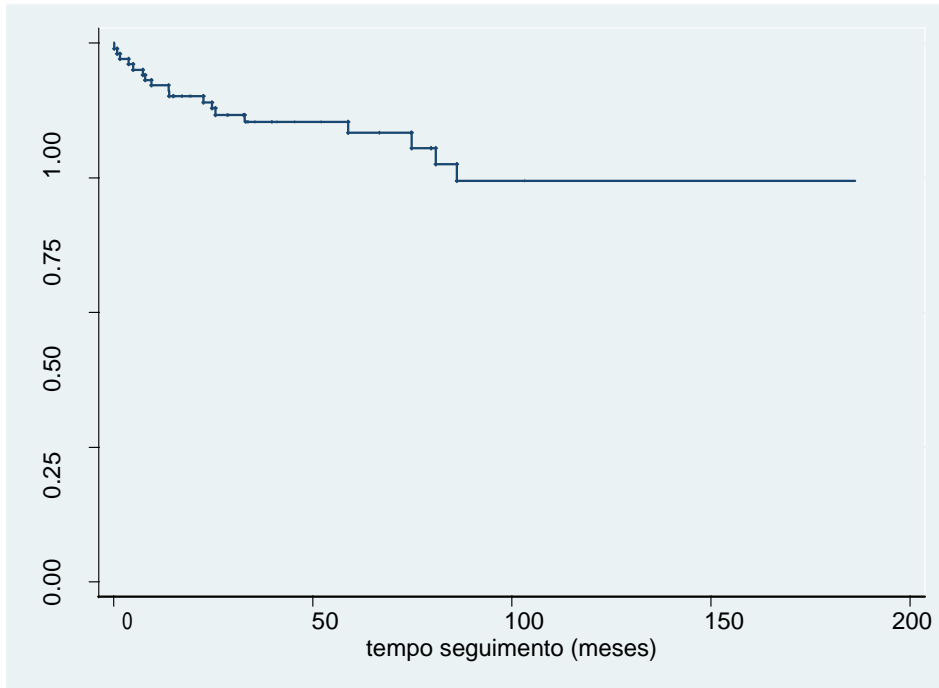


FIGURA 2. Probabilidade de sobrevivência acumulada para os indivíduos com TTCGNS.

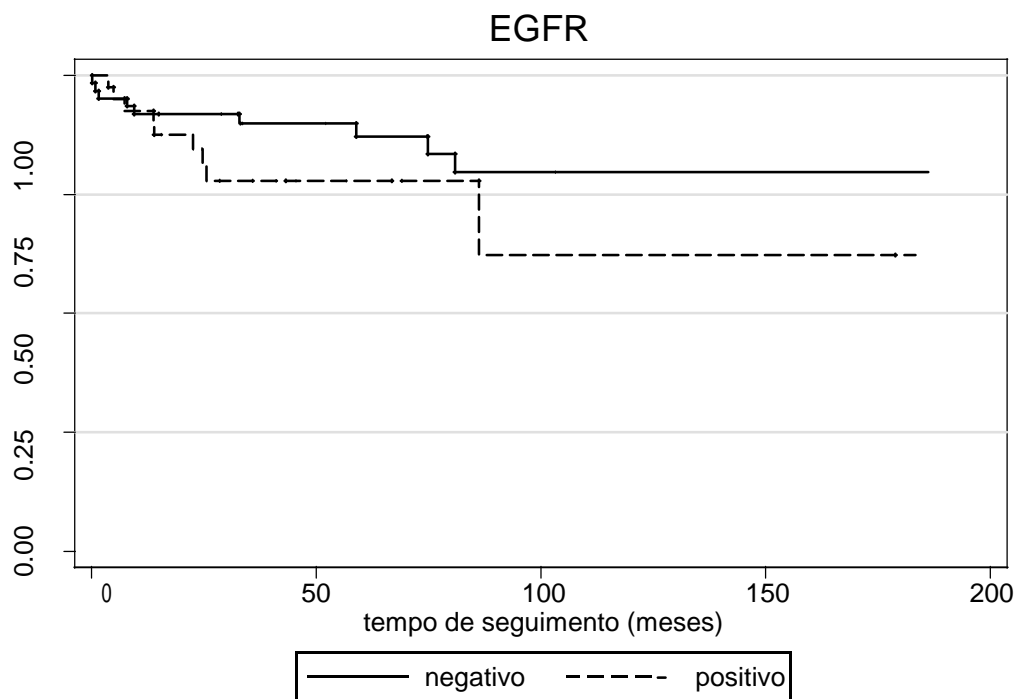


FIGURA 3. Probabilidade de sobrevivência acumulada para indivíduos com TTCGNS segundo positividade para EGFR.

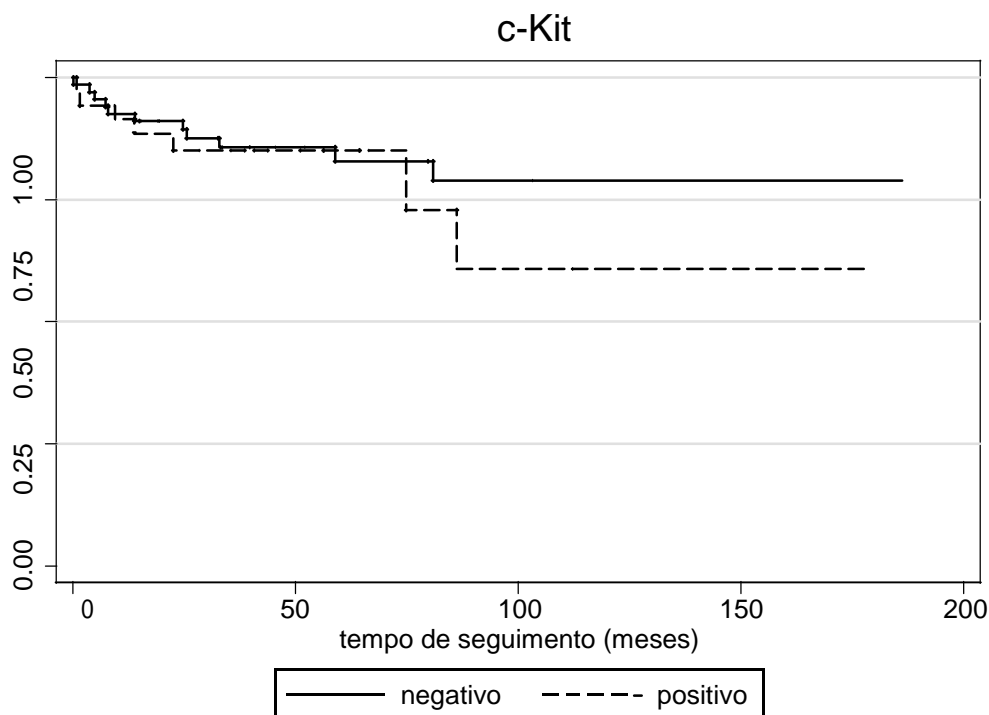


FIGURA 4- Probabilidade de sobrevivência acumulada para indivíduos com TTCGNS segundo positividade para c-Kit.

Resultados do *FISH* (hibridação por fluorescência in situ) para pesquisa de amplificação gênica EGFR, HER2, KIT:

O FISH foi realizado nos 89 casos positivos para os marcadores IMH, que compuseram três plataformas de TMA. Observou-se que, na pesquisa da amplificação gênica, 53% das cores descolaram durante a reação e 46 % foram negativos. Observou-se somente um caso, com diagnóstico de TTCGM (caso 99-TABELA-ANEXO-1) com a amplificação para o gene EGFR (FIGURA 5). Este caso se apresentou como PT1NXM0, medindo 4,5 x 3,6 cm, com sobrevida maior que cinco anos. Os marcadores EGFR e Her2 foram positivos ++.

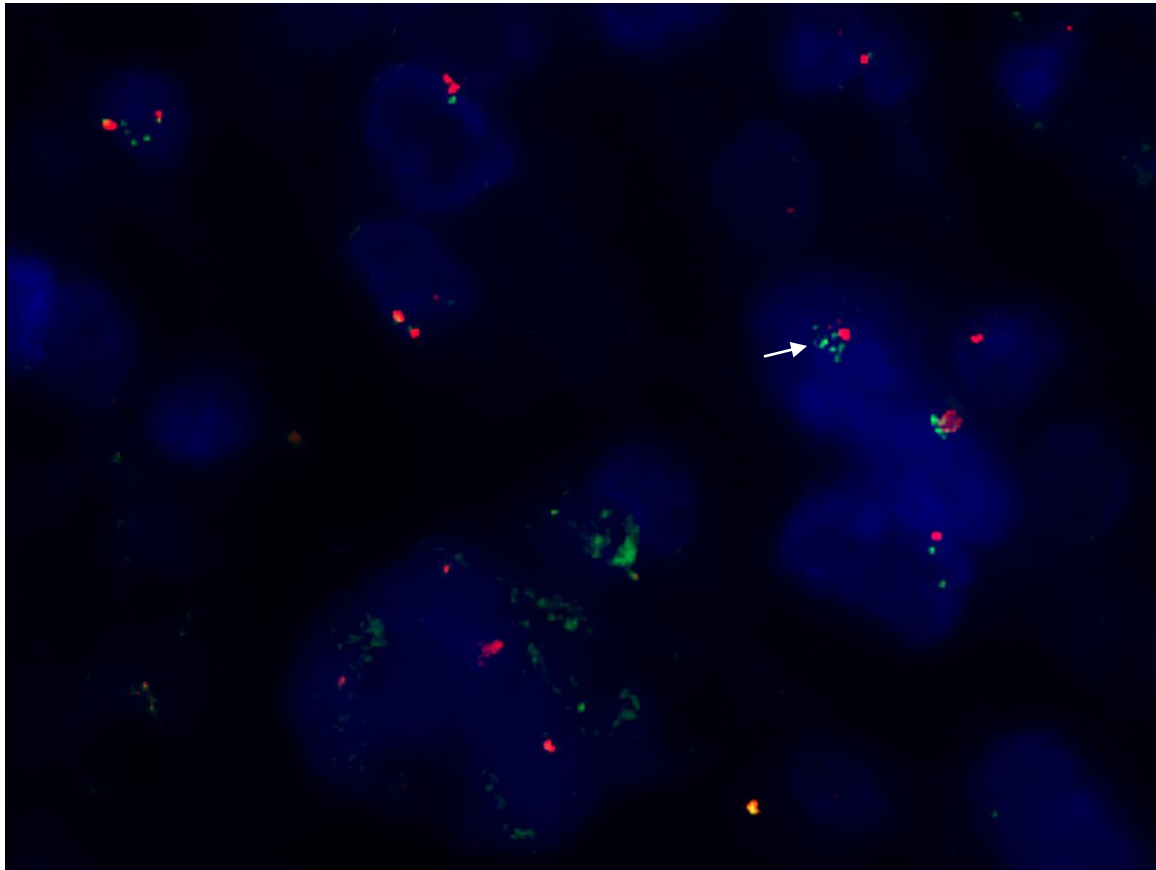


FIGURA 5. Caso 99. TCGM Amplificação do gene EGFR (verde). FISH.

DISCUSSÃO

Poucos autores estudaram as expressões dos imunomarcadores EGFR, Her2 e c-Kit em uma mesma série de casos de TCG não-seminomas. Nosso trabalho inova ao estudar o perfil imuno-histoquímico de 103 casos de TCG não-seminomas, com uma série comparável ao de Durán et al. (2010). Este estudou 109 amostras histológicas de 84 pacientes de TCG, com formas mistas. Trinta deles exibiram algum grau de marcação para o EGFR. O coriocarcinoma foi o tipo histológico mais frequentemente corado por este marcador (86%). Her2 foi demonstrado somente em 14 amostras, todos TCG não-seminomas. Cerca de 30% dos pacientes exprimiram simultaneamente EGFR e Her2. O c-Kit foi expresso em 97% dos seminomas e virtualmente ausente em alguns subtipos não-seminomas (TCGM) como coriocarcinoma e teratocarcinoma. Outros tipos histológicos não-seminoma exibiram graus variados de marcação para o c-Kit (CE 26%; TSE 63%) (40). Interessante observar que nos casos estudados por nós houve um predomínio histológico do

TTCGM (57,3%), com o predomínio de marcação pelo EGFR (45 %) e c-Kit (40%), pelo estudo IMH. O EGFR foi expresso quando o componente coriocarcinoma era predominante e o c-Kit no componente epitelial do teratoma.

Miyai et al. (2009) encontraram superexpressão da proteína e amplificação gênica do EGFR em TTCG de adultos. Foram obtidos 209 componentes histológicos distintos de um grupo de 110 TTCG. A superexpressão do EGRF foi detectada em 28% dos seminomas (27% na forma pura e 29% na forma mista), em 11% dos CE, 88% dos coriocarcinomas, em 44% dos TSE e em nenhum caso de neoplasia intratubular de células germinativas não classificada (NITCGI) e teratoma. Um alto número de cópias do gene EGFR foi detectada em 20% e 10% dos casos de seminoma, 13% e 0% dos CE, 71% e 60% dos coriocarcinomas, 15% e 8% dos TSE e em nenhum dos casos de IGCNU e TE respectivamente. Ambos o alto número de cópias e a amplificação do gene EGFR foram positivamente correlacionados com a positividade para imuno-histoquímica da proteína EGFR. Estes resultados sugerem que a positividade da proteína EGFR e a amplificação do gene EGFR ocorrem com relativa frequência nos TTCG e podem ter um papel importante na formação de um câncer invasivo e na progressão e especialmente evolução morfológica dos tumores (74). Na nossa série, somente um caso de TTCGMNS, EGFR positivo e Her2 positivo na IMH, apresentou amplificação gênica para o gene EGFR. Este caso apresentou bom prognóstico, com sobrevida maior que cinco anos. A ausência de amplificação gênica, na série estudada, pode ser explicada pela qualidade inadequada do material estocado, limitando estudos gênicos. Esta observação é embasada pelo grande número de cores que se descolaram da plataforma.

Ghavamnasiri et al. (2010) demonstraram que o Her2 é um receptor do fator de crescimento epidérmico que tem correlação com um pior prognóstico em muitos cânceres. Em 54 casos de TTCG a superexpressão de HER2 foi vista em 33,3% dos pacientes, especialmente naqueles com o subtipo teratocarcinoma comparados com os TTCGM ou CE. Contudo, esta superexpressão não mostra correlação com o estágio do tumor, resposta terapêutica, sobrevida livre de doença, idade, β HCG ou AFP (63). Nos casos estudados pelo nosso grupo a positividade do Her2 esteve associada à subtipos histológicos, principalmente ao teratoma ($p=0,0046$).

Soule et al. (2002) observaram expressão de Her2 em 22 de 96 casos de TTCCG. Apenas 3 casos apresentaram amplificação gênica pelo FISH. Concluíram que a falta de concordância entre imuno-histoquímica e FISH torna improvável que a expressão do Her2 pela imuno-histoquímica tenha relevância prognóstica ou terapêutica (37).

Madani et al. (2003) analisaram retrospectivamente 23 pacientes com TTCCG não-seminomas refratários à quimioterapia e ou cirurgia. c-Kit estava positivo em 11 de 23 pacientes. Não houve mutações ativas do KIT no éxon 17 em 21 pacientes analisados. EGFR foi expresso (2+ a 3+) em 15 dos 23 pacientes. Concluíram que KIT e EGFR são positivos em uma proporção significativa de TTCCG refratários. O significado destes achados será determinado por ensaios clínicos em andamento (73). Em nossa série a marcação pelo Kit esteve associada ao sub tipo do TTCCGNS, com $p=0,019$. Este foi observado mais frequentemente nos TTCCGM.

Cheng et al. (2011) descreveram a mutação gênica e a amplificação do KIT no disgerminoma do ovário em 22 pacientes. A amplificação gênica foi detectada em 6 casos (27%). A expressão do KIT foi detectada em 87% dos disgerminomas. A mutação do KIT foi associada com estadiamento patológico avançado e a amplificação associada com expressão elevada da proteína c-Kit. Uma das conclusões é que o KIT é um potencial alvo terapêutico para os disgerminomas que tenham a mutação (69).

A análise da associação entre os imunomarcadores e a mortalidade/sobrevivência não permitiu relacionar qualquer um deles com o desfecho vital dos pacientes. No entanto, foi possível registrar tendência à associação significativa de cada um dos marcadores com os tipos histológicos dos tumores. A inexistência de associação positiva significativa pode ser resultado do número relativamente pequeno de casos positivos dentro de cada grupo de tumores.

CONCLUSÕES

Neste estudo, conclui-se que:

- 1) O estudo IMH demonstrou que a positividade para EGFR, Her2 e c-Kit não se associa a sobrevida dos pacientes, com TTCCG não-seminomas;
- 2) A positividade dos marcadores estudados, em nossa série, tem significância ou tendência, conforme os subtipos histológicos;
- 3) A negatividade do FISH, pode estar relacionada às condições dos materiais fixado e incluídos em parafina, limitando a metodologia.
- 4) A expressão das proteínas estudadas pode não estar relacionada com os eventos genéticos pesquisados pela técnica de FISH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krain LS. Testicular cancer in California from 1942 to 1969: the California Tumor Registry experience. *Oncology*. 1973;27(1):45–51.
2. Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. 2009 May 31;41(7):807–10.
3. Eble JN, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer, editors. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs: [... editorial and consensus conference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002]*. Reprint. Lyon: IARC Press; 2006. 359 p.
4. Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol*. 2004 Jun;5(6):363–71.
5. Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM. Testicular microlithiasis: a review and its association with testicular cancer. *Urol Oncol*. 2004 Aug;22(4):285–9.
6. Forman D, Oliver RT, Brett AR, Marsh SG, Moses JH, Bodmer JG, et al. Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer*. 1992 Feb;65(2):255–62.
7. Nichols CR, Heerema NA, Palmer C, Loehrer PJ Sr, Williams SD, Einhorn LH. Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1987 Aug;5(8):1290–4.
8. Bernardi D, Salvioni R, Vaccher E, Repetto L, Piersantelli N, Marini B, et al. Testicular germ cell tumors and human immunodeficiency virus infection: a report of 26 cases. Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1995 Nov;13(11):2705–11.
9. Schottenfeld D, Warshauer ME, Sherlock S, Zauber AG, Leder M, Payne R. The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am J Epidemiol*. 1980 Aug;112(2):232–46.
9. Amin MB, Eble JN, editors. *Urological pathology*. First edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 934 p.
10. Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Møller C, Skakkebaek NE. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol*. 1989 Oct;142(4):998–1001: discussion 1001–1002.
11. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*. 1997 Jul 24;337(4):242–53.
12. McIntyre A. Amplification and Overexpression of the KIT Gene Is Associated with Progression in the Seminoma Subtype of Testicular Germ Cell Tumors of Adolescents and Adults. *Cancer Res*. 2005 Sep 15;65(18):8085–9.

13. Krag Jacobsen G, Barlebo H, Olsen J, Schultz HP, Starklint H, Søgaard H, et al. Testicular germ cell tumours in Denmark 1976-1980. Pathology of 1058 consecutive cases. *Acta Radiol Oncol.* 1984;23(4):239–47.
14. Ulbright TM, Roth LM. Recent developments in the pathology of germ cell tumors. *Semin Diagn Pathol.* 1987 Nov;4(4):304–19.
15. Ulbright TM. Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol.* 1993 Nov;17(11):1075–91.
16. Müller J, Skakkebaek NE, Parkinson MC. The spermatocytic seminoma: views on pathogenesis. *Int J Androl.* 1987 Feb;10(1):147–56.
17. Hawkins EP, Finegold MJ, Hawkins HK, Krischer JP, Starling KA, Weinberg A. Nongerminomatous malignant germ cell tumors in children. A review of 89 cases from the Pediatric Oncology Group, 1971-1984. *Cancer.* 1986 Dec 15;58(12):2579–84.
18. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord, and scrotum. Washington, DC: Armed Forces Inst. of Pathology; 1999. 385 p.
19. Talerma A. Endodermal sinus (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults: comparison of prospective and retrospective studies. *Cancer.* 1980 Sep 1;46(5):1213–7.
20. Sogani PC, Perrotti M, Herr HW, Fair WR, Thaler HT, Bosl G. Clinical stage I testis cancer: long-term outcome of patients on surveillance. *J Urol.* 1998 Mar;159(3):855–8.
21. Sesterhenn IA, Weiss RB, Mostofi FK, Stablein DM, Rowland RG, Falkson G, et al. Prognosis and other clinical correlates of pathologic review in stage I and II testicular carcinoma: a report from the Testicular Cancer Intergroup Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1992 Jan;10(1):69–78.
23. Albers P, Siener R, Kliesch S, Weissbach L, Krege S, Sparwasser C, et al. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Apr 15;21(8):1505–12.
24. Talerma A, Haije WG, Baggerman L. Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites: correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP. *Cancer.* 1980 Jul 15;46(2):380–5.
25. Ulbright TM, Young RH. Tumors of the testis and adjacent structures. Silver Spring, Md: ARP Press; 2013. 473 p.
26. Chhieng DC, Jennings TA, Slominski A, Mihm MC. Choriocarcinoma presenting as a cutaneous metastasis. *J Cutan Pathol.* 1995 Aug;22(4):374–7.

27. Riopel MA, Spellerberg A, Griffin CA, Perlman EJ. Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998 Jul 15;58(14):3105–10.
28. Jacobsen GK, Jacobsen M. Alpha-fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin (HCG) in testicular germ cell tumours. A prospective immunohistochemical study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A].* 1983 May;91(3):165–76.
29. Mostofi FK. Pathology of germ cell tumors of testis: a progress report. *Cancer.* 1980 Apr 15;45(7 Suppl):1735–54.
30. Grady RW, Ross JH, Kay R. Epidemiological features of testicular teratoma in a prepubertal population. *J Urol.* 1997 Sep;158(3 Pt 2):1191–2.
31. Evans RW. Developmental stages of embryo-like bodies in teratoma testis. *J Clin Pathol.* 1957 Feb;10(1):31–9.
32. Barlow LJ, Badalato GM, McKiernan JM. Serum tumor markers in the evaluation of male germ cell tumors. *Nat Rev Urol.* 2010 Nov;7(11):610–7.
33. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1997 Feb;15(2):594–603.
34. Kearney L. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001 Sep;14(3):645–69.
35. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Seagraves R, Lucas J, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9138–42.
36. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol.* 2000 Oct;37(4):320–33.
37. Soule S, Baldrige L, Kirkpatrick K, Cheng L, Gilbert JL, Smith LR, et al. HER-2/neu expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol.* 2002;55(9):656–8.
38. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707–12.
39. Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, et al. Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2770–5.
40. Durán I, García-Velasco A, Ballestín C, García E, Martínez-Tello F, Pond GR, et al. Expression of EGFR, HER-2/neu and KIT in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2010 Jun;12(6):443–9.

41. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol.* 2002 Oct;29(5 Suppl 14):3–9.
42. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiol Bethesda Md.* 2010 Apr;25(2):85–101.
43. Real FX, Rettig WJ, Chesa PG, Melamed MR, Old LJ, Mendelsohn J. Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res.* 1986 Sep;46(9):4726–31.
44. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Jul 15;21(14):2787–99.
45. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127–37.
46. Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3384–8.
47. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3159–67.
48. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010. 941 p.
49. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Jul;19(3):183–232.
50. Shuin T, Misaki H, Kubota Y, Yao M, Hosaka M. Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis. *Cancer.* 1994 Mar 15;73(6):1721–7.
51. Wang X, Zhang S, MacLennan GT, Biermann K, Foster RS, Beck SD, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in the chemorefractory metastatic embryonal carcinoma. *Mod Pathol.* 2008;22(1):7–12.
52. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177–82.
53. Ménard S, Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Campiglio M, Bufalino R, et al. HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2002 Feb;8(2):520–5.
54. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest.* 2001;19(5):554–68.

55. Ukita Y, Kato M, Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Hepatol.* 2002 Jun;36(6):780–5.
56. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, et al. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2003 Jan 1;103(1):61–6.
57. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Jan 15;21(2):283–90.
58. Santin AD, Bellone S, Gokden M, Palmieri M, Dunn D, Agha J, et al. Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2002 May;8(5):1271–9.
59. Latif Z, Watters AD, Dunn I, Grigor KM, Underwood MA, Bartlett JMS. HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer.* 2003 Oct 6;89(7):1305–9.
60. Fosså A, Lilleby W, Fosså SD, Gaudernack G, Torlakovic G, Berner A. Independent prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in pN0 prostate cancer undergoing curative radiotherapy. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2002 May 1;99(1):100–5.
61. Hechelhammer L, Störkel S, Odermatt B, Heitz PU, Jochum W. Epidermal growth factor receptor is a marker for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2003 Jul;443(1):28–31.
62. Mándoky L, Géczi L, Bodrogi I, Tóth J, Csuka O, Kásler M, et al. Clinical relevance of HER-2/neu expression in germ-cell testicular tumors. *Anticancer Res.* 2004 Aug;24(4):2219–24.
63. Ghavamnasiri MR, Saeedi Saedi H, Shahid Sales S, Ghafarzadegan K. Clinical Relevance of HER-2/neu Overexpression in Patients With Testicular Nonseminomatous Germ Cell Tumor. *Urol J.* 2010;7(1):26–9.
64. Vliagoftis H, Worobec AS, Metcalfe DD. The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Oct;100(4):435–40.
65. Boublikova et. al. *Crit. Reviews in Oncology/Hematology*, 89 (2014)33-385.
66. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):312–4.

67. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):577–80.
68. Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF Jr. Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 1999 Mar 11;18(10):1897–902.
69. Cheng L, Roth LM, Zhang S, Wang M, Morton MJ, Zheng W, et al. KIT gene mutation and amplification in dysgerminoma of the ovary. *Cancer*. 2011 May 15;117(10):2096–103.
70. Tabone S, Théou N, Wozniak A, Saffroy R, Deville L, Julié C, et al. KIT overexpression and amplification in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 30;1741(1-2):165–72.
71. Yun J, Lee J, Jang J, Lee EJ, Jang KT, Kim JH, et al. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2011 Jun;119(6):330–5.
72. Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1643–7.
73. Madani A, Kemmer K, Sweeney C, Corless C, Ulbright T, Heinrich M, et al. Expression of KIT and epidermal growth factor receptor in chemotherapy refractory non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2003 Jun;14(6):873–80.
74. Miyai K, Yamamoto S, Asano T, Tamai S, Matsubara O, Tsuda H. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in adult testicular germ cell tumors: Potential role in tumor progression. *Cancer Sci*. 2010 Sep;101(9):1970–6.

TABELA ANEXO 1. Lista dos casos estudados, idade, diagnóstico, tamanho dos tumores primários e invasão ou não do entorno tumoral, estadiamento pTNM no momento do diagnóstico, data do diagnóstico, tratamentos, data e situação no último contato

Nº	Nº BIÓPSIA	IDADE	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	INVASÃO ANGIOL.	RETE	EPIDIDIMO	CORDÃO	MARGEM DE CORDÃO	PTNM	DATA DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DATA ÚLTIMO CONTATO	SITUAÇÃO ÚLTIMO CONTATO
						TESTIS								
1	B 2888/96	24	CA EMBRIONÁRIO	9x7	-	-	-	-	-	PT1N1M0	03/07/1996	QT	14/09/2002	VIVO
2	B 4749/96	31	TTCGMISTO	6,7	-	-	-	-	-	PT1N1M0	28/10/1996		19/11/1998	ÓBITO
3	B 3040/97	25	CA EMBRIONÁRIO	6x5,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	10/06/1997	QT	08/01/1999	VIVO
4	B 3291/97	29	TTCGMISTO	-	-	-	-	-	-	PT1N0M0	02/07/1997		27/08/2013	VIVO
5	B 4889/97	38	TTCGMISTO	4,5x3	-	-	-	-	-	PT1N2M0	28/09/1997		16/12/2013	VIVO
6	B 441/98	17	TTCGMISTO	-	-	-	-	-	-	PT1NXM0	29/01/1998	QT	03/06/2002	VIVO
7	B 795/98	36	TTCGMISTO	3,5X3	-	-	-	-	-	PT1N0M0	16/02/1998		11/01/2013	VIVO
8	B 1109/98	33	TTCGMISTO	7X4	-	-	-	-	-	PT4N0M0	10/03/1998	QT	12/03/2002	VIVO
9	B 3849/98	35	TTCGMISTO	5,2X3,9	-	-	-	-	-	PT1N0M0	11/09/1998		26/10/2000	ÓBITO
10	B 4847/98	19	TERATOMA	7X6,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	02/10/1998	QT	23/07/2003	VIVO
11	B 798/99	26	CA EMBRIONÁRIO	4X3,2	-	-	-	-	-	PT1NXM0	05/02/1999	QT	04/06/2003	VIVO
12	B 4075/99	18	TTCGMISTO	6X4,5	SIM	SIM	SIM	-	-	PT2N1M0	22/06/1999	QT	10/10/2012	VIVO
13	B 6783/99	29	CA EMBRIONÁRIO	3,5X1,7	SIM	-	-	-	-	PT2NXM0	22/10/1999	QT	27/05/2008	VIVO
14	B 7561/99	18	TTCGMISTO	3X2,5	-	-	-	-	-	PT1NXM0	26/11/1999		26/11/1999	SEM INFORMAÇÃO
15	B 6050/00	26	TERATOMA	6X4,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	30/08/2000		23/05/2013	VIVO
16	B 3390/02	16	TERATOMA	-	-	-	-	-	-	PT1N0M0	26/04/2001		12/07/2013	VIVO
17	B 1382/02	27	TERATOMA	5,9X4,5	-	-	-	-	-	PT1NXM0	22/02/2002		17/11/2004	ÓBITO
18	B 3340/02	16	TERATOMA	6X4,4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	24/04/2002		10/01/2013	VIVO
19	B 6999/02	23	TTCGMISTO	2,4X2,2	-	-	-	-	-	PT1NXM0	22/08/2002	QT	22/11/2013	VIVO
20	B 7755/02	26	TTCGMISTO	5,7X5,5	-	-	-	-	-	PT1NXM1	17/09/2002		14/10/2002	ÓBITO
21	B 8570/03	18	TTCGMISTO	3X2,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	22/01/2003	RXT	05/03/2013	VIVO
22	B 1384/03	22	CA EMBRIONÁRIO	3,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	17/02/2003		12/08/2013	VIVO
23	B 3175/03	21	TTCGMISTO	6,5X4,5	-	-	-	-	-	PT1NXM0	11/04/2003		03/08/2003	ÓBITO
24	B 130/03	33	TTCGMISTO	3,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	10/06/2003		02/07/2013	VIVO

Nº	Nº BIÓPSIA	IDADE	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	INVASÃO ANGIOL.	RETE	EPIDIDIMO	CORDÃO	MARGEM DE CORDÃO	PTNM	DATA DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DATA ÚLTIMO CONTATO	SITUAÇÃO ÚLTIMO CONTATO
						TESTIS								
25	B 6286/03 e B 6343/03	26	TTCGMISTO	1,4X0,9	-	-	-	-	-	PT1N0M0	15/07/2003	RXT	06/06/2013	VIVO
26	B 6931/03	43	CA EMBRIONÁRIO	4,5X3,5	-	-	-	-	-	PT1N1M0	01/08/2003	QT	27/04/2010	ÓBITO
27	B 7079/03	18	TTCGMISTO	11X8,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	06/08/2003		21/04/2013	VIVO
28	B 7606/03	26	SEIO ENDODÉRMICO	8,5X5,6	SIM	-	-	SIM	SIM	PT3NXM0	25/08/2003	QT	04/07/2013	VIVO
29	B 6000/05	21	TTCGMISTO	-	-	-	-	-	-	PT1N0M0	01/10/2003	QT	30/09/2013	VIVO
30	B 10991/03	18	TERATOMA	7,5X7,0	-	-	-	-	-	PT1N1M0	05/12/2003	QT	01/03/2010	ÓBITO
31	B 11163/03	25	TERATOMA	8X4,5	-	-	-	-	-	PT1N1M0	10/12/2003	QT	13/02/2011	ÓBITO
32	B 1673/04	25	TTCGMISTO	1,5X1,2	-	-	-	-	-	PT1N1M0	02/03/2004	QT	12/08/2013	VIVO
33	B 5046/04	22	CA EMBRIONÁRIO	1,5X1,2	-	-	-	-	-	PT1N1M0	01/06/2004	QT	19/11/2013	VIVO
34	B 7281/04	22	TERATOMA	-	-	-	-	-	-	PT1N1M1	19/08/2004		26/07/2013	VIVO
35	B 10739/04	31	TTCGMISTO	5X4,3	SIM	-	-	-	-	PT2N2M0	02/10/2004	QT	14/10/2013	VIVO
36	B 10122/04	24	CA EMBRIONÁRIO	-	-	-	-	-	-	PT1N1M0	12/11/2004	QT	12/09/2013	VIVO
37	B 11178/04	20	TTCGMISTO	4X2,5	-	-	-	-	-	PT1N1M0	14/12/2004	QT	14/10/2013	VIVO
38	B 3153/05	21	CA EMBRIONÁRIO	6,3X4,8	-	-	-	-	-	PT1N1M0	06/04/2005	QT	07/02/2013	VIVO
39	B 4630/05	23	TTCGMISTO	9,5X7	-	-	-	-	-	PT1NXM0	19/05/2005		06/07/2005	ÓBITO
40	B 6713/05	19	TERATOMA	8,5X6	-	-	-	-	-	PT1NXM0	22/07/2005		02/03/2006	ÓBITO
41	B 8286/05	21	TTCGMISTO	7X4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	12/09/2005		18/03/2013	VIVO
42	B 8954/05	35	CA EMBRIONÁRIO	10X7,8	-	-	SIM	-	-	PT2NXM1	29/09/2005		25/02/2006	ÓBITO
43	B 10009/05	29	CA EMBRIONÁRIO	1,9x1,6	SIM	-	SIM	-	-	PT2N2M0	31/10/2005	QT	10/07/2013	VIVO
44	B 1852/06	39	TTCGMISTO	-	-	-	-	-	-	PT1N0M0	02/03/2006		26/01/2011	ÓBITO
45	B 3928/06	16	TTCGMISTO	3X2,2	-	-	-	-	-	PT1N0M0	05/05/2006	QT	11/10/2013	VIVO
46	B 4430/06	26	CA EMBRIONÁRIO	5,6X4,7	-	-	-	-	-	PT1N1M0	19/05/2006	QT	05/06/2013	VIVO
47	B 4520/06	30	SEIO ENDODÉRMICO	-	-	-	-	-	-	PT4N0M1A	23/05/2006		05/03/2007	ÓBITO
48	B 10177/06	20	TTCGMISTO	7X5,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	27/11/2006		11/09/2013	VIVO
49	B 1756/07	32	CA EMBRIONÁRIO	9x7	-	-	SIM	-	-	PT2NXM0	28/02/2007		12/01/2009	ÓBITO
50	B 2735/07	18	TERATOMA	9,5X8,7	-	-	-	-	-	PT1N0M0	28/03/2007		25/07/2013	VIVO

Nº	Nº BIÓPSIA	IDADE	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	INVASÃO ANGIOL.	RETE	EPIDIDIMO	CORDÃO	MARGEM DE CORDÃO	PTNM	DATA DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DATA ÚLTIMO CONTATO	SITUAÇÃO ÚLTIMO CONTATO
						TESTIS								
51	B 4943/07	17	TTCGMISTO	4X3	-	-	-	-	-	PT1N2M0	06/06/2007	QT	20/03/2013	VIVO
52	B 5378/07	21	TTCGMISTO	2,3X1	-	-	-	-	-	PT1NXM0	20/06/2007	QT	05/02/2013	VIVO
53	B 7704/07	22	TTCGMISTO	7,5X5,5	-	-	-	-	-	PT1N2M0	31/08/2007	QT	04/06/2013	VIVO
54	B 8596/07	17	TTCGMISTO	8X5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	01/10/2007		08/05/2013	VIVO
55	B 8732/07	31	SEIO ENDODÉRMICO	5,5X3,3	-	-	-	SIM	-	PT3N1M0	03/10/2007	QT	13/06/2013	VIVO
56	B 9226/07	24	TTCGMISTO	5X3	-	-	-	-	-	PT1N0M0	19/10/2007	QT	09/08/2012	VIVO
57	B 10221/07	36	SEIO ENDODÉRMICO	4,5X4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	13/11/2007		11/09/2013	VIVO
58	B 9931/07	25	TTCGMISTO	7,5X6	-	-	-	-	-	PT1N0M0	13/11/2007		11/07/2013	VIVO
59	B 3098/08	25	TERATOMA	3,7X3	-	-	-	-	-	PT1NXM0	14/04/2008	QT	12/09/2013	VIVO
60	B 8234/08	41	TTCGMISTO	10X9	-	SIM	-	-	-	PT1N0M0	24/09/2008	QT	22/02/2013	VIVO
61	B 9449/08	23	TTCGMISTO	5,5X3,3	-	-	-	-	-	PT1N2M0	31/10/2008	QT	17/11/2009	VIVO
62	B 10492/08	51	CA EMBRIONÁRIO	6X4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	03/12/2008		29/01/2010	ÓBITO
63	B 1468/09	40	CA EMBRIONÁRIO	6,0X4,6	SIM	-	-	-	-	PT2N2M0	18/02/2009	QT	18/02/2013	VIVO
64	B 2218/09	29	TTCGMISTO	5,2X4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	17/03/2009		12/03/2013	VIVO
65	B 2427/09	36	TERATOMA	7X4,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	23/03/2009		19/02/2013	VIVO
66	B 3110/09	23	TTCGMISTO	7,5X7	-	-	-	-	-	PT1NXM0	13/04/2009	QT	30/04/2013	VIVO
67	B 4276/09	17	TTCGMISTO	7X4,6	-	-	-	-	-	PT1N1M0	18/05/2009		20/09/2013	VIVO
68	B 6674/09	34	CA EMBRIONÁRIO	3,1X2,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	29/07/2009		03/05/2013	VIVO
69	B 6753/09	20	TERATOMA	9,5X7	-	-	-	-	-	PT1N0M0	31/07/2009		11/03/2013	VIVO
70	B 6873/09	1	SEIO ENDODÉRMICO	3X2,2	-	-	-	-	-	PT1NXM0	03/08/2009		14/02/2013	VIVO
71	B 4937/09	32	TTCGMISTO	7,5X4,3	-	-	-	-	-	PT1N1M0	05/09/2009	QT	02/04/2013	VIVO
72	B 8306/09	29	TTCGMISTO	6x5,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	16/09/2009		19/07/2013	VIVO
73	B 9596/09	40	TTCGMISTO	8X4,2 (Esquerdo) 1,5X1 (Direito)	-	-	SIM (Esquerdo)	-	-	PT1NXM0 (Direito) PT2NXM0 (Esquerdo)	21/10/2009		20/06/2010	ÓBITO
74	B 9675/09	27	CA EMBRIONÁRIO	4X2,7	-	SIM	-	-	-	PT1N2M0	21/10/2009	QT	29/04/2013	VIVO
75	B 11241/09	35	CA EMBRIONÁRIO	10,0X8,2	-	-	-	-	-	PT1N0M0	11/12/2009		15/04/2013	VIVO

Nº	Nº BIÓPSIA	IDADE	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	INVASÃO ANGIOL.	RETE	EPIDIDIMO	CORDÃO	MARGEM DE CORDÃO	PTNM	DATA DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DATA ÚLTIMO CONTATO	SITUAÇÃO ÚLTIMO CONTATO
						TESTIS								
76	B 231/10	25	TTCGMISTO	4,3X4	-	-	-	-	-	PT1N0M0	11/01/2010		05/08/2013	VIVO
77	B 616/10	28	TTCGMISTO	1,8X1,5	SIM	SIM	-	-	-	PT2N0M0	22/01/2010		05/07/2013	VIVO
78	B 1929/10	26	TTCGMISTO	3X2	-	-	-	-	-	PT1N0M0	05/03/2010		26/03/2013	VIVO
79	B 2053/10	26	CA EMBRIONÁRIO	5X3,7	-	-	-	-	-	PT1NXM0	08/03/2010		11/03/2010	ÓBITO
80	B 2046/10	21	CA EMBRIONÁRIO	1,5X1,0	-	-	SIM	-	-	PT1N2M0	09/03/2010	RXT	03/04/2013	VIVO
81	B 2413/10	19	TTCGMISTO	8X5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	18/03/2010		17/07/2013	VIVO
82	B 2649/10	29	CA EMBRIONÁRIO	2,4X2	-	-	-	SIM	-	PT1N1M0	25/03/2010	QT	17/01/2013	VIVO
83	B 3606/10	27	TTCGMISTO	5X3,2	SIM	-	-	-	-	PT2NXM0	23/04/2010	QT	16/05/2013	VIVO
84	B 6822/10	1	SEIO ENDODÉRMICO	6X4,3	-	-	-	-	-	PT1NXM0	04/08/2010	QT	26/04/2013	VIVO
85	B 7014/10	24	TTCGMISTO	9X7,2	-	-	-	-	-	PT1N0M0	10/08/2010		12/06/2013	VIVO
86	B 7052/10	31	TTCGMISTO	-	SIM	-	-	-	-	PT2NXM0	10/08/2010	QT	25/09/2013	VIVO
87	B 7565/10	25	TTCGMISTO	8X7,3	-	-	-	-	-	PT1N1M0	25/08/2010	QT	12/07/2013	VIVO
88	B 9001/10	27	TERATOMA	9X7,5	-	-	-	-	-	PT1N0M0	13/10/2010		10/05/2013	VIVO
89	B 10739/10	28	TTCGMISTO	4,4X3,7	-	-	-	-	-	PT1N1M0	03/12/2010	QT	16/05/2013	VIVO
90	B 10876/10	24	TTCGMISTO	6,5X6	-	-	-	-	-	PT1NXM0	08/12/2010	QT	15/02/2013	VIVO
91	B 615/11	29	TTCGMISTO	7X5,3	-	-	-	-	-	PT1N2M0	24/01/2011	QT	20/01/2013	VIVO
92	B 1326/11	28	TTCGMISTO	5,3X3	SIM	-	-	-	-	PT2N2M0	14/02/2011	QT	06/03/2013	VIVO
93	B 1615/11	20	CA EMBRIONÁRIO	3,4X1,7	-	-	-	-	-	PT1N1M0	22/02/2011	QT	04/04/2013	VIVO
94	B 4136/11	18	TTCGMISTO	7X4,2	SIM	-	-	-	-	PT2N0M1	16/05/2011	QT	24/06/2013	VIVO
95	B 4431/11	28	CA EMBRIONÁRIO	4,6X3,5	-	-	-	-	-	PT1N2M0	24/05/2011	QT	15/01/2013	VIVO
96	B 6305/11	22	TTCGMISTO	8X7,2	SIM	-	SIM	-	-	PT2N2M0	22/07/2011		14/05/2013	VIVO
97	B 6777/11	32	TTCGMISTO	2,7X2,3	-	-	-	-	-	PT1N0M0	03/08/2011		13/05/2013	VIVO
98	B 7476/11	37	TTCGMISTO	6,5X6	-	-	-	-	-	PT1N1M1	25/08/2011	QT	15/10/2012	ÓBITO
99	B 7570/11	29	TTCGMISTO	4,5X3,6	-	-	-	-	-	PT1NXM0	29/08/2011	QT	26/03/2013	VIVO
100	B 7702/11	40	TTCGMISTO	4X2	SIM	-	SIM	SIM	-	PT3NXM0	01/09/2011	QT	10/06/2013	VIVO
101	B 8374/11	31	TTCGMISTO	4X3,5	-	-	-	-	-	PT1NXM0	22/09/2011		16/07/2013	VIVO
102	B 8417/11	28	TTCGMISTO	2,4X1,3	-	-	-	-	-	PT1N2M0	23/09/2011	QT	16/05/2013	VIVO

Nº	Nº BIÓPSIA	IDADE	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	INVASÃO ANGIOL.	RETE	EPIDIDIMO	CORDÃO	MARGEM DE CORDÃO	PTNM	DATA DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DATA ÚLTIMO CONTATO	SITUAÇÃO ÚLTIMO CONTATO
						TESTIS								
103	B 9077/11	21	CA EMBRIONÁRIO	3X2,5	-	-	-	-	-	PT1NXM0	13/10/2011	QT	17/07/2013	VIVO

Notas: 1-TTCGMISTO: Tumor Testicular de Células Germinativas Misto / 2-Caso nº 75 é uma neoplasia bilateral. / 3-Caso nº 14 o paciente não retornou mais após o diagnóstico

TABELA ANEXO 2. Identificação dos casos segundo idade, data de diagnóstico, tempo de acompanhamento, procedimentos e desfechos.

Nº	Biopsia	Idade	Diagnóstico	Tempo Acomp. (meses)	Interc.	Outros	Última Situação	EGFR	Her2	c-Kit
1	B 2888/96	24	CA EMBRIONÁRIO	132	TU BILAT.	QT	S.I.	-	-	-
2	B 4749/96	31	TTCGMISTO ¹⁾	24	META		ÓBITO	1+	-	-
3	B 3040/97	25	CA EMBRIONÁRIO	48	NÃO	QT	S.I.	1+	-	-
4	B 3291/97	29	TTCGMISTO	156	NÃO		VIVO	-	-	-
5	B 4889/97	38	TTCGMISTO	180	META		VIVO	1+	-	-
6	B 441/98	17	TTCGMISTO			QT	VIVO	-	-	-
7	B 795/98	36	TTCGMISTO	168	NÃO		VIVO	1+	-	1+
8	B 1109/98	33	TTCGMISTO	48		QT	VIVO	1+	-	-
9	B 3849/98	35	TTCGMISTO	4	?		ÓBITO	2+	-	-
10	B 4847/98	19	TERATOMA	72	NÃO	QT	S.I.	1+	-	-
11	B 798/99	26	CA EMBRIONÁRIO	156	NÃO	QT	S.I.	-	-	-
12	B 4075/99	18	TTCGMISTO	144	META	QT	VIVO	-	-	-
13	B 6783/99	29	CA EMBRIONÁRIO	156		QT	S.I.	-	-	-
14	B 7561/99	18	TTCGMISTO				S.I.	2+	1+	1+
15	B 6050/00	26	TERATOMA	48	NÃO		VIVO	2+	1+	-
16	B 3390/02	16	TERATOMA	134	NÃO		VIVO	-	-	1+
17	B 1382/02	27	TERATOMA				ÓBITO	-	-	-
18	B 3340/02	16	TERATOMIA				VIVO	-	-	2+
19	B 6999/02	23	TTCGMISTO	119	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
20	B 7755/02	26	MISTO				ÓBITO	-	-	1+
21	B 8570/03	18	TTCGMISTO	113	NÃO	RXT	VIVO	-	-	-
22	B 1384/03	22	CA EMBRIONÁRIO	112	NÃO		VIVO	-	-	-
23	B 3175/03	21	TTCGMISTO				ÓBITO	1+	-	-
24	B 130/03	33	TTCGMISTO	108			VIVO	-	-	-
25	B 6286/03 ^E B 6343/03	26	TTCGMISTO			RXT	VIVO	-	-	-
26	B 6931/03	43	CA EMBRIONÁRIO				ÓBITO	-	-	-
27	B 7079/03	18	TTCGMISTO	106	NÃO		VIVO	-	-	-
28	B 7606/03	26	SEIO EDODÉRMICO	106	NÃO	QT	VIVO	-	-	2+
29	B 6000/05	21	TTCGMISTO	104	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
30	B 10991/03	18	TERATOMA	102	META	QT	ÓBITO	-	-	1+
31	B 11163/03	25	TERATOMA		META	QT	ÓBITO	2+	1+	2+
32	B 1673/04	25	TTCGMISTO	99	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
33	B 5046/04	22	C EMBRIONÁRIO	96		QT	VIVO	-	-	-
34	B 7281/04	22	TERATOMA	94	META		VIVO	-	-	-
35	B 10739/04	31	TTCGMISTO		META	QT	VIVO	1+	-	-
36	B 10122/04	24	CA EMBRIONÁRIO	91	META	QT	VIVO	-	-	-
37	B 11178/04	20	TTCGMISTO	90	META	QT	VIVO	-	-	-
38	B 3153/05	21	CA EMBRIONÁRIO		META	QT	VIVO	-	-	-
39	B 4630/05	23	TTCGMISTO				ÓBITO	-	-	1+
40	B 6713/05	19	TERATOMA		META		ÓBITO	1+	-	-
41	B 8286/05	21	TTCGMISTO	81	NÃO		VIVO	-	-	1+
42	B 8954/05	35	CA EMBRIONÁRIO				ÓBITO	1+	-	-
43	B 10009/05	29	CA EMBRIONÁRIO	80	META	QT	VIVO	-	-	-

Nº	Biopsia	Idade	Diagnóstico	Tempo Acomp. (meses)	Interc.	Outros	Última Situação	EGFR	Her2	c-Kit
44	B 1852/06	39	TTCGMISTO				ÓBITO	-	-	-
45	B 3928/06	16	MISTO	73	NÃO	QT	VIVO	1+	-	-
46	B 4430/06	26	CA EMBRIONARIO	73	META	QT	VIVO	-	-	-
47	B 4520/06	30	TU SEIO ENDODÉRMICO				ÓBITO	-	-	1+
48	B 10177/06	20	TTCGMISTO				VIVO	-	-	-
49	B 1756/07	32	CA EMBRIONÁRIO				ÓBITO	1+	-	1+
50	B 2735/07	18	TERATOMA				VIVO	1+	1+	-
51	B 4943/07	17	TTCGMISTO	60	META	QT	VIVO	-	-	-
52	B 5378/07	21	MISTO	60	NÃO	QT	VIVO	1+	-	1+
53	B 7704/07	22	TTCGMISTO	58	NÃO	QT	VIVO	-	-	2+
54	B 8596/07	17	MISTO	56	NÃO		VIVO	1+	-	1+
55	B 8732/07	31	SEIO EDODÉRMICO	56	NÃO	QT	VIVO	-	-	1+
56	B 9226/07	24	TTCGMISTO	56		QT	VIVO	2+	-	-
57	B 9931/07	25	TTCGMISTO	55	NÃO		VIVO	-	-	-
58	B 10221/07	36	SEIO EDODÉRMICO	55	NÃO		VIVO	-	2+	-
59	B 3098/08	25	TERATOMIA	49	NÃO	QT	VIVO	1+	1+	1+
60	B 8234/08	41	TTCGMISTO	44	NÃO	QT	VIVO	-	-	2+
61	B 9449/08	23	TTCGMISTO	43	META	QT	VIVO	-	-	2+
62	B 10492/08	51	CA EMBRIONÁRIO		NÃO		ÓBITO	2+	-	-
63	B 1468/09	40	CA EMBRIONÁRIO	40	META	QT	VIVO	-	-	1+
64	B 2218/09	29	MISTO	39	NÃO		VIVO	2+	1+	-
65	B 2427/09	36	TERATOMA	39	NÃO		VIVO	1+	-	-
66	B 3110/09	23	MISTO	38	SIM	QT	VIVO	-	-	-
67	B 4276/09	17	TTCGMISTO	37	NÃO		VIVO	1+	1+	1+
68	B 6674/09	34	CA EMBRIONÁRIO	35	NÃO		VIVO	-	-	-
69	B 6753/09	20	TERATOMIA	35	NÃO		VIVO	1+	-	-
70	B 6873/09	01	SEIO EDODÉRMIO	34	NÃO		VIVO	2+	-	1+
71	B 4937/09	32	TTCGMISTO	33	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
72	B 8306/09	29	MISTO	33	NÃO		VIVO	2+	-	-
73	B 9675/09	27	CA EMBRIONÁRIO	32	META	QT	VIVO	-	-	-
74	B 9596/09	40	TTCGMISTO				ÓBITO	-	-	2+
75	B 11241/09	35	CA EMBRIONÁRIO	30	NÃO		VIVO	-	-	-
76	B 231/10	25	MISTO	29	NÃO		VIVO	2+	1+	2+
77	B 616/10	28	MISTO	29	NÃO		VIVO	-	-	1+
78	B 1929/10	26	MISTO				VIVO	1+	-	1+
79	B 2053/10	26	CA EMBRIONÁRIO				ÓBITO	-	-	-
80	B 2046/10	21	CA EMBRIONÁRIO			RXT	VIVO	-	-	-
81	B 2413/10	19	MISTO	27	NÃO		VIVO	-	-	-
82	B 2649/10	29	CA EMBRIONÁRIO	27	SIM	QT	VIVO	-	-	-
83	B 3606/10	27	MISTO	26	SIM	QT	VIVO	-	-	-
84	B 6822/10	1	SEIO EDODÉRMICO	22	NÃO	QT	VIVO	-	-	2+
85	B 7052/10	31	MISTO	22	SIM	QT	VIVO	-	-	-
86	B 7014/10	24	MISTO	22	NÃO		VIVO	2+	-	1+
87	B 7565/10	25	MISTO	22	META	QT	VIVO	1+	-	2+
88	B 9001/10	27	TERATOMA	20	NÃO		VIVO	-	-	-

Nº	Biopsia	Idade	Diagnóstico	Tempo Acomp. (meses)	Interc.	Outros	Última Situação	EGFR	Her2	c-Kit
89	B 10739/10	28	MISTO	18	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
90	B 10876/10	24	MISTO	18	NÃO	QT	VIVO	2+	-	2+
91	B 615/11	29	MISTO	17	SIM	QT	VIVO	2+	-	-
92	B 1326/11	28	MISTO	16	SIM	QT	VIVO	1+	1+	1+
93	B 1615/11	20	CA EMBRIONÁRIO	16	NÃO	QT	VIVO	1+	-	2+
94	B 4136/11	18	TTCGMISTO	13		QT	VIVO	2+	1+	-
95	B 4431/11	28	CA EMBRIONÁRIO	13	SIM	QT	VIVO	-	-	-
96	B 6305/11	22	MISTO	11			VIVO	-	-	1+
97	B 6777/11	32	MISTO	10	NÃO		VIVO	2+	-	2+
98	B 7476/11	37	TTCGMISTO	10		QT	ÓBITO	1+	-	1+
99	B 7570/11	29	TTCGMISTO	10	NÃO	QT	VIVO	2+	-	2+
100	B 7702/11	40	TTCGMISTO	9	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
101	B 8374/11	31	TTCGMISTO	9			VIVO	2+	1+	-
102	B 8417/11	28	TTCGMISTO	9	NÃO	QT	VIVO	-	-	-
103	B 9077/11	21	CA EMBRIONÁRIO	8		QT	VIVO	-	-	-

TTCGMISTO: Tumor Testicular de Células Germinativas Misto.