



2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Biomarcadores em Tumores das Células Germinativas

Biomarcadores em Tumores das Células Germinativas

Sónia C. L. Simões

Sónia Catarina Lopes Simões

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Biomarcadores em Tumores das Células Germinativas

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em 2012 realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Lina de Carvalho (Universidade de Coimbra)

Sónia Catarina Lopes Simões

2012

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,

Mas não esqueço de que minha vida

É a maior empresa do mundo...

E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver

Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e

Se tornar um autor da própria história...

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar

Um oásis no recôndito da sua alma...

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “Não”!!!

É ter segurança para receber uma crítica,

Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento é dirigido ao meu orientador, Professor João Ramalho, antes de tudo por me deixar sonhar, acreditar e realizar o projeto a que me propus, foi sem dúvida um grande desafio. Pelas palavras ditas muitas vezes quando eram mais necessárias. E acima de tudo, por me deixar ser eu a aprender sozinha. Sem dúvida sou uma privilegiada por poder ter trabalhado consigo. Obrigada!

Quero também agradecer à Doutora Lina Carvalho, pela disponibilidade de analisar as 400 e muitas lâminas... por toda a paciência e energia e confiança contagiante que me mostrou sempre, ao longo do trabalho!

Agradecimento às Técnicas do serviço de Anatomia Patológica CHUC-Hospitais da Universidade de Coimbra, Doutora Maria José Marçal, Doutora Ana Paula e Doutora Fátima, pelo levamento de todos os blocos que foram utilizados ao longo deste trabalho, sem o esforço delas não seriam possíveis estes resultados.

Ao serviço de Anatomia Patológica da Universidade Coimbra, nomeadamente à Doutora Ana Filipa, Doutora Ana Alarcão, Doutora Maria João, Doutora Teresa e Doutora Maria, por todo o apoio e disponibilidade que tiveram, pelos sorrisos e palavras de incentivo, tal como pela companhia e palavras encorajadoras.

Agradeço também ao grupo (Ana Sofia, Andreia, Andreia Filipa, Bárbara, Carla, Maria Inês, Marta, Renata, Sandra e Sofia) pela preocupação com o meu trabalho e o seu desenvolvimento e a disponibilidade que sempre demonstraram. À Paula Mota, por tudo o que me ensinou e pela enorme paciência, no trabalho de laboratório e no escrito. À Ana Paula, pelas palavras ditas na altura certa, pelas conversas, pela amizade, pelos

telefonemas e preocupação, mas acima de tudo por sempre me ter mostrado que havia algo melhor, que tudo se iria resolver transmitindo sempre tranquilidade.

Aos meus pais, pelos sacrifícios que fizeram e fazem para eu poder realizar mais um sonho e objetivo. Por aquele aconchego e mimo que existe na chegada a casa após semanas por vezes complicadas. Pelas surpresas, pelas conversas, pela compreensão, por tudo o que me ensinaram ao longo da minha vida... E acima de tudo por me ensinarem a sonhar cada vez mais alto e ser uma pessoa melhor a cada dia, que os meus objetivos sejam atingidos com honestidade, trabalho e verdade. E porque nunca deixaram de acreditar em mim. São e sempre serão muito importantes na minha vida.

Aos meus avós, sempre se mostraram preocupados e com orgulho no que estaria a fazer mesmo quando não compreendem. E que a nossa existência se assenta em princípios, se queremos ser felizes teremos de nos reger sobre o que acreditamos e não naquilo que alguém acredita por nós!

Aos meus irmãos... À minha irmã pela presença física, sempre ao meu lado e com uma palavra amiga para dizer, com vontade de me ajudar e não me deixar desistir quando parece que tudo está perdido. Ao meu irmão, que apesar da distância nunca deixou de mostrar a preocupação, o sentimento de confiança depositado ao longo deste tempo. Acima de tudo, e ambos, pelo amor que mostram e o desejo que chegasse mais além. Adoro-vos!

À minha madrinha Cristina, por tudo o que me transmite, pelos conselhos na hora adequada, pela presença assídua e acima de tudo pelo carinho e confiança!!!

Ao Luís “Miguel”, por toda ajuda na reta final...!!! Muito Obrigada Luís Filipe...

Às duas pessoas que a vida me deu o privilégio de conhecer, e se tornaram em pessoas tão importantes, que mostra que as “manas” não é necessariamente pessoas do mesmo sangue. Sempre estiveram lá... Quero agradecer-lhe pelas conversas, pelos sorrisos, pelas confissões, pelas lágrimas, pela confiança depositada e por tudo o que vivemos e haveremos de viver juntas. A distância será um mero pormenor... Por saberem e compreenderem, que a presença física não é o mais importante...

Como não podia deixar de ser, a vocês que sempre tiveram uma palavra de conforto para me dar, Bárbara Costa e David, Natália, Inês Dimas, Cris e Megguie e pela disponibilidade que mostraram para me ajudar...

Um grande, grande Obrigada à minha afilhada de curso, Daniela Oliveira. Por tudo o que fez e tentou fazer para me ajudar, pelas vezes que me chamou à razão, pelas vezes que o quis fazer e por algum motivo não o fez, por toda amizade e carinho demonstrado ao longo de todo este tempo. Ao Ivo, pelas suas conversas malucas que sempre me fazem rir, e por nunca deixar a minha autoestima descer muito baixo.

À PP e ao Nando, sem dúvida companheiros neste ano. Agradeço-vos pelas experiências partilhadas, pelos convites, pelas saídas, pelo incentivo a tudo o que me propus, pelas conversas e ajuda na elaboração de todo o trabalho. E porque, apesar de tudo mostrar o contrário, não me julgaram e tentaram compreender as minhas escolhas.

Quero também agradecer aos amigos de trabalho, Senhor Manuel, Dona Adelaide, Tânia Santos, Dennie e à Lena. Pela compreensão que tiveram este ano, por sempre entenderem a minha ausência, pelo que me ajudaram e pelo que acreditaram. Pelos jantares e conversas sem nexos ao almoço ou ao jantar, pelas gargalhadas só porque sim e pelo carinho que sempre me deram e mostraram.

Um agradecimento muito especial a todos aqueles que não acreditaram que eu era capaz, pois sem eles muitas vezes não teria coragem e força para continuar neste percurso! Obrigada...

Por fim, um grande agradecimento, ao Gustavo... Este ano, teria sido muito mais difícil sem ti... Agradeço-te pela compreensão, pelos bons momentos, pela presença assídua, pela palavra amiga, pelo carinho, pelo sorriso que me fazes dar e me mostras quando mais preciso, por tudo, mas acima de tudo pela amizade e companheirismo...O mais sincero Obrigado!!!

A todos mais uma vez o meu Muito Obrigada!!!!

Lista de Abreviaturas

AE1/AE3- Marcador de citoqueratinas

CDX2- Fator de transcrição no intestino

CGP- Células germinativas primordiais

CHUC- Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

Ck- Citoqueratinas

Ck 7- Citoqueratina 7

DAB- Diaminobenzidina

ICM- Pluriblasto

GISTs- *Gastrointestinal stromal tumours*

HE- Hematoxilina e Eosina

LP34- Marcador de citoqueratinas 5, 6 e 18

PBS- Solução tampão fosfato

PLAP- Placental alcalina fosfatase

TCG – Tumores de células germinativas

TTF1-Factor transcrição-1 tiróide

Resumo

Os TCG (tumores de células germinativas), tal como o nome indica, são originários de células germinativas primordiais, células que darão mais tarde origem aos espermatozoides nos homens e aos oócitos nas mulheres. As células germinais migram para as gónadas, mas podem ocorrer erros, e adquirirem localização extra-gonadal. A incidência de tumores de células germinativas está bem determinada, tanto no ovário como nos testículos, sendo a sua etiologia conhecida. No entanto, podem também ocorrer em localizações incorretas como é o caso do mediastino (corresponde ao espaço compreendido entre os dois pulmões, delimitado pela pleura mediastinal).

O objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar a morfologia destes tumores com recurso a imunohistoquímica, com diferentes e variados marcadores relacionados com a maturação e organogénese do embrião humano. Com a metodologia referida tentámos também estabelecer linhagens celulares no desenvolvimento tumoral, considerando as potencialidades das células durante o desenvolvimento embrionário dos seres Humanos.

Como principais conclusões verificámos que o Oct3/4 (marcador de células pluripotentes) é diferente nos TCG seminomas e carcinomas embrionários (marcação nuclear no seminoma e nuclear e citoplasmática no carcinoma embrionário). A LP34 (citoqueratinas 5, 6 e 18), a Ck7 (citoqueratinas 7) e o TTF1 (marcador pulmonar) permitiram recapitular o desenvolvimento do aparelho respiratório, sabendo que há coincidência embrionária com o CDX2 considerando este marcador intestinal. E por fim, verificámos que o Nanog (marcador de células pluripotentes) só marca TCG muito indiferenciados, correspondendo assim a um marcador de células pluripotentes, o que nos permite pensar que a proteína Nanog se encontra expressa num estágio muito precoce do desenvolvimento embrionário dos indivíduos. O mesmo acontece com a

vimentina que é expressa em TCG muito indiferenciados e deixa de ser expressa quando começa a organogénese. A vimentina é um marcador importante porque em tumores/carcinomas pouco diferenciados volta a estar expressa.

O painel de anticorpos selecionado visou assim caracterizar a evolução de tecidos imaturos para tecidos maduros. Pudemos perceber a linhagem celular sob a qual diferentes tumores/carcinomas podem ser classificados, de acordo com os anticorpos específicos de células/tecidos adultos e/ou ainda através da marcação com anticorpos que caracterizam as células pluripotentes.

Palavras- chave: Tumores células germinativas/ anticorpos/ epitélio respiratório/ epitélio intestinal/ epiderme

Abstract

GCT (germ cell tumours) are originated from PGC (primordial germ cells), that are cells that will give rise to sperm in men, and oocytes in women. During embryonic development genetic or migration errors may occur, leading to an extra-gonadal localization of PGCs. The incidence of germ cell tumours is well established both on the male and female gonads, and ethologically well known. However they can occur in wrong locations such as the mediastinum.

The main goal of this work was to study the morphology of these tumours using immunohistochemistry with a set of different markers related to the maturation and organogenesis of the human embryo. Moreover, with this methodology, we have tried to establish the cell lineage in tumour development.

We found that Oct3 / 4 has differential staining in TCG seminomas and embryonic carcinoma (in the cell nucleus in seminomas, and in the cytoplasm and nucleus in embryonic carcinoma).

LP34 (cytokeratin 5,6 and 18), CK7(cytokeratin 7) and TTF1 (marker respiratory epithelium) allowed the recapitulation of the development of the respiratory system, knowing that it coincides with the embryonic CDX2 (intestinal marker). Finally, we found that Nanog only labels undifferentiated pluripotent cell in GCT. The same is true for vimentin, which is expressed on at a much undifferentiated stage and stops its expression when organogenesis begins. Vimentin is an important marker because in poorly differentiated tumours / carcinomas it is expressed again.

The antibody panel selected aimed to characterize the evolution of immature to mature tissues. We could see the cell lineage under which several tumours / carcinoma

can be classified in accordance with adult cells / tissues specific antibodies and / or with the labelling of antibodies that characterize pluripotent cells.

Keywords: Germ cell tumours/ antibody/ respiratory epithelium / intestinal epithelium/ epiderm

Índice

Lista de abreviaturas.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VIII
Índice.....	X

Capítulo I – Introdução **1**

1. Tumores de Células Germinativas.....	2
1.1. Origem dos tumores de células germinativas.....	2
1.2. Tipos de tumores de células germinativas.....	3
1.3. Incidência de tumores de células germinativas consoante a localização e o género.....	10
1.4. Análise de marcadores nos tumores de células germinativas.....	12
2. Embriogénese e histogénese.....	14
2.1. Histogénese.....	16
3. Objetivos.....	17

Capítulo II – Material e Métodos **19**

4. Material	20
5. Métodos.....	22

Capítulo III – Resultados e Discussão **27**

6. Resultados e discussão.....	28
6.1. Incidência dos tumores de células germinativas consoante a idade e o género.....	28

6.2. Análise de marcadores e linhagem celular.....	31
6.3. Embriogénese.....	32
6.4. Organogénese.....	40
6.5. Análise quantitativa dos resultados da imunohistoquímica.....	54
6.5.1. Oct3/4 nos seminomas e nos carcinomas embrionários.....	54
6.5.2. Relação da Vimentina com o LP34.....	56
6.5.3. Relação da marcação da Ck7, Lp34 3 TTF1.....	59
Capítulo IV – Conclusão	64
Capítulo V – Referências Bibliográficas	67

Apêndice - Tabela com o teste *Cross tabs* para os 28 casos.

Capítulo I

Introdução

1. Tumores das células germinativas

1.1. Origem dos tumores de células germinativas

Os TCG (tumores de células germinativas) desenvolvem-se, como o nome indica, a partir de células germinativas. Estas células têm características peculiares, estão presentes no início do desenvolvimento embrionário e, sendo pluripotentes, dão origem a todos os tipos celulares, tendo a capacidade de se diferenciar em qualquer tecido do organismo humano. As células referidas são resultantes das primeiras divisões celulares, logo após a fecundação e, por isso, só podem ser encontradas no embrião (Bydlowski, *et al.*, 2009; Gomes & Grinfeld, 2008; Sousa & Elias, 2005). Estas células podem evoluir e diferenciarem-se até originarem células adultas que irão desempenhar funções específicas num determinado tecido. No entanto em algumas situações podem ocorrer erros nas células pluripotentes, levando ao desenvolvimento dos TCG, podendo estes ocorrer no feto, em recém-nascidos, em adultos jovens ou nos adultos.

Aquando da implantação do blastocisto, a ectoderme extra-embriônica e a endoderme visceral enviam sinais para a ectoderme embrionária, resultando na expressão do gene repressor *Blimp1/Prdm1* que estimula algumas células do epiblasto. Algumas destas células expressam *hoxb1*, *T/Brachyury* e reprimem o *snail*, tornando-se células germinativas primordiais (CGP). Ao contrário de outras células do epiblasto, células derivadas das CGP preservam os genes associados à pluripotência ativos. Entre estes genes podemos referir o *Nanog* e o *Oct3/4*. Estes genes poderão estar de novo ativos nos TCG, contribuindo assim para o potencial maligno que estes tumores representam. Por outro lado, estes genes podem ser estudados como marcadores para a identificação destes tumores. As CGP estão presentes no saco vitelino por volta do vigésimo quarto dia de gestação e começam a proliferar aquando da sua migração para o

exterior do saco vitelino (Frazier, 2012). Estas células migram do saco vitelino para o embrião ao longo da sua linha média, ocupando posteriormente a crista gonadal que origina as gónadas femininas e masculinas. As CGP terão como função final a formação de espermatozoides e oócitos (Seeley, Stephens, & Tate, 2003). Se ocorrer algum erro no trajeto destas células, poderão ficar com uma localização ectópica num estado indiferenciado, sendo esta uma das hipóteses levantadas para a ocorrência de tumores derivados de CGP com localização extra-gonadal (Frazier, 2012; Seeley, *et al.*, 2003).

A variabilidade histológica dos TCG reflete a capacidade que as células germinativas têm para originar padrões divergentes de diferenciação, em vários estádios de desenvolvimento celular e organizacional (tecidos), podendo assim traduzir-se por tumores com morfologias diferentes. A maioria destas neoplasias consegue mimetizar diferentes etapas do desenvolvimento embrionário do organismo, dando origem a células típicas de diferentes tecidos (Seeley, *et al.*, 2003).

1.2. Tipos de tumores de células germinativas

O disgerminoma e o seminoma são idênticos morfologicamente e citologicamente, variando o nome consoante o género do indivíduo (feminino e masculino, respetivamente). Histologicamente estes tumores apresentam células tumorais claras, com membranas citoplasmáticas proeminentes e o núcleo com nucléolos distintos (Figura 1; Reuter, 2008). As células formam pequenos grupos e podem ter arranjos microquísticos ou cribiformes. É muito comum os seminomas apresentarem uma histologia atípica devendo, portanto, realizar-se testes diferenciais no diagnóstico. Um bom exemplo de uma histologia atípica de um seminoma é a presença de variâncias sólidas, sendo estas também comuns ao carcinoma embrionário ou ao tumor do saco vitelino. As variâncias sólidas sugerem que as células do seminoma

podem não estar totalmente diferenciadas, podendo em algumas circunstâncias originar outros tipos de tumores de células germinativas (Reuter, 2008).

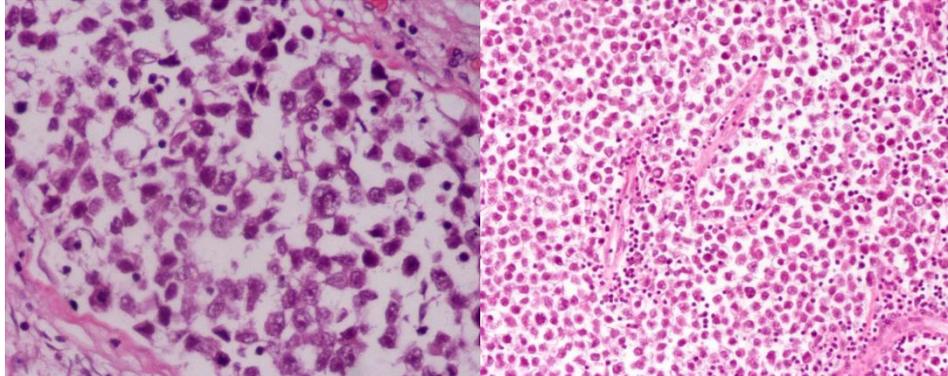


Figura 1- Imagem de TCG (seminoma) com núcleos e nucléolos distintos, com contraste de Hematoxilina e Eosina (HE). Ampliação total de 400x (imagem da esquerda) e 200x (imagem da direita).

O carcinoma embrionário é um TCG raro nas mulheres, existindo com alguma frequência nos homens. Microscopicamente, este tumor tem aspecto folheáceo (Figura 2), possui células largas, irregulares e com pouco citoplasma, núcleos pleiomórficos e múltiplos nucléolos irregulares, sendo comum observar-se sobreposição nuclear. É também comum observar fenômenos de necrose e apoptose de células individuais. Os padrões de desenvolvimento são variáveis podendo apresentar um aspeto glandular (associado a malignidade) ou estruturas papilares compostas por células epiteliais primitivas e áreas sólidas. Estas últimas podem facilmente ser confundidas com as formas atípicas do seminoma, embora o seminoma seja citologicamente diferente (Reuter, 2008).

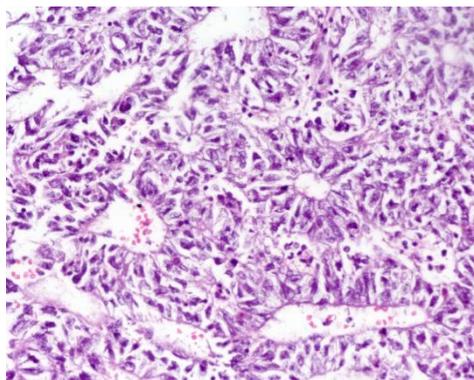


Figura 2- Imagem de um TCG (carcinoma embrionário), possuindo células largas e aspeto folheáceo – padrão tubular corado com HE. Ampliação total de 200x.

Os teratomas são outro tipo de TCG. O termo teratoma tem origem no termo grego “*teratos*”, que significa monstro (Bal, Mohan, Singh, & Sehgal, 2007; Scully, 1987). Estes tumores têm a característica de poderem apresentar células derivadas de todos os folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), num estado maduro ou imaturo, ou conter somente uma camada, designando-se monodérmicos por exemplo, *struma ovarii* que é constituído apenas por tecido tiroideu (Kline, & Bazzett-Matabele, 2010; Figura 3). Apesar de se observarem mais nos ovários os teratomas podem surgir também em indivíduos do género masculino (Cools, *et al.*, 2005). Estes tumores são normalmente benignos mas em casos raros (apenas 3% de todos os teratomas) tornam-se tumores malignos (Bal, *et al.*, 2007; Scully, 1987; Ulbright, 2005; Schultz, Sencer, Messinger, Neglia, & Steiner, 2005).

A nível histológico observa-se que os teratomas imaturos possuem quantidades variáveis de tecido de tipo embrionário, que ainda se encontra num estado imaturo, essencialmente rosetas e túbulos neuroectodermais. Estas rosetas estão rodeadas por inúmeras células basófilas apresentando numerosas figuras de mitose podendo ser também pigmentadas. O mesênquima imaturo apresenta uma forma desorganizada,

(“myxoid stroma”) podendo observar-se alguma diferenciação focal em cartilagem imatura e gordura, entre outros tecidos. Por fim, as estruturas endodermais incluem tecido hepático, epitélio intestinal com vascularização basal e tecido renal. As estruturas vasculares imaturas também podem ocorrer sendo por vezes proeminentes (Tavassoli & Devilee, 2003).

Os teratomas maduros são compostos exclusivamente por tecidos diferenciados derivados de duas ou três camadas embrionárias. Os tecidos diferenciados que os constituem incluem epitélio, tecido pulmonar, intestinal, cartilagens, dentes, pelos, entre outros (Figura 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Estes tumores estão rodeados por um tecido diferenciado semelhante à epiderme com apêndices o que lhes atribui um aspeto a que os clínicos vulgarmente designam por “quisto dermóide” (Ulbright, 2005; Tavassoli & Devilee, 2003; Figura 10). Estes tumores estão muito bem organizados histologicamente ao ponto das camadas de tecidos estarem ordenadas como estariam no órgão. Por exemplo, encontra-se com alguma facilidade epitélio respiratório rodeado por músculo liso e cartilagem, mas citologicamente estes tecidos são atípicos, não correspondendo aos do órgão normal.

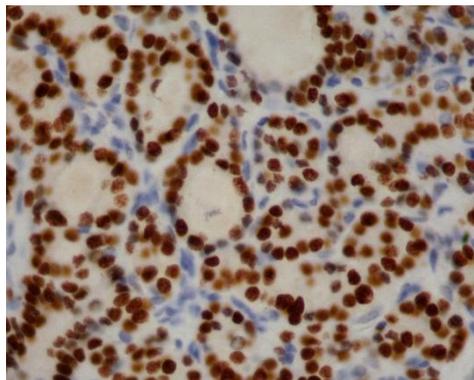


Figura 3- Imagem de TCG teratoma maduro “*struma ovarii*”, com marcação para TTF1. Ampliação total de 400x.

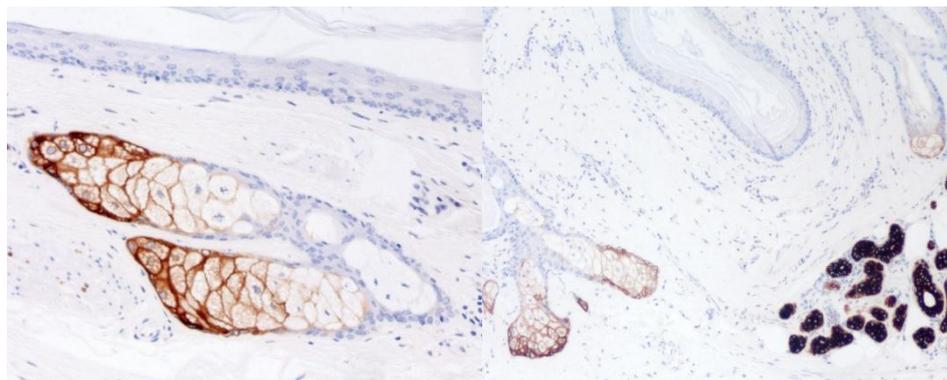


Figura 4-Imagem de um TCG teratoma maduro no ovário, com marcação para Ck7 em glândulas sebáceas à esquerda, e à direita glândulas sudoríparas. Ampliação total de 200x (à direita) e ampliação total de 100x (à esquerda).

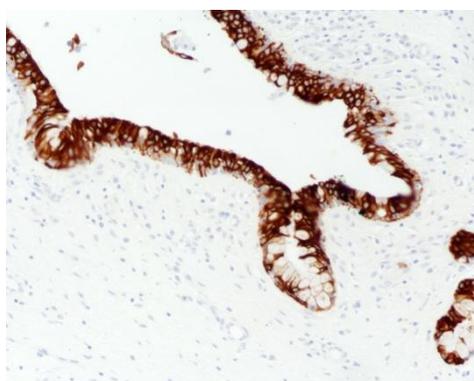


Figura 5- Imagem de um TCG feminino, com marcação de Ck7 em epitélio respiratório. Ampliação total de 200x, com o marcador

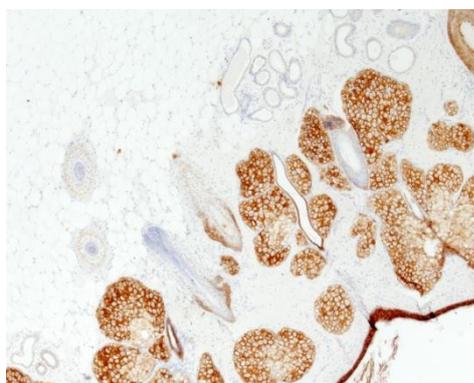


Figura 6- Imagem de um TCG feminino, com marcação de LP34 na pele e anexos cutâneos. Ampliação total de 40x.

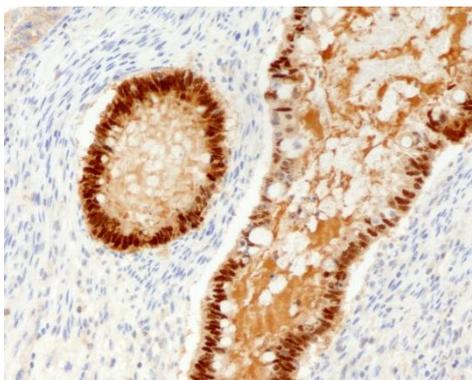


Figura 7- Imagem de um TCG feminino, com marcação de CDX2 no aparelho digestivo. Ampliação total de 400x.

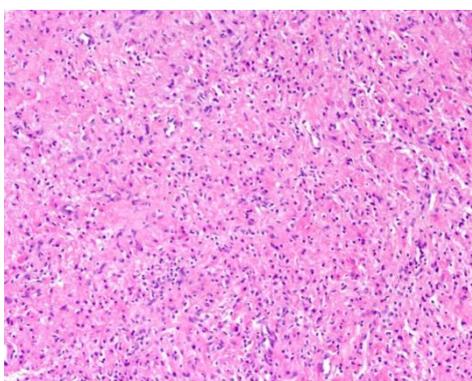


Figura 8- - Imagem de um TCG feminino, com marcação de HE epitélio cerebral. Ampliação total de 100x.



Figura 9- Imagem de Um TCG feminino (teratoma maduro), onde é visível um folículo piloso e uma glândula sebácea, com marcação para vimentina. Ampliação total de 200x.



Figura 10- Imagem de um TCG feminino quisto epidermóide, cem HE. Ampliação total de 100x.

Por fim, podemos encontrar tumores mistos que são constituídos por partes de TCG de diversos tipos (Figura 11). O TCG misto mais comumente observado apresenta tecidos semelhantes aos observados no disgerminoma e ao no tumor do saco vitelino, e podem conter adicionalmente tecido semelhante ao carcinoma embrionário, poliembrioma e/ou coriocarcinoma (Tavassoli & Devilee, 2003).

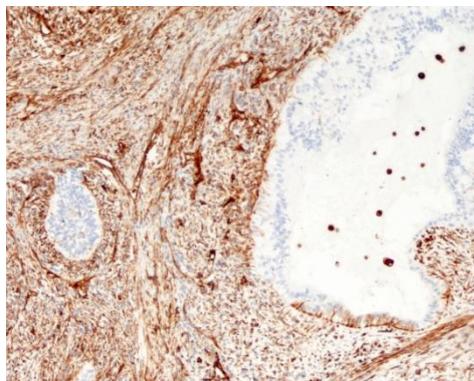


Figura 11- Imagem de um TCG masculino no testículo, constituído por carcinoma embrionário (com mesenquima imaturo e células basais que esta na transição a expressar vimentina) e teratoma maduro, com marcação para vimentina. Ampliação total de 100x.

1.3. Incidência de tumores de células germinativas consoante a localização e o género

Os tumores de células germinativas correspondem às neoplasias mais comum no género masculino, com uma percentagem de 70% (Neto, *et al.*, 2002), em indivíduos com idades compreendidas entre os quinze e os trinta e cinco anos (Pottern & Goedert, 1986). Os TCG das gónadas masculinas podem dividir-se em seminomas, carcinoma embrionário, teratoma e teratocarcinoma, coriocarcinoma e tumores do saco vitelino. O seminoma é o tumor de células germinativas mais frequente na população adulta, cerca de 50% dos casos (Tabela I; Mostofi, Sesterhenn, & Davis, 1987; Ulbright, 2005). O tipo de tumor que tem uma maior prevalência após o seminoma é o TGC misto que se apresenta em 33% dos casos, seguido do carcinoma embrionário em 10%, e depois o teratoma com prevalência de 4%, e o tumor do saco vitelino em 1% (Tabela I; Ulbright, 2005).

No género feminino, os TCG malignos são raros (Pectsidis, Pectsidis, Kassanos, 2008; Quirk, Natarajan, & Mettlin, 2005) e normalmente bastante agressivos, mas quase sempre com boa resposta ao tratamento (Quirk, *et al.*, 2005). No entanto, há que realçar que estes tumores representam 20 a 25% das neoplasias do ovário, e só 3 a 5% são malignos, correspondendo a 1-2% das neoplasias malignas do ovário (Ray- Coquard, 2004; Talerman, 1997; Tewari, *et al.*, 2000). O pico de incidência é em mulheres mais jovens ou adolescentes. De facto, os TCG perfazem cerca de 58% a 60% de todos os tumores do ovário nas mulheres jovens com menos de 20 anos (Ray- Coquard, 2004; Nogales, Talerman, Kubik-Huch, & Tavassoli, 2003; Norris & Jensen, 1972) mas só cerca de um terço destes tumores são malignos (Norris & Jensen, 1972). A proporção que o tumor das células germinativas representa no género feminino é diferente da ocorrência no género masculino. Nas mulheres, o tumor mais comum é o teratoma que

corresponde a 95% dos casos (Nogales, *et al.*, 2003; Ulbright, 2005), outra característica deste tipo de tumores nos indivíduos do género feminino, está relacionada com a sua disposição, uma vez que estes podem ser bilaterais, em cerca de 10% dos casos femininos (Lu & Gerhenson, 2005; Nogales, *et al.*, 2003). O TCG com a segunda maior incidência é disgerminoma em 2%, e pelo tumor do seio endodérmico em 1%. Os tumores mistos de células germinativas têm uma incidência inferior a 1% e, por fim, o carcinoma embrionário ocorre apenas em 0,2% dos casos (Tabela I; Ulbright, 2005).

Para além dos TCG gonadais, existem os TGC extragonadais. Estes últimos estão localizados fora das gónadas (Schomoll, 2002) e são cerca de 5% dos TCG em geral (Pottern & Goedent, 1986). O mediastino é o local onde ocorrem com maior frequência os TCG extragonadais, e corresponde ao espaço compreendido entre os dois pulmões, delimitado pela reflexão da pleura sobre os hilos pulmonares, denominada pleura mediastinal. Inicialmente pensava-se que estes tumores seriam metástases de tumores das gónadas, mas atualmente sabe-se que derivam de células germinativas primitivas que pararam a sua migração ao longo da crista urogenital, durante o processo de embriogénese precoce, ou se dispersaram fisiologicamente para o fígado, medula espinal e cérebro. A patogénese destas neoplasias ainda não é conhecida, mas sabe-se que são lesões que ocorrem mais frequentemente em jovens do género masculino, e muito raramente no género feminino (Hainsworth, 2002). Para além disso, existem estudos que relacionaram esta prevalência com anomalias cromossómicas, nomeadamente com o facto destes tumores serem mais frequentes em indivíduos que possuem o cariótipo XXY, síndrome de Klinefelter (Couto, Gross, Deheinzelin & Younes, 2006; Hainsworth, 2002).

De forma a facilitar a categorização das possíveis doenças e de atitudes terapêuticas adequadas, vulgarmente os clínicos dividem o mediastino em três. Seguindo esta divisão, os TCG correspondem a cerca de 20% das neoplasias do mediastino anterior (Couto, *et al.*, 2006; Hainsworth, 2002), e apenas 1 a 4% são malignos, possuindo diferentes características clínicas comparativamente com o mesmo tipo de tumores no testículo (Takeda, *et al.*, 2003).

Tabela I- Representação estatística da proporção de tumores em indivíduos do género feminino e do género masculino.

Tipo de histologia	Proporção no testículo (%)	Proporção no ovário (%)
Teratoma	4	95
Disgerminoma / seminoma	50	2
Tumor do saco vitelino	1	1
Carcinoma embrionário	10	0,2
Coriocarcinoma	0,3	<0,1
Poliembrioma	<1	<0,1
Tumor misto de células germinativas	33	<1

Tabela adaptada de Thomas M Ulbright, 2004.

1.4. Análise de marcadores nos tumores de células germinativas

Os tumores podem ser analisados através da técnica de imunohistoquímica que permite, uma vez seleccionados os anticorpos indicados, definir uma linhagem tumoral (Varadhachary, Abbruzzese & Lenzi, 2004).

Sendo assim, existem alguns marcadores que são usados rotineiramente, nomeadamente as anti-citoqueratinas. Existem 20 subtipos de citoqueratinas nos filamentos intermédios que possuem diferentes pesos moleculares, sendo por isso

divididas em citoqueratinas de alto e baixo peso molecular. Estas proteínas são as principais proteínas estruturais das células epiteliais (Colombe &, Omary, 2002), e estão expressas em todas as células epiteliais, mas com diferente expressão dependendo do epitélio onde se localizam. As citoqueratinas têm ainda diferente expressão consoante o estado de desenvolvimento (Moll, Franke, Schiller, Geiger, Kleper, 1982), isto é, diferentes tipos de citoqueratinas são expressas durante a diferenciação das células epiteliais, dependendo do estado de desenvolvimento e do tecido. Nas neoplasias é possível observar esta característica, dependendo do tipo de tumor e da sua diferenciação, a expressão das citoqueratinas é diferente, tal como o ambiente celular a que as células são sujeitas (Lazarides, 1980; Nagle, 1989).

O TTF-1 é uma proteína nuclear com um homeodomínio, que possui um papel transcricional importante, quer na ativação do desenvolvimento embrionário, quer na tireoide, diencefalo e epitélio respiratório (Guazzi, *et al.*, 1990; Lazzaro, Price, Felice, & Lauro, 1991; Tan, D., 2003; Varadhachary, *et al.*, 2004). Esta proteína, que tem um papel crucial no desenvolvimento periférico normal do pulmão e na sua morfogénese, pode ser então um marcador dessa linhagem celular (Yatabe, Mitsudomi, Takahashi, 2002).

A PLAP (Fosfatase alcalina placentar) é uma proteína que está presente em níveis elevados nos trofoblastos, e em pequena quantidade no pulmão, no endocervical e nas trompas de Falópio. Esta fosfatase encontra-se presente durante a organogénese do embrião.

O PAS (periodic acid shiff) é um dos ensaios a que se recorre rotineiramente e é utilizado para a observação de carboidratos, isolados (glicogénio) ou associados a proteínas (glicoproteínas) corando-os de cor magenta, colocando em evidência

membranas basais e muco segregados por glândulas e epitélios glandulares (Gonçalves & Bairos, 2006).

O CDX2 é um fator de transcrição nuclear homeobox e tem um papel importante no normal desenvolvimento do intestino (Saad, Ghorab, Khalifa, & Xu, 2011). Este fator de transcrição está envolvido em diversos processos, nomeadamente na proliferação celular e diferenciação intestinal, por isto ser um marcador muito utilizado para a marcação de intestino. É expresso em células constituintes do epitélio intestinal, ainda na embriogénese, enquanto no estado adulto só é expresso nas células epiteliais intestinais capazes de proliferar (Mizoshita, *et al.*, 2001; Saad, *et al.*, 2011).

O Oct3/4, Nanog e vimentina são três marcadores que estão presentes nas fases mais precoces do desenvolvimento embrionário, em que os dois primeiros são fatores de transcrição que mantêm a pluripotência das células. Sabe-se que à medida que as células se vão diferenciando os níveis de expressão destes genes tendem a diminuir. Por seu turno a vimentina é constituinte de filamentos intermédios que predomina em estados iniciais do desenvolvimento, e tem origem mesenquimatosa (Machado & Figueiredo, 1996).

2. Embriogénese e histogénese

Após a fusão do espermatozoide com o óvulo ocorre o desenvolvimento embrionário (Hamilton, Boyd, Mossman, 1968). As duas células iniciais irão originar o zigoto (célula única), que, ao contrário do que acontece no espermatozoide e no óvulo, já é diploide, possui um $n=46$ cromossomas (23 cromossomas paternos e 23 cromossomas maternos; Hamilton, *et al.*, 1968). O zigoto vai sofrer sucessivas mitoses dando origem a inúmeras células, originando o embrião, de seguida implanta-se no

endométrio onde vai crescer e desenvolver até à nona semana, momento a partir do qual é considerado como feto (Hamilton, *et al.*, 1968).

Durante a primeira semana o embrião passa por dois estados: a mórula (quando após sucessivas mitoses são formadas 16 células), e o blastocisto (Hamilton, *et al.*, 1968).

Na segunda semana já há a formação da cavidade amniótica, do saco vitelino, do disco embrionário (será a partir deste que se irão formar os tecidos e os órgãos do embrião) e da placa precordial, entre outros (Hamilton, *et al.*, 1968).

A histogénese inicia-se por volta da terceira semana de gestação. Nesta altura dá-se uma proliferação celular na superfície do epiblasto, onde se vão formar os três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), fenómeno que tem o nome de gastrulação (Hamilton, *et al.*, 1968; Figura 12). Os três folhetos embrionários formam-se através de uma invaginação nos tecidos do embrião. A primeira etapa deste estado é a migração celular das células que proliferaram rumo à linha média longitudinal do disco embrionário, que vão formar a linha primitiva onde posteriormente se irá formar um disco embrionário com três camadas (triblástico; Figura 13; Hamilton, *et al.*, 1968).

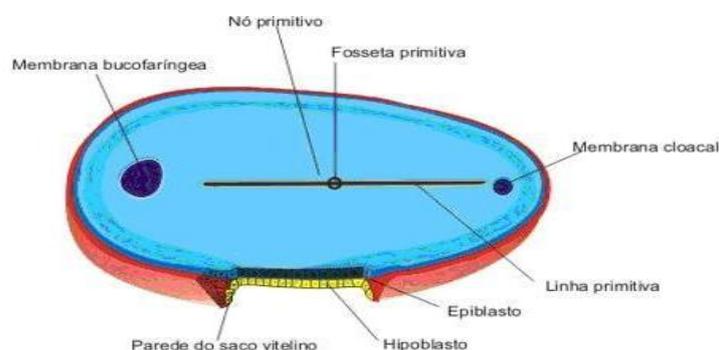


Figura 12- Imagem esquemática da representação da linha primitiva. Adaptado de <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/08/gastrulacao2.jpg>.

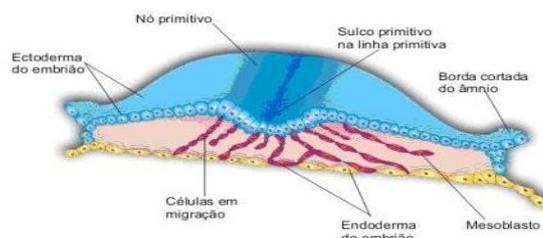


Figura 13- imagem representativa da formação das três camadas germinativas.

Adaptada de <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/08/gastrulacao3.jpg>

Sabemos que cada uma das camadas germinativas irá originar os vários tecidos ou órgãos, após sofrer diferenciação. A primeira camada a diferenciar-se é a ectoderme, e vai dar origem à epiderme (reveste todo o corpo humano), sistema nervoso central e periférico, e a retina do olho. A endoderme é a fonte dos revestimentos epiteliais das vias aéreas e do trato gastrintestinal. Por invaginação e proliferação epitelial origina as respectivas glândulas bem como o fígado e o pâncreas. A mesoderme vai dar origem ao músculo liso, aos tecidos conjuntivos e vasos associados com tecidos e órgãos, aos epitélios do aparelho reprodutor feminino e masculino e forma a maior parte do sistema cardiovascular (Hamilton, *et al.*, 1968).

2.1. Histogenese

O tecido epitelial pode ter origem em qualquer uma das camadas germinativas, sendo que dependendo da sua origem se irá diferenciar nos diferentes órgãos ou tecidos que já foram anteriormente referidos. O tecido conjuntivo embrionário ou mesenquima tem origem na mesoderme. A sua formação ocorre no final da segunda semana de gestação, aquando da formação do disco embrionário trilaminar. Seguidamente poderão formar-se diversos tecidos, tal como ósseo ou sangue. O tecido muscular estriado inicia a sua formação pela terceira semana de desenvolvimento embrionário, também a partir

de células da mesoderme. O tecido muscular liso é constituído por fibras musculares lisas, que se diferenciaram também a partir de células mesenquimatosas da mesoderme esplâncnica que rodeia a endoderme do intestino primitivo e os seus derivados. Importa ainda realçar que se supõe que nem todas as fibras deste tipo muscular têm origem mesodérmica. O tecido nervoso, por sua vez, tem origem na ectoderme da placa neural, e inicia o seu desenvolvimento a meio da terceira semana de gestação. A epiderme tem origem também ectodérmica mas a derme, sobre a qual assenta a epiderme, tem origem na mesoderme. O embrião é revestido por uma camada de células ectodérmicas durante a quarta semana de gestação, e estas vão sofrendo proliferação originando diversas camadas de células e diversas estruturas (glândulas sudoríparas, unhas, etc.). O aparelho digestivo pode resultar da ectoderme, endoderme ou mesoderme dependendo da zona do aparelho em causa, e isto ocorre a partir da terceira semana de gestação. O primórdio do aparelho respiratório surge no final da quarta semana de gestação, a origem deste epitélio surge em dois dos folhetos embrionários, endoderme e da mesoderme. Cada um destes folhetos irá originar diferentes partes do epitélio respiratório. A maturação pulmonar é dividida em quatro períodos, pseudoglandular, canalicular, sacular terminal e alveolar. A primeira glândula a ser formada é a tiroide, esta inicia a sua formação no final da quarta semana de gestação, através de uma invaginação de um espessamento endodérmico (Gonçalves & Bairos, 2010; Junqueira & Carneiro, 2004).

3. - Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi estudar tumores de células germinativas de diferentes tipos histológicos, gonadais e do mediastino, com recurso a imunohistoquímica aplicada utilizando o arquivo do serviço da Anatomia Patologia do CHUC (Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra). O painel de anticorpos

selecionado visou caracterizar tecidos maduros e imaturos, em que pretendemos perceber a eventual linhagem celular sobre a qual diferentes tumores podem ser classificados, de acordo com os anticorpos específicos de células/tecidos adultos e/ou ainda com expressão de anticorpos que caracterizam as células pluripotentes.

Capítulo II

Material e Métodos

4. Material

O tecido neoplásico estudado corresponde a tumores de células germinativas do ovário, do testículo e do mediastino. Correspondem a peças originárias de indivíduos do género masculino e feminino, com idades compreendidas entre os 16 e 73 anos (Tabela II, III, e IV).

O tecido tumoral foi retirado por médicos patologistas, fixado em formol e incluído em parafina. Os diagnósticos finais foram registados nas tabelas II, III e IV. Todos os procedimentos éticos em vigor aquando da retirada do tumor foram seguidos no processamento do material.

Tabela II- Tumores de células germinativas do ovário.

	Género	Idade	Localização	Classificação /OMS
1	Feminino	30	Ovário	Teratoma maduro
2	Feminino	39	Bilateral	Teratoma maduro
3	Feminino	33	Ovário	Teratoma maduro
4	Feminino	39	Ovário	Teratoma maduro
5	Feminino	45	Ovário	Struma ovarii
6	Feminino	46	Bilateral	Teratoma maduro bilateral e struma ovarii
7	Feminino	38	Ovário	Teratoma maduro e struma ovarii
8	Feminino	41	Ovário	Teratoma maduro
9	Feminino	66	Ovário	Teratoma maduro
10	Feminino	16	Ovário	Teratoma maduro
11	Feminino	39	Ovário	Teratoma maduro
12	Feminino	46	Ovário	Teratoma maduro
13	Feminino	30	Bilateral	Teratoma maduro
14	Feminino	41	Ovário	Teratoma maduro
15	Feminino	39	Ovário	Teratoma maduro com componentes imaturas
16	Feminino	37	Bilateral	Teratoma maduro
17	Feminino	39	Bilateral	Teratoma maduro

Tabela III- Tumor de células germinativas do testículo.

	Género	Idade	Localização	Classificação /OMS
18	Masculino	62	Testículo	TCG misto: Carcinoma embrionário e teratoma maduro.
19	Masculino	28	Testículo	TCG misto: Carcinoma embrionário e teratoma maduro.
20	Masculino	73	Testículo	TCG misto: Carcinoma embrionário e teratoma maduro..
21	Masculino	35	Testículo	TCG misto: Carcinoma embrionário e teratoma maduro.
22	Masculino	26	Testículo	Teratoma maduro
23	Masculino	28	Testículo	TCG misto: Seminoma, carcinoma embrionário, teratoma maduro e imaturo.
24	Masculino	22	Testículo	TCG misto: Seminoma, Carcinoma embrionário e teratoma maduro.
25	Masculino	29	Testículo	Teratoma maduro.
26	Masculino	32	Testículo	TCG misto: Seminoma, teratoma maduro e imaturo.
27	Masculino	33	Testículo	TCG misto: Seminoma e carcinoma embrionário.
28	Masculino	28	Testículo	TCG misto: Carcinoma embrionário, teratoma maduro e imaturo.
29	Masculino	21	Testículo	TCG misto: Seminoma e teratoma maduro.
30	Masculino	25	Testículo	Teratoma maduro

*TCG tumor de células germinativas

Tabela IV- Tumor de células germinativas do mediastino.

	Género	Idade	Localização	Classificação /OMS
31	Masculino	35	Mediastino	Seminoma.
32	Masculino	23	Mediastino	Teratoma maduro.
33	Masculino	49	Mediastino	Teratoma maduro.
34	Masculino	36	Mediastino	TCG maduro e imaturo.

*TCG tumor de células germinativas

5. Métodos

Procedeu-se à seleção dos cortes histológicos representativos das neoplasias relacionadas (Patologista Doutora Lina Carvalho), para serem estudados pelos anticorpos identificados para o estudo das características embrionárias e das células adultas, como está registado na tabela V.

Tabela V- Anticorpos e forma de revelação.

		Clone	Fornecedor	Diluição	Recuperação antigénio	Incubação Anticorpo 1º	Incubação Anticorpo 2º	Controlo Positivo
Maturação Celular	AE1/AE3	Monoclonal	Leica	250:500	10' EDTA	30'	30'	Apêndice
	Ck7	OV-TL12/30	Dako	1:800	10' EDTA	30'	30'	Endométrio
	Lp34	Monoclonal	Leica	1:150	10' EDTA	30'	30'	Pele
Organogénese	CDX2	AMT28	Leica	Pronto a usar	20' Citrato de sódio	15'	Polímero	Apêndice
	PAS							
	TTF1	SPT24	Novacastra	1:100	20' Citrato de sódio	30'	30'	Tiróide normal
	PLAP	8A9	Novacastra	Pronto a usar	15' Citrato de sódio		Polímero	Placenta
Embrionária	Oct 3/4	N1NK	Novacastra	1:100	20' Citrato de sódio	30'	30'	Seminoma
	Nanog	Monoclonal	Cell signaling	1:800	20' citrato sódio	Overnight - 4°C	15' temperatura ambiente	Seminoma
	Vimentina	Vim 3B4	Dako	1:250	20' EDTA	30'	30'	Cólon, próstata, útero

Recorreu-se à técnica de imunohistoquímica, que se baseia na ligação de um anticorpo específico a um antigénio presente na amostra. A ligação anticorpo-antigénio é revelada por uma reação enzimática em que o composto resultante sedimenta no local

da reação e apresenta cor (por exemplo: castanho se utilizar, HRP (Horseshoe Peroxidase) com os substrato DAB (Diaminobenzidina). É uma técnica com diferentes finalidades, tendo sido já utilizada para realizar a categorização prévia, dos diferentes tipos de tumores de células germinativas em estudo. Como já foi referido anteriormente, optou-se por uma fixação com formol a 4%. E, como em quase todas as fixações, o fixador provoca um “aprisionamento” irreversível nas moléculas constituintes do tecido (Tanca, Pagnozzi, Addis, 2012; Berg, Hipp, Malinowsky, Bollner, Becker, 2010).

Foram realizados cortes com 3µm de espessura sobre lâminas para que o tecido não se destaque da lâmina durante as etapas da técnica. Após 24h numa estufa a 37°C procedeu-se à sua montagem de forma manual ou em equipamento próprio para imunohistoquímica, parte do trabalho foi realizado no “Bond Polymer Refine Detection™” (DS9800; Leica Biosistema, NovaCastra Ltd, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante do BOND-MAX™ (Leica Biosistema, NovaCastra Ltd, Reino Unido). Os anticorpos-primários utilizados neste aparelho foram: Oct3/4, Lp34, AE1/AE3, Ck7, TTF-1, Vimentina; CDX2 e PLAP (Tabela V). As lâminas são colocadas no aparelho referido, e todo o processo, desde a desparafinização e hidratação, recuperação do antigénio, inibição da peroxidase endógena, incubação com o anticorpo primário (e a respetiva diluição), incubação com o anticorpo secundário (dependendo do anticorpo primário as condições podem alterar, ver Tabela V), revelação com DAB e o contraste com HE é feito pelo BOND-MAX™.

Após a concretização das etapas anteriores, as lâminas são colocadas em água corrente durante cerca de 10 minutos e de seguida desidratadas no aparelho Tissue-Tek DRS 2000. Por último procedeu-se à montagem das lâminas com Entellan no aparelho Tissue-Tek GLC. É de realçar que todas as lâminas são incubadas à temperatura ambiente, e em simultâneo utilizados os controlos positivos e negativos adequados.

Apenas foi realizada imunohistoquímica manualmente para o anticorpo primário Nanog, e aplicou-se o seguinte protocolo: desparafinização e hidratação das lâminas: Há que ter em atenção que se houver resíduos de parafina o processo de coloração pode ficar comprometido, podendo as lâminas após coloração possuírem demasiado “background”, isto é, um fundo que irá dificultar o visionamento da coloração. Este processo pressupõe diversas etapas. Primeiro mergulham-se e agitam-se as lâminas numa solução de xilol para retirar a parafina. Este procedimento é repetido mais duas vezes em solução de xilol, mas em tinas diferentes, para se garantir a remoção total da parafina. Posteriormente inicia-se a reidratação dos tecidos colocando as lâminas em soluções de concentrações decrescentes de etanol (100%, e 95% v/v), sendo que se mergulham as lâminas duas vezes na mesma concentração de álcool mas em tinas diferentes. O processo de reidratação é terminado com a passagem das lâminas em água corrente, e posteriormente mergulham-se as lâminas em água destilada. É muito importante que a concentração do etanol seja correta, para que a reidratação dos tecidos seja gradual evitando-se assim danos nos tecidos.

A recuperação de antigénio é feita pela ação do calor com citrato de sódio a pH=6, no microondas a 750 Watts durante 20 minutos. Este passo serve para quebrar as ligações criadas entre proteínas durante a fixação, e expor assim os locais específicos do antigénio para que o anticorpo se possa ligar a este. Imediatamente a seguir deixa-se arrefecer lentamente e lava-se com PBS (*phosphate buffered saline* - Tampão fosfato-salino). De seguida inibe-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio a 3% durante 15 minutos. Esta enzima está presente em muitas células humanas, e tem a capacidade de reagir com o DAB. Uma vez que este é o método que pretendemos utilizar para revelação da ligação do anticorpo primário ao secundário teremos inevitavelmente que inibir a enzima, para evitar que se ligue ao substrato (DAB),

dando-nos assim um falso positivo. Estando a enzima inativa, volta-se a lavar com PBS. O passo seguinte é a incubação com soro normal de cabra (Ultra V Block, ref:TA-125-UB, Thermo scientific California) durante 5 minutos. Após este intervalo de tempo, lava-se com PBS novamente. De seguida incuba-se durante a noite a 4°C com o anticorpo primário anti-nanog com uma diluição de 1:800. As diluições são feitas com UltraAB Diluente, (ref: TA-125-UD, Thermo scientific Califórnia). No dia seguinte, lava-se com PBS e posteriormente coloca-se o anticorpo secundário biotilado (cabra antipolivalente, ref: TP-125-BN, Thermo scientific California) e deixa-se a incubar durante 15 a 20 minutos. Lava-se mais uma vez com PBS e incuba-se com Streptavidina com peroxidase (ref: TS-125-HR, Thermo scientific Califórnia) durante 15 a 20 minutos. Após nova lavagem com PBS, e revela-se a marcação antigénio/anticorpo com DAB (DAB substrato Buffer, ref: RE7106, Leica 800µ e DAB Cromogénio Ref: RE7105, Leica 50µL) durante 5 a 10 minutos. O substrato é degradado pela enzima quando ocorre a ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário. Lava-se novamente com água corrente, para parar a reação do DAB. As lâminas são contrastadas com Hematoxilina de Mayer e desidratadas no aparelho Tissue- Tek DRS 2000. Seguidamente são montadas com Entellan no aparelho Tissue-Tek GLC.

A intensidade da coloração foi avaliada em quatro valores (0, 1, 2, 3). Sendo que 0 significa que não existem células coradas, 1 representa menos de 10% de células coradas, 2 a existência de 10 a 50% de células marcadas e 3 quando estavam mais de 50% de células coradas. A percentagem de marcação por imunohistoquímica nas células foi registada para posterior análise quantitativa dos resultados.

Também recorreremos à histoquímica para aplicar a técnica de PAS (ácido periódico de Schiff), este reagente tem como objetivo demonstrar a presença de glicogénio e mucinas neutras. O PAS induz a produção de aldeídos nas substâncias

contendo carboidratos, pela oxidação com o ácido periódico e subsequente combinação dos aldeídos com o reagente de Schiff, obtendo-se uma coloração vermelha/magenta na presença de aldeídos.

Para a técnica do PAS, o primeiro passo é desparafinizar as lâminas. De seguida os cortes são lavados com água e procede-se à oxidação com ácido periódico de Schiff a 1% durante 10 minutos. Após este período as lâminas foram colocadas numa tina com água corrente durante 5 minutos. O passo seguinte, a coloração com o reagente de Schiff, necessita de atuar 30 minutos. De seguida as lâminas foram colocadas no aparelho Tissue- Tek DRS 2000, para lavagem e contraste com Hematoxilina de Gill durante 3 minutos. As lâminas foram lavadas com água corrente durante 5 minutos e por fim, desidratadas para montagem com Entellan (resina) no aparelho Tissue –Tek GLC.

Tal como para a imunohistoquímica, a intensidade da coloração foi semi-quantificada em quatro pontos (0, 1, 2 e 3) e a percentagem de marcação nas células foi registada numa tabela, tal como os restantes resultados com possível interesse.

O programa estatístico utilizado foi o “IBM SPSS Statistics 19”, e recorreu-se aos testes mais adequados para o tratamento dos nossos dados.

Capítulo III

Resultados e Discussão

6. Resultados e discussão

6.1. Incidência dos tumores de células germinativas consoante a idade e o género

Estudos indicam que a incidência dos tumores de células germinativas varia consoante a idade e o género (Ulbright, 2005). De facto o gráfico presente na Figura 14 mostra que existe uma maior incidência de TCG em indivíduos do género masculino com idades compreendidas entre os 21 e 30 anos. Já no género feminino, a maior incidência é entre os 31 e 40. Verificou-se também que ao longo das faixas etárias há uma diminuição da incidência destes tumores em ambos os géneros. O que também verificamos é que o aparecimento destes tumores é numa idade mais precoce nas mulheres do que nos homens. No género masculino existe concordância com a literatura, onde está descrito que os tumores de células germinativas incidem sobretudo em homens adultos (Neto, *et al.*, 2002; Pottern & Goedert, 1986). No entanto o mesmo não acontece no caso das mulheres, uma vez que segundo a literatura estes tumores têm uma prevalência superior em mulheres jovens (cerca dos 20 anos) e nos dados recolhidos para este trabalho, a incidência maior está no grupo de mulheres entre os 31 e 40 anos de idade. Uma das explicações para esta discrepância pode ser o facto da amostragem ser em número muito reduzido (só foram analisados 17 casos). Outra explicação pode ser o facto de grande parte dos estudos que foram feitos terem sido há alguns anos atrás, isto porque muitos destes tumores só são descobertos aquando de uma gravidez (uma vez que em grande parte das situações são tumores assintomáticos e são descobertos durante uma ecografia por exemplo), e como a primeira gravidez da mulher é cada vez mais tarde, isso vai influenciar a idade do diagnóstico para TCG.

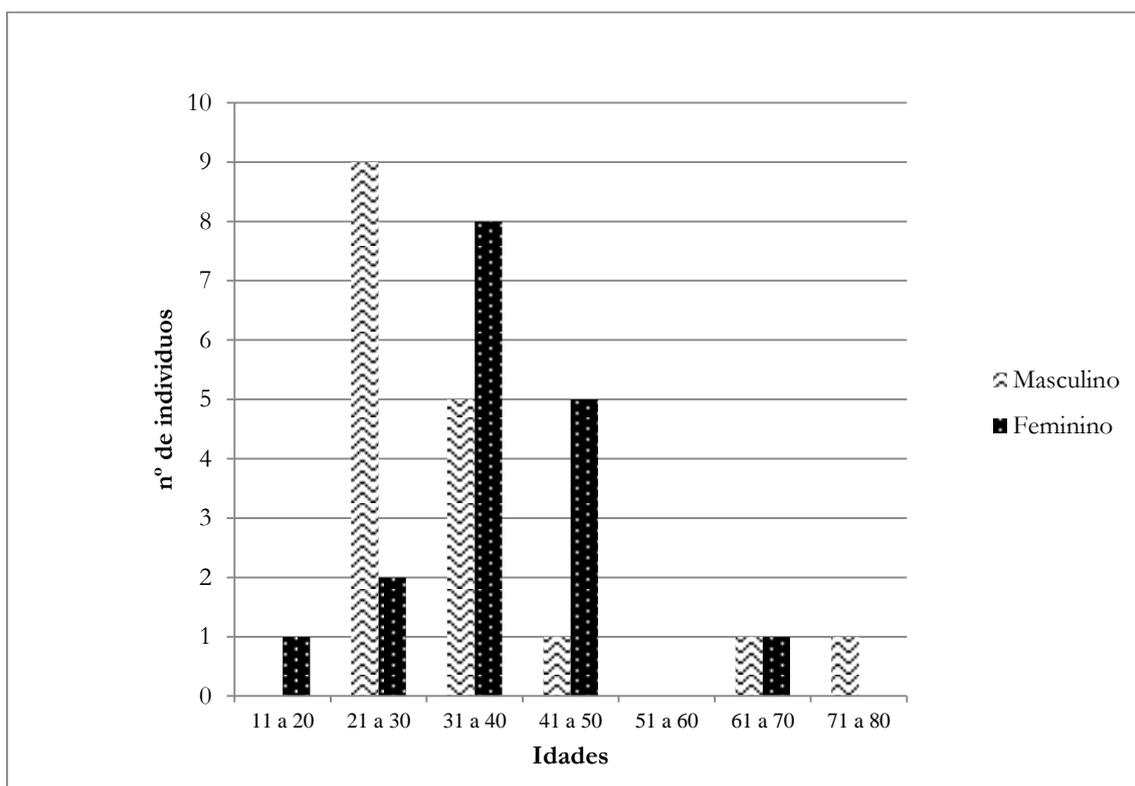


Figura 14- Gráfico representativo da incidência dos TCG consoante o género e a idade dos indivíduos.

Na Figura 15 pretendeu-se verificar qual o tumor mais incidente em cada grupo etário. Para isso, dividimos os TCG em teratomas maduros, tumores imaturos (incluiu-se qualquer tumor que fosse imaturo) e TCG mistos. Neste último grupo foram considerados todos os casos em que o indivíduo possuía mais do que um tipo de tumor, independentemente da sua tipologia (seminoma/disgerminoma, carcinoma embrionário ou *struma ovarii*). Verificou-se que existe uma prevalência de TCG maduros nos grupos etários dos 21 aos 30 e dos 31 aos 40. Estes resultados vão de encontro com o esperado, atendendo aos resultados da Figura 14, havendo depois um decréscimo acentuado com o aumento da idade. As discrepâncias podem dever-se, tal como na Figura 13, ao facto de o número de indivíduos estudados ser reduzido, apenas 34 casos, a estar confinada a uma região do país e ainda por ser um período pequeno de análise (2005 a 2010).

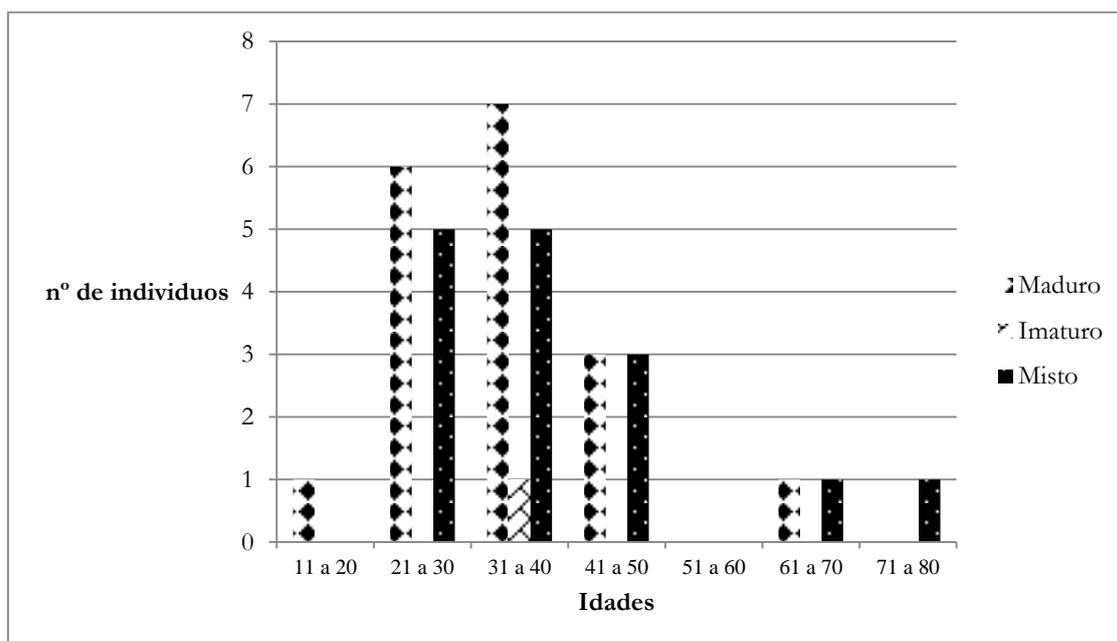


Figura 15- Gráfico representativo da prevalência do tipo de TCG consoante a idade dos indivíduos.

De seguida, analisaram-se os dados relativamente à incidência do tipo de TCG consoante o género do indivíduo mas tendo em consideração apenas os TCG gonadais (Figura 16). Mais uma vez, os resultados não estão de acordo com a literatura (Ulbricht, 2005). Analisando em primeiro lugar os teratomas maduros, era esperado uma menor incidência no género masculino, uma vez que segundo a literatura este só existe numa proporção de 4% nas gónadas masculinas. No entanto, nos dados analisados o teratoma maduro é o TCG mais presente no género masculino. O mesmo se verifica com o carcinoma embrionário, que deveria ter uma incidência inferior ao seminoma (Ulbricht, 2005). Em relação ao *struma ovarii*, tal como esperado, este não tem incidência neste género. Nas mulheres, de acordo com a literatura, o TCG mais comum é o teratoma maduro. No entanto, de acordo com a literatura (Ulbricht, 2005), o segundo tumor que era esperado ter maior prevalência seria o disgerminoma, e em nenhum dos 17 casos estudados foi encontrado um tumor deste tipo. As explicações para estes resultados podem ser o facto da amostragem ser demasiado pequena, estar confinada a uma região

do país e ainda ter um intervalo de análise de dados pequena (dados de 2005 até 2010), como é apresentado nas duas figuras anteriores.

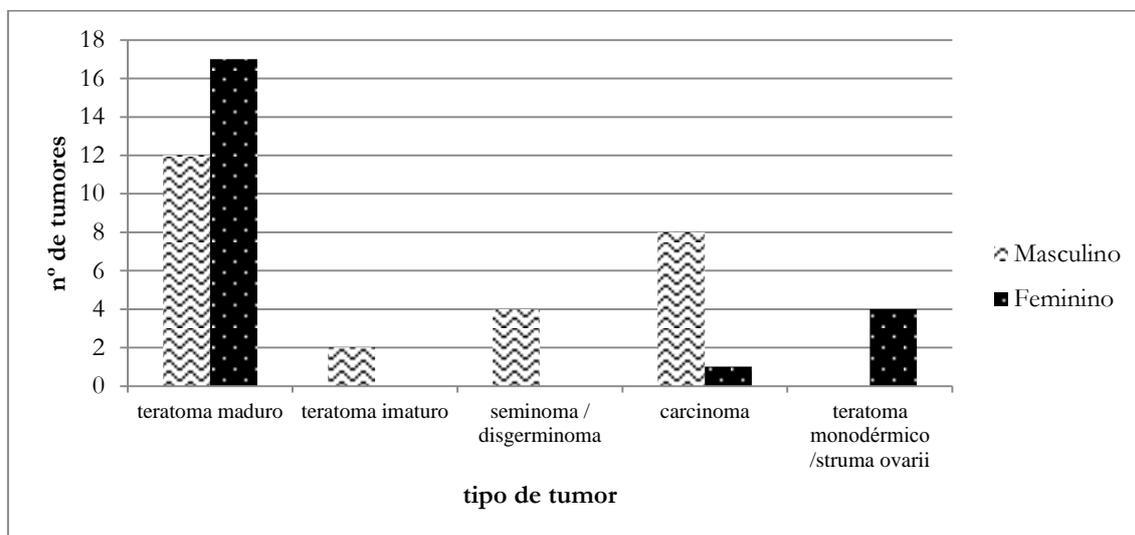


Figura 16- Gráfico representativo da prevalência dos tipos de TCG gonais consoante a idade e o género dos indivíduos.

6.2. Análise de marcadores e linhagem celular

Existe uma associação íntima entre a linhagem celular e a carcinogénese, sugerindo mecanismos comuns entre a linhagem celular e a progressão/sobrevivência do tumor. Vários estudos apoiam a ideia de que a tumorigénese pode servir de modelo à diferenciação celular (p.e. Myong, 2003). Com este trabalho pretendemos estabelecer como será a linhagem celular do desenvolvimento embrionário, quais as proteínas que estão presentes e se encontram num estado mais primário ou mais diferenciado no embrião, partindo da análise de diferentes TCG. Esta será a melhor maneira de perceber como se desenvolve a embriogénese e histogénese humana, uma vez que eticamente não se podem estudar os embriões humanos e grande parte do que foi feito até agora foi obtido através do estudo de embriões de mamíferos, nomeadamente de ratinhos (p.e. Pereira, Yi, Merrill, 2006; Pan, Thomson, 2007).

6.3. Embriogénese

As proteínas mais primitivas que pretendemos estudar são a vimentina, Oct3/4 e Nanog. O Oct3/4 é um fator de transcrição, que está incluído na família POU, por isso também vulgarmente conhecido por *Pou5f*. Este tem um papel importante na regulação da pluripotência durante o início do desenvolvimento embrionário dos vertebrados (Morrison & Brickman, 2006). A expressão do Oct3/4 encontra-se normalmente confinada às células pluripotentes do desenvolvimento embrionário, incluindo as células do epiblasto e as células germinativas primordiais. O Oct3/4 é expresso exclusivamente em células embrionárias durante a embriogénese, sendo que a sua expressão baixa durante o estado de gastrulação, quando se começam a definir as linhagens somáticas (Boiani & Scholer, 2005). O padrão de expressão desta proteína no desenvolvimento embrionário e recém-nascidos sugere que a manutenção e sobrevivência das células estaminais são dependentes deste fator. Como tal, a supressão deste fator leva à perda de pluripotência das células estaminais no início da vida embrionária, mostrando a sua clara envolvimento na manutenção de células estaminais pluripotentes (Nichols, *et al.*, 1998). Em relação aos indivíduos no estado adulto, a expressão desta proteína está confinada à linhagem de células germinativas (Boiani & Scholer, 2005). Também através da literatura sabemos que Oct3/4, é constituído por duas isoformas, POU5F1_iA e POU5F1_iB, ou Oct-3A ou Oct-3B respetivamente (Takeda, Seino, & Bell, 1992). Estas subunidades apresentam diferenças na sua expressão, quer de forma espacial quer temporal, sendo que a primeira isoforma está claramente presente no núcleo e a segunda no citoplasma (Takeda, *et al.*, 1992). De facto o Oct-3B não está presente aquando a expressão de Oct-3A, isto é, quando há marcação nuclear e não há citoplasmática, mas quando existe marcação citoplasmática, existe também nuclear. Além disso, sabe-se que o Oct-3A é expresso em células estaminais embrionárias humanas o que não acontece

com a segunda subunidade (Takeda, *et al.*, 1992). Isto leva a crer que a primeira subunidade marca células num estado mais indiferenciado do que a segunda, mesmo sendo células estaminais indiferenciadas que apresentam graus diferentes de pluripotência (Cauffman, Liebaers, Van Steirteghem, Van de Velde, 2006). Também através de estudos anteriores sabe-se que o Oct3/4 é um marcador nuclear soberbo na marcação de seminomas e carcinomas embrionários, uma vez que apresenta elevada sensibilidade e especificidade para estes dois tumores (Rodney & Miller, 2007). No nosso estudo verificamos que nos seminomas existe marcação só nuclear de Oct3/4 (Figura 17), mas quando a marcação é feita em carcinomas embrionários, Oct3/4 tem uma marcação nuclear e citoplasmática (Figura 18). Portanto, pensa-se que os seminomas são TCG mais indiferenciados que os carcinomas embrionários, porque, como foi referido já, a marcação nuclear e citoplasmática revela uma maior diferenciação de células em relação às que só apresentam marcação nuclear. Devido a esta marcação, podemos sugerir que estes tumores têm diferentes graus de diferenciação, sendo que o seminoma será um TCG com maior diferenciação em relação ao carcinoma. Esta maior diferenciação é também sugerida pela maior desorganização celular que é observada mesmo quando se recorre apenas a HE. Uma vez que as diferenças na marcação com oct3/4 são claramente diferentes a nível espacial, este marcador poderá futuramente ser utilizado para a distinção deste dois tipos de tumores.

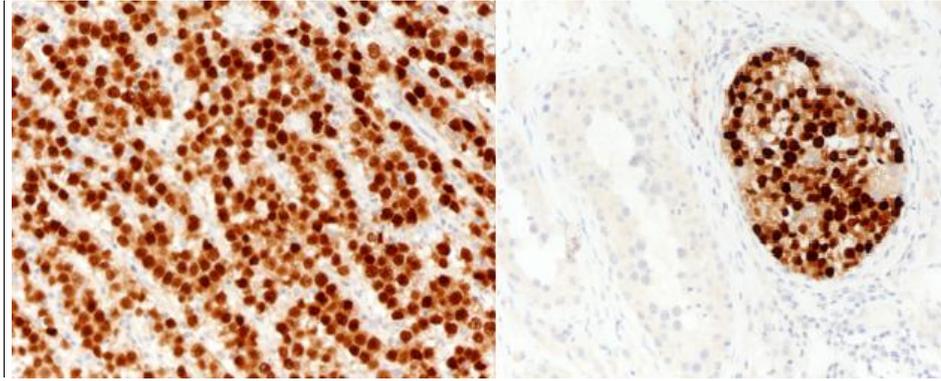


Figura 17- Imagens de um TCG masculino do tipo seminoma, com marcação nuclear para Oct3/4, obtidas por imunohistoquímica. Ambas as imagens estão numa ampliação total de 200x.

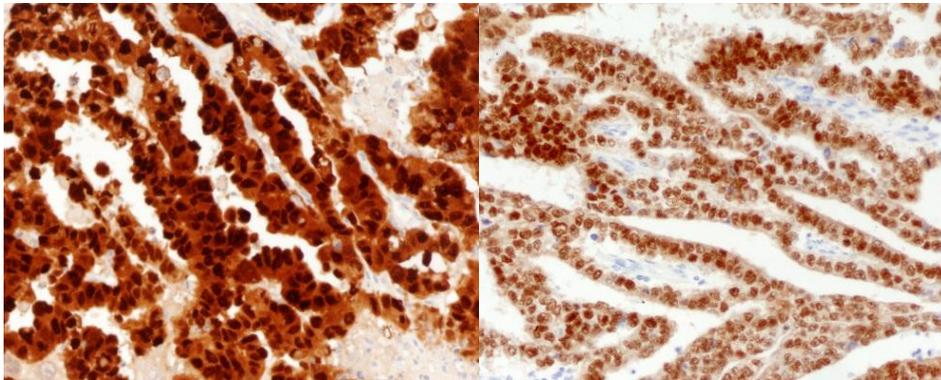


Figura 18- Imagens de um TCG masculino do tipo carcinoma embrionário, com marcação nuclear e citoplasmática para Oct3/4, obtidas por imunohistoquímica. Ambas as imagens estão com uma ampliação total 200x.

O Nanog (que em gaélico significa “**terra dos sempre jovens**” tirado da frase - *'Tir Nan Og'*) é um gene altamente divergente que contém um homeodominio com papel central na transcrição (Boyer, *et al.*, 2005; Cole, Johnstone, Newman, Kagei, Young, 2008; Loh, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2006). Esta proteína tem extrema importância no desenvolvimento embrionário (Mitsui, *et al.*, 2003), é expresso em células pluripotentes embrionárias, células derivadas de células embrionárias e no desenvolvimento germinal dos mamíferos (Chambers, *et al.*, 2003). É comum encontrar que este gene com a designação de “maestro de uma orquestra”, porque possui um papel de extrema importância na regulação do destino das células pluripotentes durante

o desenvolvimento embrionário, ainda no estado pluriblasto, na manutenção da pluripotência no epiblasto e previne a diferenciação da endoderme primitiva (Chambers, *et al.*, 2003; Silva, *et al.*, 2009). Através de estudos feitos anteriormente a este, verificou-se também que a proteína em causa pode ser um fator específico do epiblasto (Silva, *et al.*, 2009). Por isto, pensa-se ser uma proteína presente nos estados mais iniciais do desenvolvimento (a primeira de todas a que utilizamos, se tentarmos colocá-las por ordem cronológica do seu aparecimento no desenvolvimento embrionário). E os nossos resultados estão de acordo com isto, uma vez que verificamos que o Nanog, que deverá estar presente num estado mais indiferenciado antes de qualquer outro marcador que tenhamos usado, se encontra em TCG seminomas. A marcação encontra-se num mesênquima desorganizado mostrando ser bastante imaturo (Figura 19). Para além disso as espermatogónias (células que originam os espermatozoides, Figura 20) que estavam presentes nos tumores estudados também apresentam marcação para o Nanog. Estas são células que ainda estão em multiplicação, não sendo muito diferenciadas, apesar de já possuírem informação de que irão originar espermatozoides. Se compararmos a marcação destas, e correlacionarmos com o facto de o Nanog ter marcação positiva, leva-nos a pensar que os seminomas mais indiferenciados são originários a partir de células que possivelmente iriam originar espermatogónias, caso não tivesse ocorrido um erro na sua diferenciação. Possivelmente, houve algum acontecimento que fez com que o Nanog continuasse ativo, permitindo que as células do seminoma se mantivessem indiferenciadas e com capacidade pluripotente. Esse erro pode ter sido a ausência de um inibidor, por exemplo o ácido retinóico, que iria fazer com que o Nanog ficasse inativo. Para se poder ter a certeza, deveria recorrer-se a um teste para verificar a presença deste ácido nos mesmos tecidos em que o Nanog supostamente está ativo e já não deveria estar. Ao nível da organização celular, os seminomas positivos para Nanog têm o

mesenquima mais desorganizado que os positivos para Oct3/4, mostrando que a proteína Oct3/4 surge posteriormente ao Nanog. Mas também temos carcinomas embrionários com positividade para Nanog (Figura 21). Isto pode significar dois acontecimentos, ou que os carcinomas embrionários possam surgir a partir dos seminomas (o que não é totalmente estranho, uma vez que é muito comum estes dois tumores estarem associados, e têm uma aparência histológica semelhante), ou que tecidos do carcinoma embrionário possam ser muito precoces, e que ao longo do tempo poderão diferenciar-se mais e tornar a estrutura mais organizada, apresentando uma histologia tipicamente do carcinoma. A marcação para este gene surge em casos raros, o que se prevê ser devido a que os tumores em que o Nanog foi positivo são mesmo muito primordiais em termos de desenvolvimento. De facto, verificou-se que esta marcação é restrita e se repetiu apenas em dois/ três casos. Por isso, pensa-se que o Nanog poderá ser um marcador, com indicador de TCG muito primordial e futuramente poderá ser utilizado como marcador pré-neoplásico (sugere a possibilidade de se formar uma neoplasia).

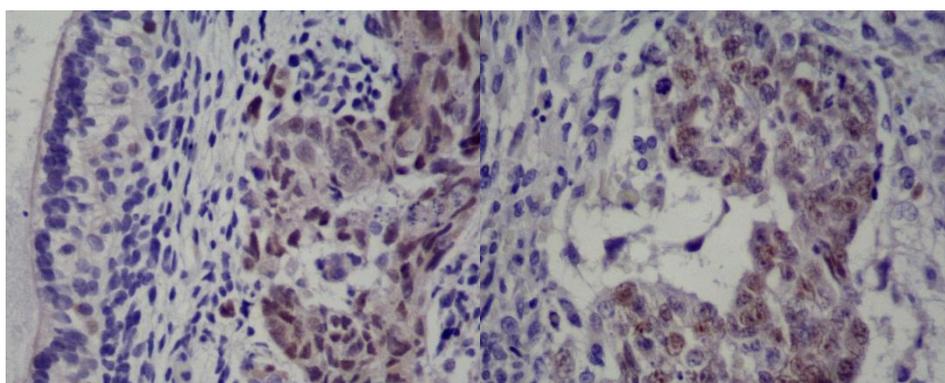


Figura 19- Imagem de um TCG masculino do tipo seminoma que apresenta mesenquima imaturo, com marcação para Nanog. Ampliação total de 400x.

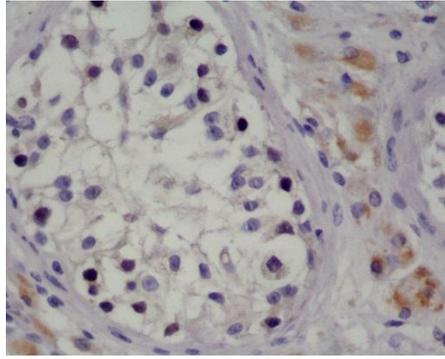


Figura 20- Imagem de um TCG masculino com marcação positiva de Nanog em espermatogónias. Ampliação total de 400x.

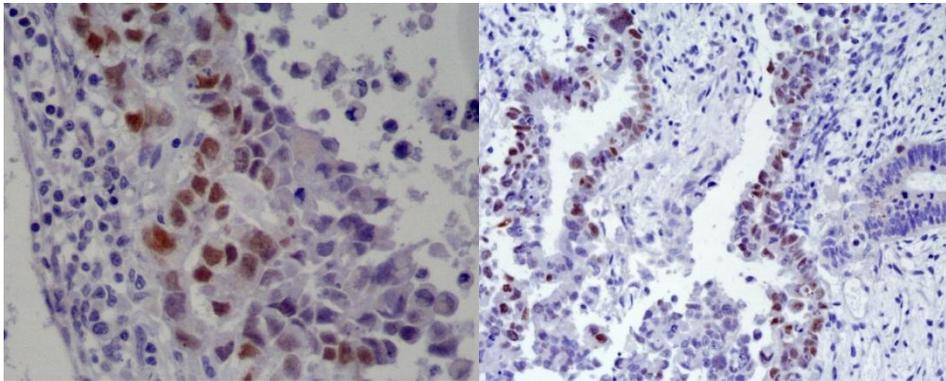


Figura 21 - Imagem de um TCG masculino do tipo carcinoma embrionário com marcação positiva de Nanog. Imagem da esquerda com ampliação total de 400x e a imagem da direita uma ampliação total de 200x.

O último marcador a que recorreremos para marcação de estados de embriogénese foi a vimentina. A vimentina é um constituinte de filamentos intermédios, pertencente à classe III destes filamentos, e sabe-se que é expressa em células com origem mesenquimatosa ou por células epiteliais submetidas por transição mesenquimatosa (transição epitélio-mesenquima), encontrando-se no citoesqueleto destas (Franke, Schmid, Osborn, & Weber, 1978). Este filamento intermédio é formado por dois homodímeros unidos pelo domínio central, dando origem a dímeros. Os dímeros podem associar-se e formar tetrâmeros, que se reúnem em protofilamentos originando a vimentina propriamente dita (Hermann & Aebi, 2004). A vimentina tem funções

essenciais nas células, podemos referir a adesão celular, migração, sinalização celular, na ancoragem do núcleo das células e no posicionamento dos organelos no citoplasma (Henderson & Weber, 1980; Ivaska, Pallari, Nevo, & Erikson, 2007; Lazarides, 1980).

O anticorpo utilizado, apresenta uma marcação citoplasmática. A vimentina mostra-se positiva quer em epitélios mais imaturos (Figura 22), quer em alguns que se encontram num estado mais maduro (Figura 23). Em tecidos mais indiferenciados a vimentina encontra-se expressa permanecendo de forma focal e discreta em forma basais dos epitélios (Machado & Figueiredo, 1996). A vimentina localiza-se em tumores em que o Nanog também se expressou, o que nos indica que possivelmente a vimentina surge no momento embrionário similar ao Nanog, e posterior a este, uma vez que depois temos células com marcação para a vimentina sem expressão do Nanog (Tabela VI). Como tal, nos TCG estudados, a vimentina foi positiva num leque variado de tipos celulares, quer mesenquimatosos (maduros e imaturos, incluindo onde o Nanog se expressou), quer em células basais do carcinoma embrionário ou seminoma (Figura 24).

Assim interpretarmos o espetro da vimentina desde o início do desenvolvimento embrionário, com substituição posterior por outros filamentos intermédios, possivelmente a desmina, que é um filamento intermédio da mesma classe e sabe-se que esses dois filamentos se intercalam entre si no entanto, existem resultados que defendem que estes dois filamentos coexistem (Machado & Figueiredo, 1996) e verificamos ainda que se intercalam, isto é, a vimentina está expressa num estado mais precoce do desenvolvimento enquanto a desmina num estado em que as células atingem mais diferenciação (Machado & Figueiredo, 1996). Uma possibilidade para este facto seria intercalação da expressão vimentina com a desmina; Seria preciso recorrer a um anticorpo específico para a desmina, de modo a poder confirmar essa a hipótese levantada. Outra hipótese para ocorrência desta característica pode ser porque a

vimentina tem funções essenciais nas células (que já foram referidas anteriormente), e as células mais primordiais terem uma especial necessidade para que a vimentina esteja ativa a manter o equilíbrio nas células indiferenciadas, e que ao longo da proliferação celular não seja necessário e só volte a ser, mesmo que em menores quantidades quando as células estão diferenciadas (inflamações, infecções, etc.).

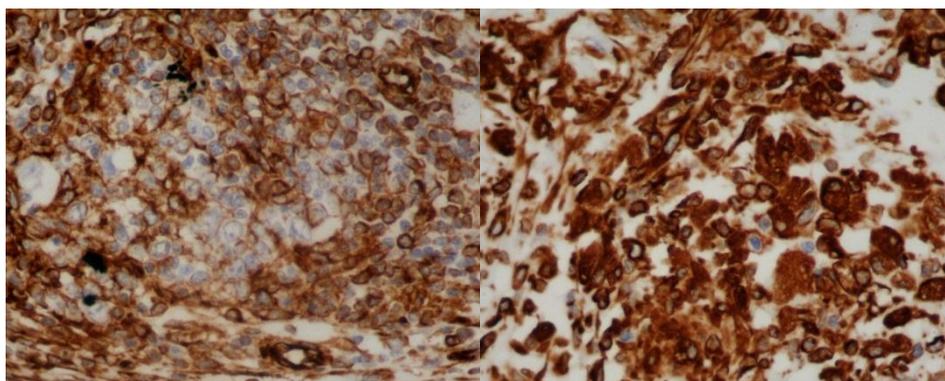


Figura 22- Imagem de mesenquima imaturo num TCG masculino com marcação positiva para a vimentina. Ampliação total de 400x.

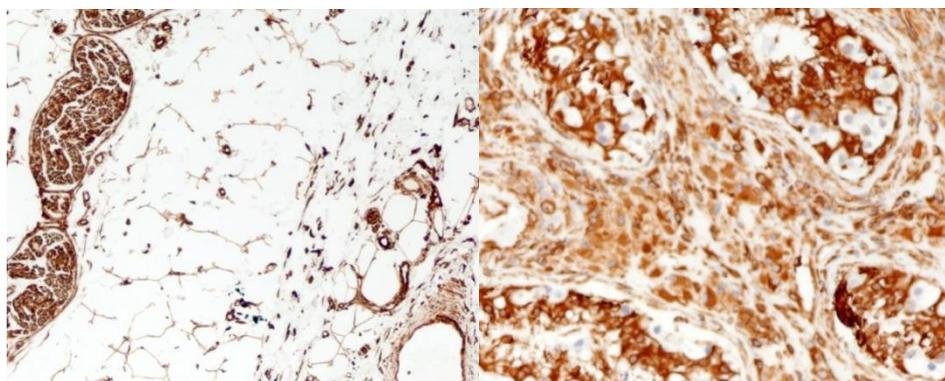


Figura 23- Imagem de mesenquima maduro num TCG masculino com marcação positiva para a vimentina. Ampliação total de 400x.

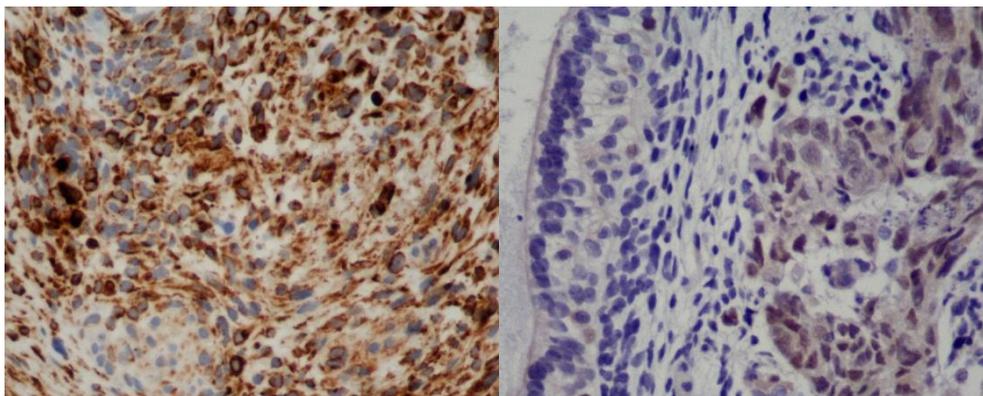


Figura 24- Imagem de um mesenquima imaturo de um TCG masculino no testículo com marcação positiva para a vimentina (imagem à esquerda) e para o Nanog (imagem à direita). Ampliação total de 400x.

Tabela- VI-Registo do número de casos com marcação de vimentina e Nanog nos mesenquimas.

		Número de casos	
		<u>Mesenquima maduro</u>	<u>Mesenquima imaturo</u>
Tipo marcador	<u>Vimentina</u>	19	12
	<u>Nanog</u>	0	3
	<u>Vimentina e Nanog</u>	0	3

Na Tabela VI estão registados o número de casos onde houve marcação para Vimentina e Nanog em separado, e onde marcavam os dois em simultâneo. É de realçar que podem existir tumores com só dois tipos de mesênquima.

6.4. Organogénese

O CDX2 é um fator de transcrição, codificado por um gene *homeobox*, que guia o desenvolvimento do epitélio intestinal desde o duodeno até ao reto, tendo uma função essencial no controlo do normal desenvolvimento embrionário CDX2 é crucial na padronização axial no trato intestinal durante o desenvolvimento embrionário e está envolvido nos processos de proliferação celular intestinal, diferenciação, adesão e

apoptose. Sabe-se que também está relacionada com a regulação da expressão da MUC2 (mucina secretora capaz de produzir muco). No interior da célula o CDX2 tem a função de induzir a diferenciação e inibir os níveis de genes que proporcionam a proliferação (Mizoshita, *et al.*, 2001). Durante o desenvolvimento embrionário esta proteína está presente, quer no intestino delgado, quer no grosso. Em animais adultos, incluindo nos Humanos, também é expresso mas só em células epiteliais intestinais, estando envolvido na regulação da proliferação e diferenciação das células, e relacionado com fatores de malignidade (Moskaluk, *et al.*, 2003; Saad, *et al.*, 2011). Ao nível da expressão nas neoplasias, o CDX2 é expresso em especial nas que têm diferenciação intestinal independentemente da sua origem (podendo estar na presença de um tumor que não é primário) e estado de malignidade (Moskaluk, *et al.*, 2003; Lott, Morrison, Suster, Cohn, & Frankel, 2005; Saad, *et al.*, 2011;). Vários estudos defendem que este será um bom marcador para diferenciação intestinal em tecidos neoplásicos e metaplásicos. O anticorpo para CDX2 tem expressão nuclear, é sensível e específico para alguns tipos de carcinomas e adenocarcinomas (Moskaluk, *et al.*, 2003; Saad, *et al.*, 2011). Nos TCG estudados neste trabalho, verificamos que este marcador está presente nos tumores mais indiferenciados (seminoma e carcinoma embrionário, Figura 25 e 26), o que nos indica que estes tinham tecido intestinal em diferenciação. É clara e explícita a marcação do CDX 2. Através da análise das imagens verificamos que há zonas em que há uma súbita paragem de marcação, o que nos indica que só parte da estrutura marcada tem células intestinais, e que as restantes, apesar de terem a mesma origem, não apresentam características intestinais.

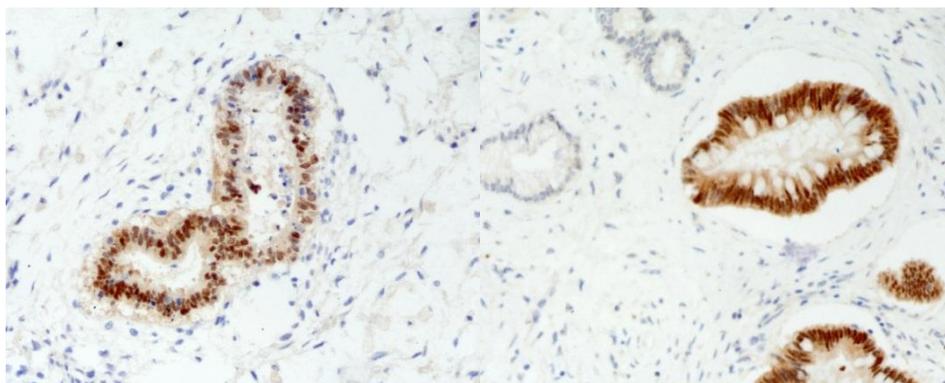


Figura 25- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação positiva para o CDX2. A imagem da esquerda é de um carcinoma e a da direita de um seminoma. Ampliação total de 200x.

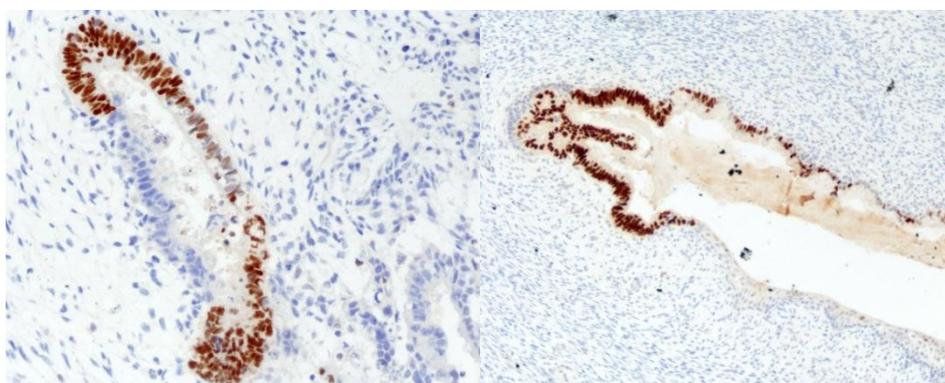


Figura 26- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação positiva para o CDX2, em ambas se verifica uma interrupção de marcação do CDX2. Ampliação total de 400x imagem da esquerda e 100x na imagem da direita.

O outro marcador utilizado para categorizar a organogênese foi o TTF1. O TTF1 é um fator de transcrição essencial à morfogênese e diferenciação do pulmão, tireoide e de algumas regiões restritas do sistema nervoso central, como tal tem um papel importante no desenvolvimento embrionário e diferenciação. O gene é expresso durante a morfogênese do pulmão, ao longo do desenvolvimento fetal do pulmão e, está envolvido também na regulação do surfatante, entre outras funções. Em indivíduos pós-natal a expressão do gene ocorre nas células alveolares do tipo II (Ikeda, *et al.*, 1995; Kaarteenaho, Lappi-Blanco, Lehtonen, 2010) e subconjuntos de células epiteliais bronquiais não ciliadas (Broggaram, 2009; Kaarteenaho, *et al.*, 2010; Myong, 2003). O

TTF-1 encontra-se expresso no início do desenvolvimento dos órgãos referidos anteriormente, o que faz acreditar ser de extrema importância no desenvolvimento e diferenciação dos mesmos. Por tudo o que foi referido anteriormente, existem autores que defendem que este pode ser um marcador molecular de diferenciação para neoplasias resultantes destes tipos de células (Myong, 2003).

Este marcador, também foi muito útil na marcação dos tumores estudados, porque permitiu essencialmente observar a localização do epitélio respiratório (4 camadas; Figura 27) e alveolar (2 camadas; Figura 28) sabe-se que estas estruturas só se formam num estado final da gestação. Pela literatura sabe-se que o intestino anterior e o pulmão (tecido muscular liso que reveste todo o epitélio respiratório), são ambos tecidos originários da mesoderme, podendo explicar a existência de estruturas em que a marcação para TTF1 intercala com a marcação do CDX2 (Figura 29). Existem estruturas em que se vê claramente onde termina o epitélio intestinal e o pulmonar através destes marcadores, o que vem de acordo com a literatura, da origem comum (camada mesodérmica) destes dois órgãos (Gonçalves & Bairos, 2010; Junqueira & Carneiro, 2004), mas depois sofreram uma diferente diferenciação. A marcação do epitélio respiratório pelo TTF1 ocorre num estado mais primário. Quando este epitélio se começa a diferenciar a marcação fica restrita aos alvéolos (tal como acontece nos adultos). As estruturas alveolares estão com uma organização semelhante aos indivíduos no estado adulto (Figura 30). Se tentarmos comparar as estruturas nos TCG marcadas positivamente com este anticorpo, com as estruturas do indivíduo adulto verificamos que as semelhanças visuais são claras. Também existem tumores que têm epitélio do intestino, mas que não expressam CDX2, isto significa que o tecido está tão diferenciado que já não possui o fator de transcrição, e que não possui as células epiteliais que são referidas na bibliografia. Então isto pode sugerir que, no TCG, o

tecido chega a um estado em que não prolifera mais, pelo menos em relação ao intestino. Uma curiosidade em relação aos TCG do ovário que nós estudamos, é que nenhum dos tumores possui tecido intestinal, e como consequência não apresentam positividade para este marcador. No entanto apresentam tecido respiratório (com positividade só num caso). Estes dados indicam que apesar do tecido estar maduro, não está ainda diferenciado nas células epiteliais tipo II (células positivas para TTF1, no estado adulto). Há ainda um TCG o “*struma ovarii*” (Figura 31), que no caso dos tumores estudados e segundo a literatura apenas existe na mulher, em que este marcador apresenta positividade, uma vez que este tumor é essencialmente constituído por tecido tiroideo. A tiroide é a primeira glândula endócrina a ser formada, e inicia o seu desenvolvimento só no final da quarta semana de gestação, após grande parte dos outros tecidos se terem começado já a diferenciar (Gonçalves & Bairos, 2010). E nestes tumores, o TTF1 é sempre positivo, o que sugere que a tiroide tem uma origem comum ao epitélio respiratório e ao intestino anterior.

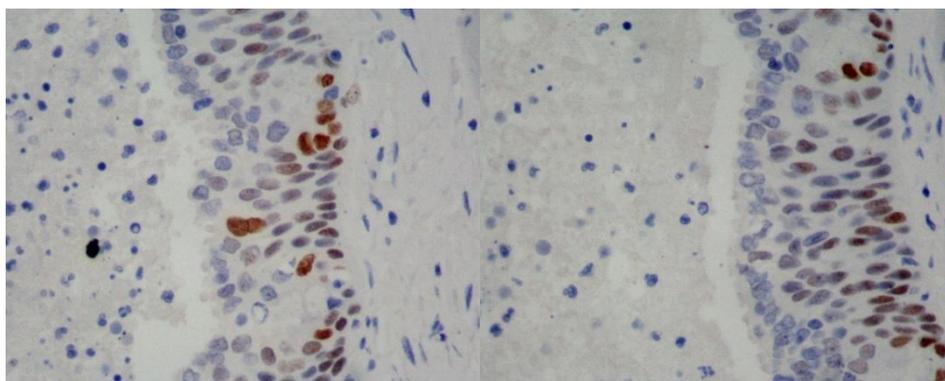


Figura 27- Imagem de um TCG masculino mediastino com marcação positiva para TTF1 nas células basais do epitélio respiratório. Ampliação total de 400x.

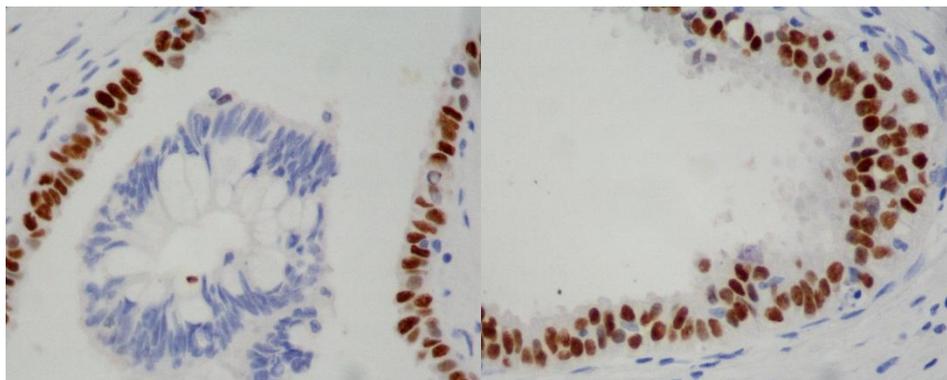


Figura 28- Imagem de um TCG masculino no mediastino com marcação positiva para TTF1 na bicamada celular do epitélio respiratório (alvéolos). Ampliação total de 400x.

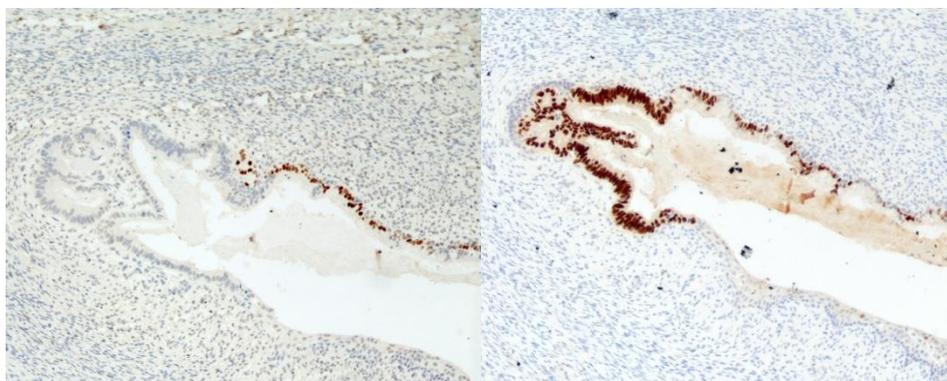


Figura 29- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação positiva para TTF1 (imagem à direita) e com marcação para CDX2 (imagem à esquerda). Ampliação total de 100 x.

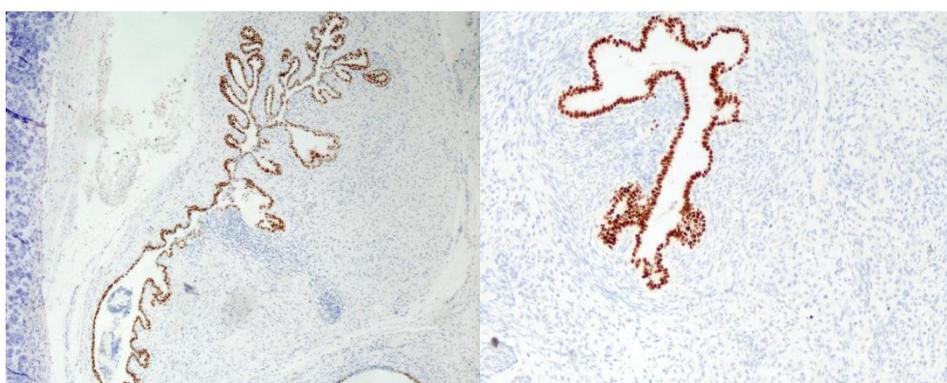


Figura 30- Imagem de um TCG masculino (imagem à esquerda no mediastino, e à direita no testículo), com marcação positiva para TTF1 em alvéolos. Ampliação total 40x.

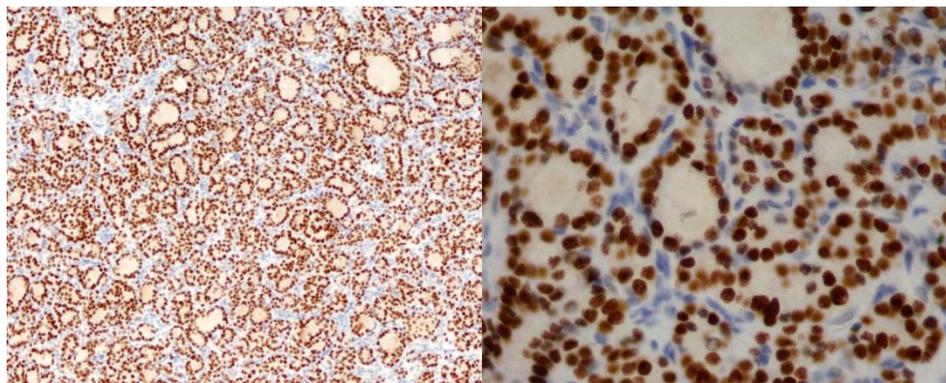


Figura 31- Imagem de um TCG do tipo “struma ovarii”, com marcação positiva para TTF1 em tecido tiroideo. Ampliação total 100x na imagem da esquerda, 400x imagem da direita.

O terceiro marcador a que recorreremos foi o PLAP (fosfatase alcalina placentar). A PLAP pertence a um grupo heterogêneo de glicoproteínas, existindo apenas em primatas superiores possuindo um elevado grau de polimorfismo genético. É sintetizada pelo trofoblasto e está elevada no soro de mulheres grávidas. Pode ser encontrada nos sinciotrofoblastos da placenta, após as oito semanas de gestação, nas trompas de Falópio e nas células germinativas primordiais. A PLAP tem sido encontrada em diversos tumores incluindo os tumores de células germinativas. É muito utilizada na detecção de seminomas e carcinomas embrionários, e por vezes em tumores do saco vitelino, sendo que numa percentagem menor comparativamente com os anteriores (Hoei-Hansen, *et al.*, 2007; Reuter, 2008). A marcação para esta fosfatase ocorre junto à membrana uma vez que a sua enzima tem atividade na membrana plasmática basal. A fosfatase alcalina pertence ao grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalizam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino (pH ótimo =10). Está amplamente distribuída nos tecidos Humanos, desde a mucosa intestinal, fígado, túbulos renais, baço, osso e placenta. Nos adultos origina-se essencialmente no fígado e no esqueleto (Leitner, *et al.*, 2001). Nas nossas amostras está presente nos seminomas, carcinomas embrionários e ainda no mesenquima maduro, mais propriamente no tecido

muscular liso (Figura 32). Não encontramos esta descrição na literatura e pensamos que o PLAP poderá ser importante como marcador primordial no desenvolvimento do tecido muscular liso visceral (seria importante pesquisar a sua expressão nos GISTs- *Gastrointestinal stromal tumours*). Porque o tecido muscular liso nos indivíduos adultos, tem a mesma origem que o intestino anterior e os seus derivados (mesoderme), e como foi referido anteriormente, a fosfatase alcalina, pode estar presente nas células mucosas do intestino, fígado, etc., então esta fosfatase de alguma forma está ligada aos tecidos originados a partir da mesoderme. Esta fosfatase é expressa em alguns TCG como seminomas e carcinomas embrionários (Figura 33). No caso dos carcinomas embrionários a PLAP marca papilas, tubos e no padrão sólido (Figura 34), e nestes casos a percentagem de células com fosfatase alcalina é superior. De um uma maneira geral, possivelmente a fosfatase alcalina está presente num estado indiferenciado (carcinoma embrionário), mas só em estruturas específicas e no mesenquima maduro, mais propriamente no músculo liso. Então, ou estas células tem uma origem comum, ou então a fosfatase alcalina volta a estar expressa num estado mais maduro em alguns tecido com origem mesodérmica.

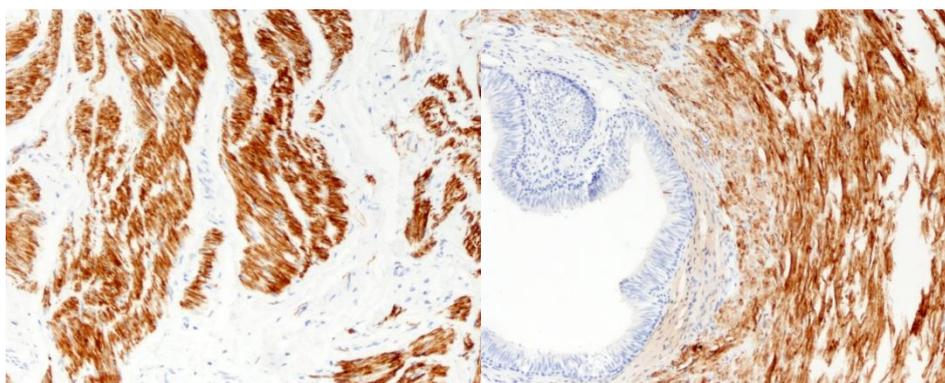


Figura 32- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação de PLAP no tecido muscular liso. Ampliação total de 100x.

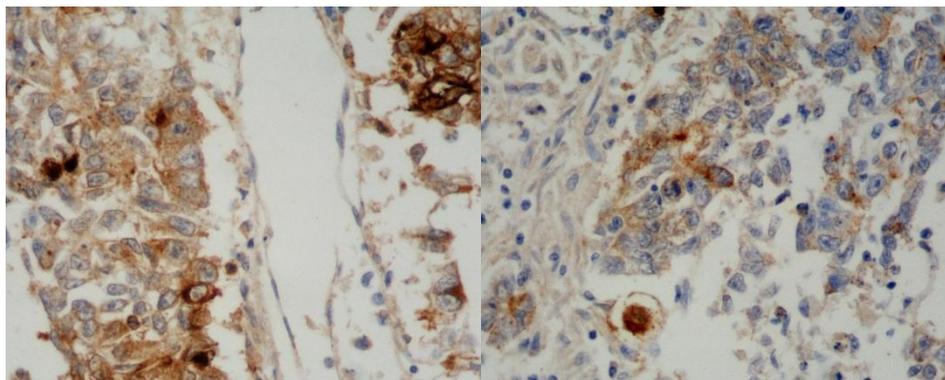


Figura 33- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação de PLAP no carcinoma embrionário (à esquerda) e no seminoma (à direita). Ampliação total de 400x.

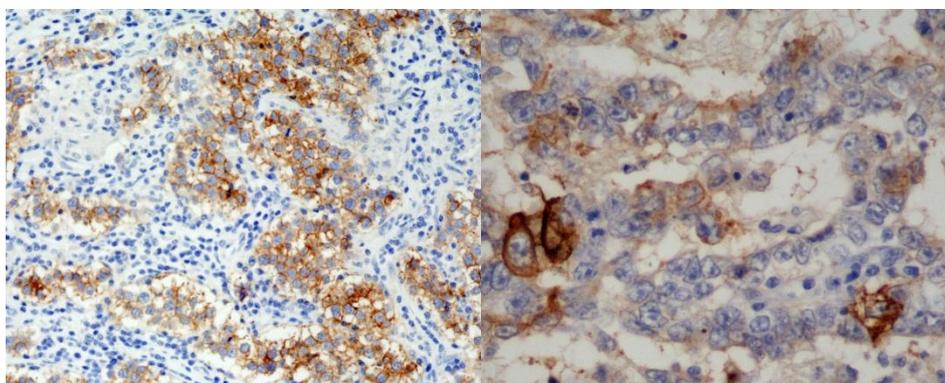


Figura 34- Imagem de um TCG masculino no testículo com marcação de PLAP no carcinoma embrionário. Ampliação total de 100x à direita, 400x à esquerda.

Fizemos ainda marcação com PAS (ácido periódico de schiff). O PAS é utilizado para demonstração da presença de glicogénio celular. O ácido periódico oxida a ligação carbono-carbono, formando aldeídos que reagem com o reagente de *schiff* formando a cor vermelha/magenta, na secção onde ocorreu a reação. Esta reação ocorre nas células capazes de produzir mucinas neutras. Este reagente como era esperado, reagiu em células que irão originar órgãos onde é produzido muco ou possuem glândulas (epitélio respiratório e intestinal e epiderme, Figura 35, 36 e 37). Para esta marcação existe consenso em quase todos os tumores, raramente apresenta positividade para além destes tecidos, mas nem em todos os tumores que possuem estas estruturas

são positivas para PAS, o que indica, que estes tecidos ainda não possuem o muco, ou porque não tem as respectivas glândulas ou porque elas ainda não têm maturação celular para produção de muco.

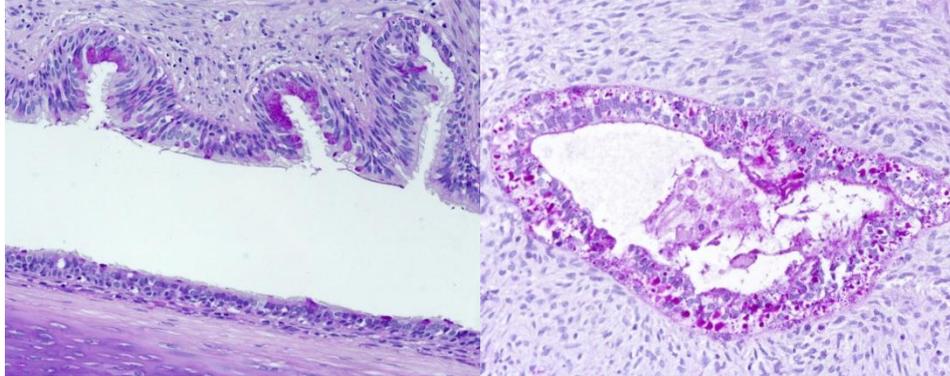


Figura 35- Imagem do TCG no ovário (á esquerda) com reação positiva para no PAS no epitélio respiratório e à direita TCG misto masculino. Ampliação total de 200x.

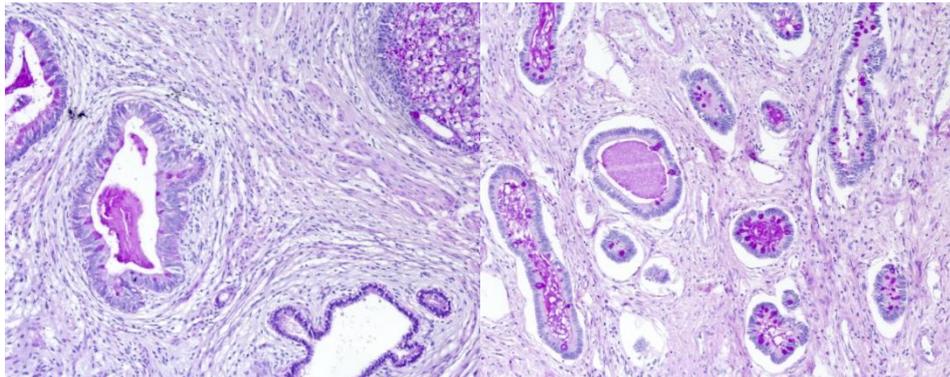


Figura 36- Imagem de um TCG masculino no testículo com reação positiva para no PAS no epitélio intestinal. Ampliação total de 400x (à esquerda) e 100x (à direita).

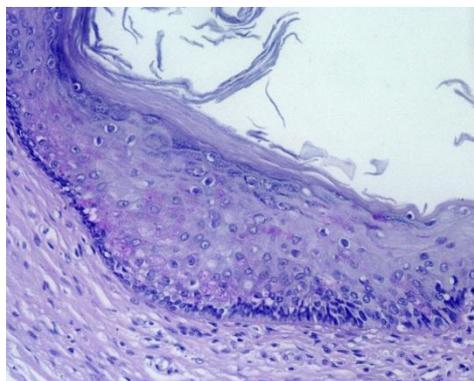


Figura 37- Imagem um TCG masculino no mediastino com reação positiva para PAS na epiderme, com uma ampliação total de 200x.

Por fim, recorreremos a anticorpos AE1/AE3 (Citoqueratinas 1 a 20), Ck7 (citoqueratinas 7) e Lp34 (citoqueratinas 5, 6 e 18) que se espera estarem em células de tumores mais diferenciados. Estes marcadores são para citoqueratinas (Ck). Estas proteínas são componentes de filamentos intermédios (tal como a vimentina, mas pertencentes a um grupo diferente) que estão presentes em quase todos os epitélios.

A expressão de cada uma das Ck depende do tipo de célula e do estado de diferenciação em que se encontra. As Ck foram catalogadas de 1 a 23, apresentando características distintas como o peso molecular e o p*H*, sendo que ao grupo I pertencem as citoqueratinas ácidas (9 a 23), e ao grupo II as citoqueratinas básicas (1 a 8; Coulombe & Omary, 2002). Estes filamentos encontram-se em todos os epitélios, mas cada Ck tem uma distribuição característica, sendo que por exemplo as Ck 1, 7 e 18 estão em epitélios simples e a 18 é a primeira a surgir no desenvolvimento embrionário a Ck 5 pode encontrar-se na epiderme com uma expressão basal em todos os epitélios estratificados, reage com proteínas que se encontram na maioria dos epitélios glandulares, transicionais e dos ductos do trato urinário e células epiteliais do ducto biliar (citopatológica). A Ck 6 está em células epiteliais em estado de hiperpolarização.

O Lp34 e o marcador AE1/AE3, para além do que já foi referido, têm especial utilidade na marcação de tecidos em diferenciação. Como tal este marcador pode ser útil na marcação de tumores malignos, nomeadamente em carcinoma. Por outro lado, o marcador para a Ck 7 pode ser uma ferramenta bastante útil para o histodiagnóstico de carcinomas e tumores com origem epitelial. A CK7 identifica a distribuição epitelial, permitindo avaliar de forma indireta a extensão da lesão inflamatória (Carvalho & Sousa, 2003). Estes marcadores abrangem um leque elevado de Ck, o que nos vai permitir perceber a origem celular das células de tecidos de TCG tal como o seu diagnóstico diferencial (Almeida, 2004).

No nosso trabalho verificamos que AE1/AE3 é muito pouco específica porque é positiva em quase todos os tecidos e TCG, não podendo ser usada para distinguir nem tecidos nem tumores. Este resultado já era de esperar uma vez que este marcador abrange grande parte das citoqueratinas atualmente conhecidas. A única conclusão que podemos obter com este anticorpo é que o tecido / TCG em estudo possui citoqueratinas (Figura 38). Na figura T podem ver-se três fotografias de diferentes epitélios (epitélio estratificado com quatro camadas, tubos e epiderme) verificando-se assim a panóplia de epitélios /zonas que o anticorpo em causa pode marcar.

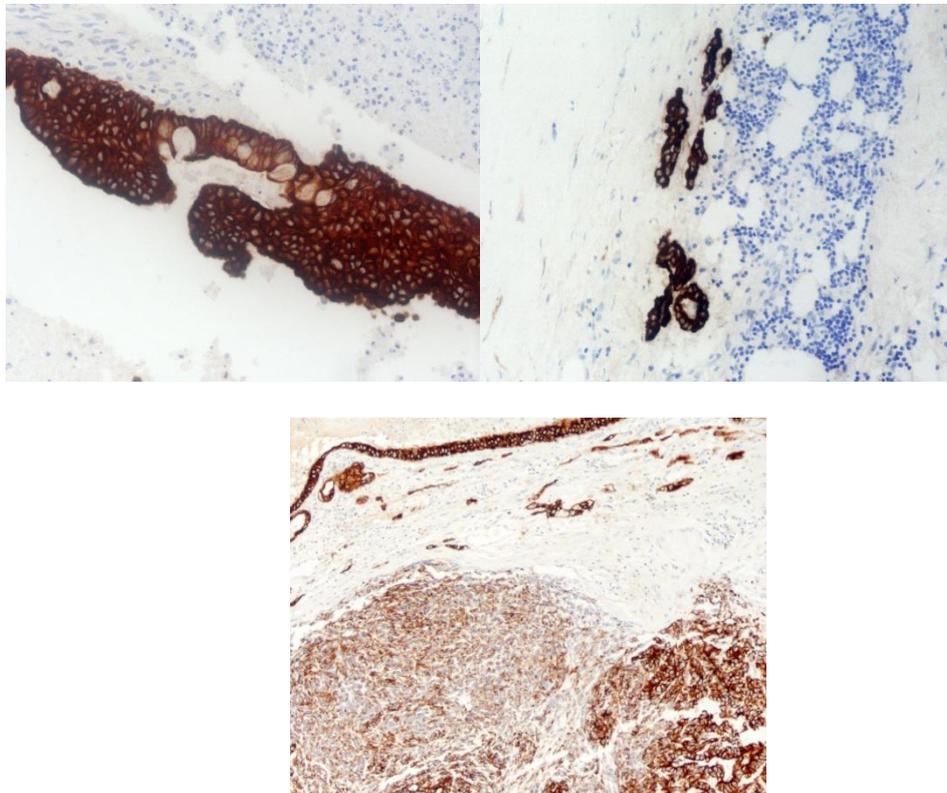


Figura 38- Imagem de um TCG masculino no mediastino, imagem à esquerda imagem de um epitélio com quatro camadas celulares, com uma ampliação total de 200x; Imagem à direita, estão marcados tubos com uma ampliação total de 200x; imagem inferior está marcada a epiderme e alguns anexos, com uma ampliação total de 100x. As três imagens estão marcadas com o marcador AE1/AE3.

Os anticorpos para a Ck7 e o Lp34 são mais específicos e ligam-se a poucos ou mesmo só um tipo de Ck. O que nós verificamos é que a Ck7 e o Lp34 podem marcar epitélio respiratório, intestinal ou epiderme. Estes dois marcadores raramente se sobrepõem nos TCG estudados. Para além de não se sobreporem entre si, também não se sobrepõem ao TTF1 (Figura 39). Esta ausência de sobreposição na marcação dos mesmos tecidos indica-nos que os epitélios em causa, consoante a camada de células que o constitui, têm diferentes tipos de marcação para estes anticorpos, isto é, por exemplo na Figura 24, está um epitélio respiratório de um TCG masculino no mediastino e verificamos que, o Lp34 marca o interior do epitélio, o TTF1 marca a camada basal do mesmo epitélio e o Ck7 marca a camada de células mais superficial.

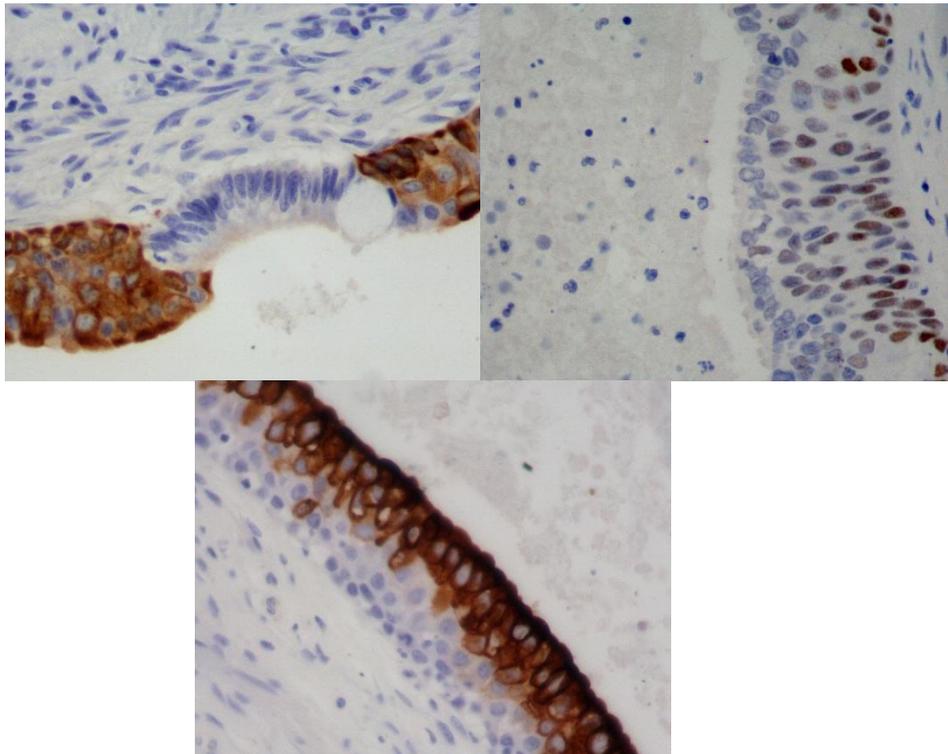


Figura 39- Imagem de um TCG masculino no mediastino; A imagem mais à esquerda em cima é marcação com LP34, a imagem à direita é marcação com TTF1, e a imagem de baixo a marcação foi feita com Ck7. As três imagens são de epitélio respiratório, mas com marcação em diferentes localizações, o LP34 marca todo o interior do epitélio, o TTF1 a camada basal e o Ck7 marca a camada mais superficial. Ampliação total x400

Já na Figura 40, onde podemos ver imagens com marcação para a epiderme. O LP34 marca a primeira Ck a ser expressa no desenvolvimento embrionário (Ck18). Na imagem verificamos que LP34 tem uma marcação menos intensa comparativamente com Ck7, o que nos leva a crer que o epitélio está em transição.

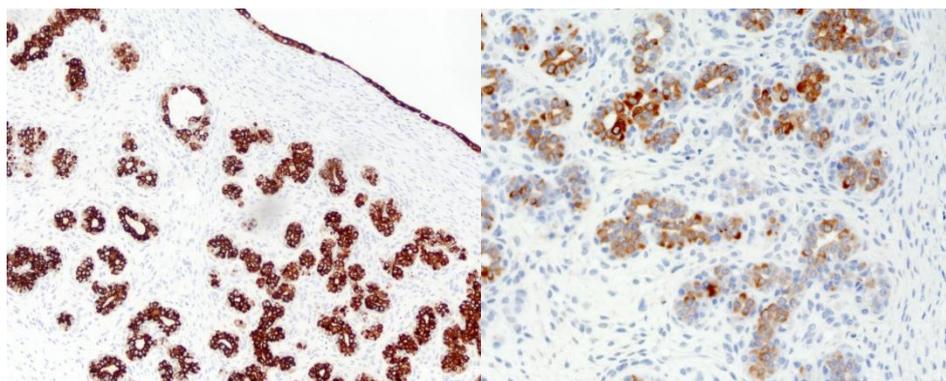


Figura 40- Imagem de um TCG masculino no testículo, na imagem da esquerda temos uma marcação com Ck7 e marcação de Lp34, ambas são de anexos da epiderme. Ampliação total de 100x à esquerda e 200x e na imagem da direita

Por fim na Figura 41, a marcação de Ck7 é no epitélio intestinal enquanto o Lp34 marca somente as células da camada basal deste epitélio.

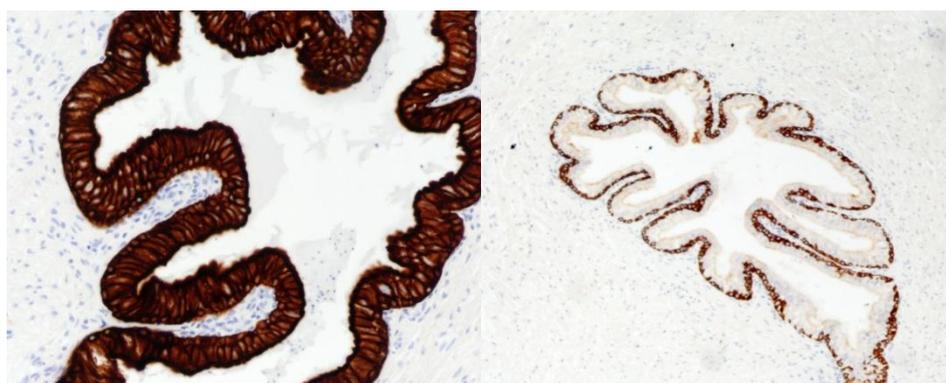


Figura 41- Imagem de um TCG masculino no testículo, na imagem da esquerda temos uma marcação com Ck7 no intestino com uma ampliação total de 200x e na imagem da direita temos uma marcação de Lp34 com uma ampliação total de 100x, ambas são marcações no epitélio intestinal.

6.5. Análise quantitativa dos resultados da imunohistoquímica

6.5.1. Oct3/4 nos seminomas e nos carcinomas embrionários

Tabela VII- Nesta tabela estão representadas as marcações do Oct3/4 nos TCG seminomas e carcinomas, em ambos os géneros (masculino e feminino).

Tipo Caso * Marcação "Cross tabulation"

			Marcação		Total
			Núcleo	Núcleo Citoplasma	
Tipo de tumor	Seminoma	Total	6	0	6
		Total esperado	2.4	3.6	6.0
	Carcinoma Embrionário	Total	0	9	9
		Total esperado	3.6	5.4	9.0
Total		Total	6	9	15
		Total esperado	6.0	9.0	15.0

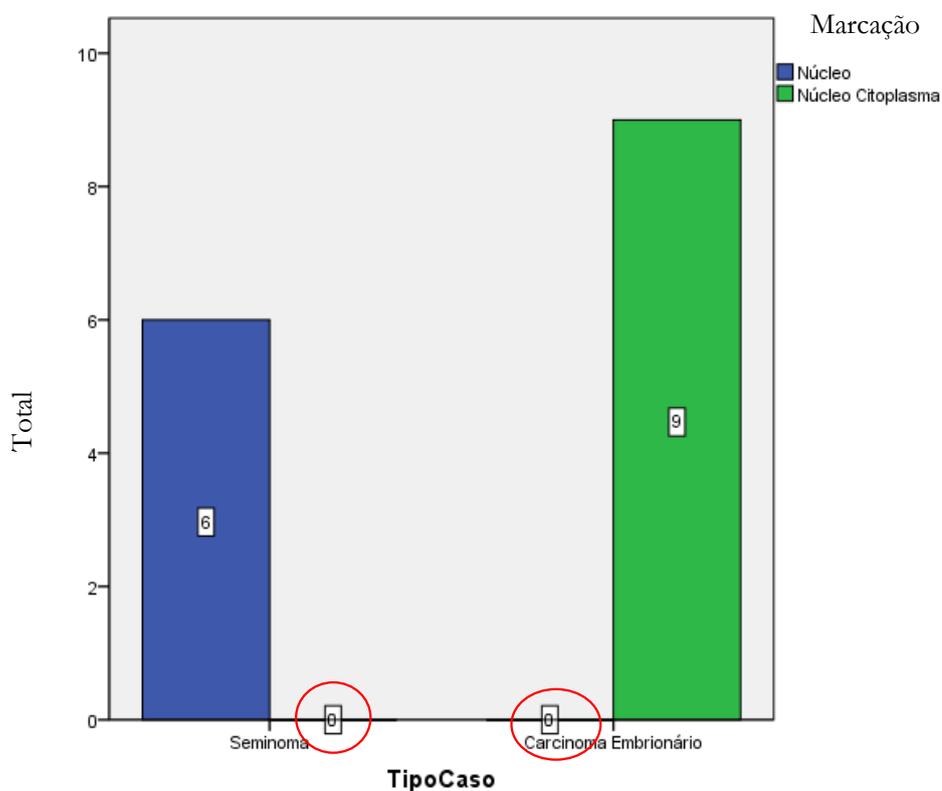


Figura 42- Gráfico representativo das marcações do Oct3/4 em seminomas e carcinomas embrionários, em ambos os géneros (feminino e masculino).

Na Tabela VII e na Figura 42, verificamos que foram analisados seis seminomas e nove carcinomas embrionários. É de realçar que são doze casos no total, mas existem três casos que possuem TCG misto (seminoma e carcinoma embrionário), por isso termos um número de casos igual a doze e um número de tumores total de quinze. Porque no nosso estudo, em todos os tumores analisados foi verificado uma concordância em relação a marcação do Oct3/4, em todos os seminomas estudados verificamos que existe marcação positiva nuclear, enquanto nos carcinomas embrionários esta marcação é nuclear e citoplasmática. Analisando o gráfico, verificamos que existem dois locais com zero, em que assinalei com um círculo a vermelho, um no seminoma quando o local seria da barra gráfica correspondente à marcação citoplasma/núcleo, enquanto no carcinoma embrionário a suposta barra de valor zero, está referente à barra da coloração nuclear. Na literatura verificamos, como já foi referido, que a proteína em estudo tem duas subunidades (POU5F1_iA e POU5F1_iB; Takeda, *et al.*, 1992) e que estas apresentam diferenças na sua expressão quer de forma espacial quer temporal, a primeira isoforma está presente no núcleo e a segunda a ser referida está no citoplasma (Cauffman, *et al.*, 2006). Como podemos verificar na tabela e no gráfico anterior, nos TCG que estudámos funciona a 100%, não havendo em nenhum caso alteração no padrão de coloração. Então pelos nossos resultados podemos realmente sugerir que o Oct3/4 apresenta marcações características nos seminomas e nos carcinomas embrionários, podendo este marcador ser utilizado para a distinção dos dois tipos de tumor, uma vez que pelas suas características em caso algum podem ser confundidos.

6.5.2- Relação da Vimentina com o LP34

Tabela VIII- Tabela representativa do cruzamento de dados entre a marcação da vimentina na epiderme e LP34 na epiderme.

		Vimentina Epiderme		Total
		Não	Sim	
LP34Epiderme	Não	10	0	10
	Sim	17	1	18
Total		27	1	28

$p = 0,448$ (teste Chi-quadrado)

Verificamos que não há uma associação entre a marcação de LP34 na epiderme e vimentina na epiderme ($p=0,448$). Ou seja, neste caso os marcadores atuam sem associação entre si na epiderme.

Tabela IX- Tabela representativa do cruzamento de dados entre a marcação da vimentina nas células basais da epiderme e LP34 nas células basais da epiderme.

		Vimentina Epiderme Cel Bas		Total
		Não	Sim	
LP34 Epiderme Cel Bas	Não	22	1	23
	Sim	5	0	5
Total		27	1	28

$p = 0,635$

Verificamos que não há uma associação entre a marcação de LP34 e vimentina nas células basais da epiderme ($p=0,635$). Ou seja, neste caso os marcadores atuam sem associação entre si nas células basais da epiderme.

Tabela X- Tabela representativa do cruzamento de dados entre a marcação da vimentina no intestino e LP34 no intestino.

		VimentinaIntestino		Total
		Não	Sim	
LP34Intestino	Não	25	0	25
	Sim	1	2	3
Total		26	2	28

$p < 0,001$

Verificamos que há uma associação entre a marcação de LP34 no intestino e vimentina no intestino ($p < 0,001$). Ou seja neste caso os marcadores atuam em associação entre si na epiderme. O que demonstra que este intestino ainda está em transição, não está totalmente diferenciado.

Tabela XI- Tabela representativa do cruzamento de dados entre a marcação da vimentina no epitélio respiratório e LP34 no epitélio respiratório.

		VimentinaRespir		Total
		Não	Sim	
LP34Respirat	Não	17	1	18
	Sim	10	0	10
Total		27	1	28

$p = 0,448$

Verificamos que não há associação entre a marcação de LP34 e vimentina no epitélio respiratório ($p = 0,448$). Ou seja, neste caso os marcadores atuam sem associação entre si no epitélio respiratório.

Tabela XII- Tabela representativa do cruzamento de dados entre a marcação da vimentina nas células basais do epitélio respiratório e LP34 nas células basais do epitélio respiratório.

		VimentinaRespirCelBas		Total
		Não	Sim	
Lp34RespirCélBas	Não	17	2	19
	Sim	8	1	9
Total		25	3	28

$$P=0,963$$

Verificamos que não há uma associação entre a marcação de LP34 e vimentina nas células basais do epitélio respiratório ($p=0,963$). OU seja, neste caso os marcadores atuam sem associação entre si nas células basais do epitélio respiratório.

Em suma o que retiramos destas tabelas, é que quase sempre, à exceção de um caso, os marcadores são independentes, não havendo dependência entre eles na marcação. O que nos sugere que marcam os mesmos tecidos em estados com diferentes graus de diferenciação e em locais diferentes (por exemplo células basais dos epitélios e interior dos epitélios ou estruturas associadas, alvéolos ou glândulas).

6.5.3- Relação da marcação da Ck7, Lp34 3 TTF1

Tabela XIII- Tabela com o total e a moda de cada marcador para tecido epitelial

		Count	Mode
Epiderme	1 Ck7	1	
	2 Lp34	18	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	0	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	19	2
Epiderme_Glândulas_sudoríparas	1 Ck7	5	
	2 Lp34	2	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	2	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	9	1
Epiderme_Glândulas_Sebáceas	1 Ck7	2	
	2 Lp34	3	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	4	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	9	5
Epiderme_Células_Basais	1 Ck7	0	
	2 Lp34	1	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	0	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	1	2
Intestino	1 Ck7	1	
	2 Lp34	1	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	2	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	4	5
Epitélio_Respiratório	1 Ck7	15	
	2 Lp34	1	
	3 TTF1	1	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	4	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	21	1
Epitélio_Respiratório_Células_Basais	1 Ck7	0	
	2 Lp34	10	
	3 TTF1	0	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	1	
	6 Lp34_TTF1	0	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	11	2
Epitélio_Respiratório_Aveólos	1 Ck7	0	
	2 Lp34	0	
	3 TTF1	6	
	4 LP34_Ck7_TTF1	0	
	5 LP34_Ck7	0	
	6 Lp34_TTF1	3	
	7 Ck7_TTF1	0	
	Total	9	3

Tabela XIII, é possível observar qual ou quais os marcadores mais específico (s) e mais frequentemente associados a cada tipo de epitélio. Estão rodeados a vermelho os que são mais significativos para cada epitélio / zona do epitélio. Se começarmos a analisar a tabela pela parte superior, verificamos o Lp34 marca a epiderme em 18 casos dos 19 em que houve marcação para a epiderme. No caso das glândulas sudoríparas, o marcador que mais marca será o Ck7 (cinco casos num total de nove). Nas glândulas sebáceas verifica-se que em quatro casos de nove, são marcados com a Ck7 e Lp34. Para as células basais da epiderme, o marcador que está presente, volta a ser o Lp34. Enquanto no epitélio do intestino, verificamos que existem sobreposição de dois marcadores, Lp34 e Ck7, isto é, estes dois marcadores marcaram o mesmo epitélio nos mesmos tumores, isto ocorreu em dois casos de quatro. O Ck7 é o marcador com maior expressividade no epitélio respiratório, em quinze de vinte e um. As células basais do epitélio respiratório apresentam uma maior expressão de positividade para o Lp34. Por fim para os alvéolos respiratórios, o marcador com maior representação de positividade é o TTF1, seis casos em nove.

Estes resultados mostram que, em grande parte dos casos, os marcadores são expressos de forma diferente dependendo da zona do tumor, daí se justificar a não sobreposição de marcação. O que mostra que as zonas / órgãos que tiveram uma origem comum. Mas ao longo da diferenciação vão adquirindo os seus próprios constituintes, permitindo de alguma forma torná-los únicos. E através dos resultados podemos verificar, qual o marcador que possivelmente é mais adequado para cada epitélio e para cada zona. Os marcadores em que houve maior sobreposição foi do Lp34 com o Ck7, o que é esperado, uma vez que ambos marcam citoqueratinas, e apesar de não marcarem as mesmas proteínas é possível encontra-las em diversos epitélios em simultâneo, ou então são epitélios que ainda estão em transição.

Tabela XIV- Análise da presença de diferentes marcadores nos epitélios em 28 casos.

		Epiderme				Epitélio respiratório			intestino
		Epide rme	Células basais	Glândulas sebáceas	Glândulas sudoríporas	Epitélio respiratório	Alvéo los	Células basais	
1	Ck7					1			
	LP34	1						1	
	TTF-1						1		
	Ck7 e LP34								1
2	Ck7			1	1	1			
	LP34	1						1	
	TTF-1						1		
	Ck7 e LP34								1
3	Ck7					1		1	
4	Ck7 e LP34							1	
5	Ck7					1			
	LP34							1	
6	Ck7					1			
	LP34							1	
7	Ck7	1				1			
8	Ck7					1			
	LP34	1					1		
	TTF-1								
9	Ck7					1			
	LP34	1							
10	Ck7					1			
	LP34							1	
11	Ck7				1				
	LP34	1							
	TTF-1						1		
12	TTF-1						1		
	Ck7 e LP34					1			
13	LP34								1
	Ck7 e LP34					1			
14	Lp34								
15	Ck7					1			
	LP34	1							

		Epiderme				Epitélio respiratório			intestino
		Epide rme	Células basais	Glândulas sebáceas	Glândulas sudoríporas	Epitélio respiratório	Alvéo los	Células basais	
16	Lp34								
	TTF-1						1		
	Ck7 e LP34					1			
17	LP34							1	
18	Lp34								
	TTF-1					1			
19	LP34			1					
20	Ck7		1	1					
	LP34	1			1				
21	LP34	1				1			
	Ck7 e LP34								
22	LP34	1						1	
	Ck7 e LP34		1	1					
23	LP34	1							
24	Ck7				1	1			
	LP34	1							
	Ck7 e LP34			1					
25	Ck7				1	1			
	LP34	1							
	Ck7 e LP34			1					
	LP34 e TTF-1						1		
26	Ck7				1	1			
	LP34	1							
	Ck7 e LP34			1					
	LP34 e TTF-1						1		
27	LP34	1		1					
	Ck7 e LP34				1				
28	Ck7					1			
	Lp34	1	1	1	1			1	

Na Tabela XIV é possível verificar que raramente um tumor (caso) tem sobreposição de marcadores associados a um tecido. Esta tabela também permite concluir que para cada tumor os marcadores, que podem ser só um ou dois, estão

associados a cada um dos tecidos em análise. Quando verificamos a sobreposição dos marcadores no mesmo tumor e tecido, indica-nos que são tecidos que ainda estão em transição, não estando ainda definida a sua total diferenciação.

Por fim, para complementar e provar, efetivamente, a existência de associação estatisticamente significativa entre as categorias (tecidos de cada tumor vs. cada marcador) realizámos um *Crosstabs* (ver apêndice) com informação sobre o valor observado e resíduo ajustado. Sempre que o resíduo ajustado for superior a 1,96 significa que o valor observado resultante do cruzamento do número de observações das categorias se afasta da hipótese de independência (ou seja do valor esperado), o que quer dizer que estão relacionadas (associadas). Sendo assim, pela nossa tabela, verificamos que existem sete tumores que mostram que existem marcadores associados a cada epitélio (os valores estão a negrito e sublinhado). No tumor 1, verificamos que o epitélio respiratório está associado à Ck7, os alvéolos ao TTF1 e o intestino ao Ck7 e LP34. No tumor 2, verificamos que os alvéolos estão mais uma vez associados ao TTF1 e o intestino ao Ck7 e LP34. No tumor 8, que a epiderme está associada ao LP34. O tumor 24 e 25 que o epitélio respiratório está associado ao TTF1 e LP34, a epiderme ao LP34 e as glândulas sebáceas ao LP34 e Ck7. Por fim, no tumor 28, o epitélio respiratório está associado ao LP34 e à Ck7. Quando verificamos que existe sobreposição de marcadores, dá-nos a indicação que são epitélios que ainda estão em transição. Por exemplo nos alvéolos, é porque o tecido já é maduro mas ainda não está totalmente diferenciado uma vez que ainda expressa o LP34. E sabemos que o TTF1 é um marcador alveolar, no caso de indivíduos adultos. O mesmo acontece para os restantes tecidos e marcadores. O LP34 é um marcador da epiderme, quando este está sobreposto com o Ck7 nas glândulas é porque estas ainda não estão completamente diferenciadas, uma vez que são originárias a partir da epiderme.

Capítulo IV

Conclusão

Com este trabalho, podemos concluir que possivelmente existe um espectro celular evolutivo na embriogénese que é recapitular tudo em neoplasias malignas, atualmente designadas como pouco diferenciadas.

Nos TCG pudemos precisar entre a carcinogénese e a embriogénese, e que através destes tumores tentar perceber de uma forma mais precisa o desenvolvimento embrionário dos seres Humanos. Para além disso, foi possível estabelecer uma relação na marcação entre o Oct3/4 e os TCG seminomas e carcinomas embrionários (nuclear e nuclear e citoplasmática, respetivamente). Os marcadores como LP34, Ck7 e TTF1, raramente se sobrepõem, apesar destes marcarem estruturas com a mesma origem, o que nos indica que apesar de os órgãos terem a mesma origem embrionária sofrem padrões de desenvolvimento diferentes até se transformarem estruturas com formações bem definidas. Pudemos ainda demonstrar que o AE1/AE3 é um marcador muito pouco específico, mas importante na validação do trabalho de forma transversal, dado ser expresso nos derivados de mesenquima e nos epitélios. E por fim, também podemos concluir, que o Nanog, dá “jus” ao nome “na terra dos sempre jovens”, e que marca realmente células muito indiferenciadas.

Com a finalização deste trabalho, e apesar dos vários resultados favoráveis à progressão da investigação sobre o tema, consideramos que ainda há muito que se pode fazer para ter uma melhor compreensão do desenvolvimento embrionário. Sendo então necessário aprimorar os intervalos de diferenciação, verificando assim a expressão de cada proteína/gene correspondente a cada intervalo, por exemplo pode-se tentar perceber se a vimentina é expressa alternadamente com a desmina durante o desenvolvimento embrionário, aumentar o leque de marcadores para uma melhor compreensão das proteínas expressas no desenvolvimento embrionário por exemplo recorrer à utilização do Sox 2, o Sox4, e SSEA. E ainda quais os fatores que inibem o

Nanog , se o ácido retinóico está presente nas células iniciais do desenvolvimento. Um outro estudo que se poderia fazer, seria um levantamento de todos os casos a nível nacional, e perceber qual a incidência dos tumores tendo em conta o género e a idade do indivíduo.

Capítulo V

Referências Bibliográficas

- Almeida Jr, H. (2004). Citoqueratinas. *An bras Dermatol, Rio de Janeiro*. 79(2):135-145.
- Amabis, J., Martho, G. (2004). *Biologia*. 2ª ed. São Paulo: Moderna
- Bal, A., Mohan H., Singh S., Sehgal A. (2007). Malignant transformation in mature cystica teratoma of the ovary: report of five cases and review of the literature. *Obstet Gynecol*. 275(3):169-182.
- Berg, D., Hipp, S., Malinowsky, K., Bollner, C., Becker, K., (2010). Molecular profiling of signaling pathways in formalin- fixed and paraffin-embedded cancer tissues. *European journal of cancer*. 46:47 –55.
- Boiani, M., Scholer, H. (2005). Regulatory networks in embryoderived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(11): 872–884.
- Boyer, L., Lee, T., Cole, M., Johnstone, S., Levine, S., Zucker, J., Guenther, M.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122:947–956.
- Broggaram, V. (2009). Tyroid transcription factor-I (TTF-I / NKX2.1 / TIFI) gene regulation in the lung. *Clinical Science*. 116:27-35.
- Bydlowski, S., Debes, A., Duarte, S., Janz, F., Cavaglieri, R., Maselli, L. (2009). Células-tronco do liquido amniótico. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*. 31(1):45-52.
- Carvalho, L., Sousa, V. (2003). Malformação adenomatóide quística congénita do pulmão ou malformação congénita das vias aéreas pulmonares. *Revista Portuguesa Pneumologia Portuguesa*. IX (3):249-256.
- Cauffman, G., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Van de Velde, H. (2006). POU5F1 Isoforms Show Different Expression Patterns in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. *STEMCELLS*. 24:2685–2691.

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., *et al.*, (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643-655.
- Cole, M., Johnstone, S., Newman, J., Kagey, M., Young, R. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 22:746–755.
- Cools, M., Van Aerde K., Kersemaekers, A., Boter, M., Wolffenbuttel, K., Steyerberg, E., *et al.* (2005). Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 90(9):5295–5303
- Coulombe, P., Omary, M. (2002). Hard of soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14: 110-122.
- Couto, W., Gross, J., Deheinzelin, D., Younes, R. (2006). Tumores de células germinativas primários do mediastino. *Rev Assoc Med Bras.* 52(3):182-186.
- Cox, J. (1975). Primary malignant germinal tumors of the mediastinum: a study of 24 cases. *Cancer.* 36: 1162–1168.
- Franke, W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. (1978) Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(10):5034–5038.
- Frazie, A., Weldon, C., Amatruda, J. (2012). Fetal and neonatal germ cell tumors. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 17: 222 e 230.
- Gomes, R., Grinfeld, S. (2008). Células-tronco: um breve estudo. *Odontologia. Clin.- Científica, Recife.* 7(1): 29-33.

- Gonçalves, C., Bairos, V. (2010). *Histologia texto e imagens*. 3ª Ed. Coimbra: Gráfica Coimbra.
- Guazzi, S., Price, M., Felice, M., Damante, G., Mattei, M., Lauro, R. (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J.* 9(11):3631–3639.
- Hainsworth, J. (2002). Diagnosis, staging, and clinical characteristics of the patient with mediastinal germ cell carcinoma. *Elsevier Science*. 12:665-672.
- Hamilton, J., Body, J., Mossaman, H. (1968). *Embriología Humana*. Trad.: Dra. María Teresa Sabattini; Dr. Aníbal Jorge Sánchez. 3ªed. Buenos Aires-Argentina.
- Henderson, D., Weber, K. (1980). Immunoelectron microscopic studies of intermediated filaments in culture cells. *Experimental Cell Research*. 129(2):441-453.
- Herman, H., Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem*. 73: 749-789.
- Hoei-Hansen, C., Kraggerud, S., Abeler, V., Kærn, J., Meyts E., Lothe, R. (2007). Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent *KIT* mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Molecular Cancer*. 6:12.
- Ikeda, K., Clark, J., Shaw-White, J., Stahlman, M., Boutell, C., Whitsett, J. (1995). Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *The journal of biological chemistry*. 14(270):8108-8114.
- Ivaska, J., Pallari, H., Nevo, J., Eriksson, J. (2007). Novel functions of viemntin in cell adhesion, migration and signaling. *Exp Cell Res*. 313 (10): 2050-2062

- Jones, T., Ulbright, T., Eble, J., Cheng, L. (2004). Oct4: A sensitive and specific Biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res.* 10(24): 8544-8547.
- Junqueira, L., Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 10ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kleihues, P., Leslie S. → Tavassoli, F., Devilee, P. (2003). World Health Organization Classification of tumors: Pathology and Genetics of tumors of the breast and female genital organs. IARC Press: Lyon.
- Kline, R., Bazzett-Matabele, B. (2010). Adnexal Masses and Malignancies of Importance to the Colorectal Surgeon. *Clin Colon Rectal Surg.* 23(2): 63–71.
- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 283(5744):249-256.
- Lazarides, E. (1982). Biochemical and immunocytological characterization of intermediate filaments in muscle cells. *Methods Cell Biol.* 25 Pt B:333-57.
- Lazzaro, D., Price, M., Felice, M., Lauro, R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development.* 113:1093–1104.
- Leitner, K., Szlauer, R., Ellinger, I., Ellinger, A., Zimmer, K., Fuchs, R. (2001). Placental alkaline phosphatase expression at the apical and basal plasm membrane in term villous trophoblasts. *The journal of histochemistry & cytochemistry.* 49(9):1155-1164.
- Loh, Y., Wu, Q., Chew, J., Vega, V., Zhang, W., Chen, X., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38:431–440.

- Lott, L., Morrison, C., Suster, S., Cohn, D., Frankel, W. (2005). CDX2 Is a Useful Marker of Intestinal-Type Differentiation: A Tissue Microarray-Based Study of 629 Tumors From Various Sites. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 129(9):1100-1105.
- Lu, K., Gershenson, D. (2005). Update on the management of ovarian germ cell tumors. *J Reprod Med*. 50:417-425.
- Machado, G., Figueiredo, F. (1996). Revisão: Filamentos intermédios. *Medicina, Ribeirão Preto*. 29:104-113.
- Machado, G., Figueredo, F. (1996). Revisão: filamentos intermédios. *Medicina, Ribeirão Preto*. 29:104-113-
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., *et al*. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113(5):631-42.
- Mizoshita, T., Inada, K., Tsukamoto, T., Kodera, Y., Yamamura, Y., Hirai, T., *et al*. (2001). Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and relevance of this expression to differentiation in human gastrointestinal mucosa--with special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach. *Gastric Cancer*. 4(4):185-191.
- Moll, R., Franke, W., Schiller, D., Geiger, B., Kepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 31(1):11-24.
- Morrison, G., Brickman, J. (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* 133: 2011-2022.

- Moskaluk, C., Zang, H., Powell, S., Cerrilli, L., Hampton, G., Frierson, H., (2003). Cdx2 protein expression in normal and malignant Human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. 16 (9):913.
- Mostofi, F., Sesterhenn, I., Davis, C. (1987). Immunopathology of germ-cell tumors of the testis. *Semin Diagn Pathol.* 4:320-41.
- Myong, N. (2003). Thyroid transcription Factor-1 (TTF-1) expression in Human Lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with expression of p53 and ki-67 proteins. *J. Korean Med Sci.*18:494-500.
- Nagle, R. (1989). Intermediate filaments. Efficacy in surgical pathologic diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 91(4):S14-8.
- Neto J., Domingos, A., Martins, A., Tucci Jr., S., Suaid, H., Cologna, A., *et al.* (2002). Prognóstico de tumores testiculares germinativos. *Acta cirúrgica brasileira.* 17(3): 2002-2055.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., *et al.* (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 95(3): 379–391.
- Nogales F., Talerman A., Kubik-Huch R., Tavassoli F. (2003). Devouassoux-Shisheboran M.,: Germ cell tumours. *In* World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs Edited by: Tavassoli FA, Deville P. IARC Press.
- Nonaka, D. (2009). Differential Expression of SOX2 and SOX17 in Testicular Germ Cell Tumors. *Am J Clin Pathol.*131:731-736
- Norris, H., Jensen, R. (1972). Relative frequency of ovarian neoplasms in children and adolescents. *Cancer.* 30(3):713–719.

- Pan, G., Thomson, J. (2007). Nanog and transcriptional network in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*. 17:42-49.
- Pectasides, D., Pectasides, E., Kassanos, D. (2008). Germ Cell tumors of the ovary. *Cancer treatment Reviews*. 34: 427-441.
- Pereira, L., Yi, F., Merrill, B. (2006). Repression of nanog gene transcriptional by Tcf3 Limits embryonic stem cell self-renewal. *Molecular and cellular biology*.16(20):7479-7491.
- Pottern, L., Goedert, J. (1986). Epidemiology of testicular cancer. In Javadpour N (ed): Principles and management of testicular cancer. New York: *Thieme*. 107-109.
- Quirk, J., Natarajan, N., Mettlin, C. (2005). Age-specific ovarian cancer incidence rate patterns in the United States. *Gynecol Oncol*. 99(1):248–50.
- Ray-Coquard, I., (2004). Ovarian germ-cell malignant tumour. *Orphanet Encyclopedia*.
- Reuter, V. (2008). Classification of testicular germ cell tumors: insights from immunohistochemistry. *Memorial Sloan-Kettering Cancer center*.
- Rodney T. Miller, D. (2007). Update on Immunohistochemistry of germ cell Tumors. *ProPath the focus immunohistochemistry*. Recuperado em 9 dez 2011, de http://www.ihcworld.com/_newsletter/2007/2007_01_Germ_Cell_Tumors_Dr._Miller.pdf.
- Saad, R., Ghorab, Z., Khalifa, M., Xu, M. (2011). CDX2 as marker for intestinal differentiation: its utility and limitations. *World journal of gastrointestinal surgery*. 3(11): 159-166.
- Schmoll, H. (2002). Extragonadal germ cell tumors. *European Society for medical oncology*.
- Schultz, K., Sencer S., Messinger, Y., Neglia, J., Steiner, M. (2005). Pediatric Ovarian Tumors: a review of 67 cases. *Pediatric Blood Cancer*. 44(2):167–173.

- Scully, R. (1987). Classification of human Ovarian tumors. *Environmental Health Perspectives*. 78:15-24.
- Seeley, R., Stephens T., Tate P. (2003). *Anatomia e Fisiologia*. 6ª Ed. Loures: Lusociência.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T., Guo, G., Van Oosten, A., Barrandon, O. *et al.* (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138:722-737.
- Sousa, M^a., Elias, D. (2005). *Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia (As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos)*. 2ª Ed.. Perfusion Line.
- Takeda S., Miyoshi, S., Ohta, M., Minami, M., Masaoka, A., Matsuda, H. (2003). Primary Germ Cell Tumors in the Mediastinum. *Cancer*. 97(2): 367-376.
- Takeda, J., Seino, S., Bell, G. (1992). Human Oct3 gene family: DNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res*. 20(17):4613-4620.
- Talerman, A. (1997). A Germ cell tumor of the ovary. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 9(1):44-47.
- Tan, D., Li, Q., Deeb, G., Ramnath. N., Slocum, H., Brooks, J., *et al.*. (2003). Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Hum Pathol*. 34(6):597-604.
- Tanca, A., Pagnozzi, D., Addis, M. (2012). Setting proteins free: Progresses and achievements in proteomics of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics Clin*. 6:7-21.
- Tewari, K., Cappuccini, F., DiSaia, P., Berman, M., Manetta, A., Kohler, M. (2000). Malignant germ cell tumors of the ovary. *Obstet Gynecol*. 95(1):128-133.

- Theaker, J., Mead, G. (2004) Diagnostic pitfalls in the histopathological diagnosis of testicular germ cell tumours. *Current Diagnostic Pathology*. 10:220-228.
- Ulbright, T. (2005). Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Modern Pathology*. 18:S61-S79.
- Utz, D., Buscemi, M. (1971). Extragonadal testicular tumors. *J Urol*. 105: 271–274.
- Varadhachary, G., Abbruzzese, J., Lenzi, R. (2004). Diagnostic Strategies for unknown primary cancer. *Wiley InterScience*. 100:1776-1785.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D., Theunissen, T., *et al.* (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 444(7117):364–368.
- Wobus, A., Boheler, K. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev*. 85: 635–678.
- Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2002). TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 26(6): 767-73.

Apêndices

Tabela com o teste *Cross tabs* para os 28 casos.

O teste *Cross tabs*, serve para provar efetivamente, a existência de associação estatisticamente significativa entre os tecidos de cada tumor *vs* marcador.

CASE_LBL * T_1 Crosstabulation

		T_1				Total
		1 CK7	2 Lp34	3 TTF1	5 LP34_C k7	
CASE_LBL	Epiderme	0	1	0	0	1
	Resíduo ajustado	-.6	1,4	-.6	-.6	
Epitélio_Respiratório	n	1	0	0	0	1
	Resíduo ajustado	2,2	-.9	-.6	-.6	
Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	0	1	0	1
	Resíduo ajustado	-.6	-.9	2,2	-.6	
Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	0	0	1
	Resíduo ajustado	-.6	1,4	-.6	-.6	
Intestino	n	0	0	0	1	1
	Resíduo ajustado	-.6	-.9	-.6	2,2	

CASE_LBL * T_2 Crosstabulation

			T_2				Total
			1 Ck7	2 Lp34	3 TTF1	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	-,9	1,7	-,4	-,4	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n	1	0	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-,7	-,4	-,4	
	Epiderme_Glândulas_sudoríporas	n	1	0	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-,7	-,4	-,4	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-,7	-,4	-,4	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	0	1	0	1
		Resíduo ajustado	-,9	-,7	2,6	-,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	-,9	1,7	-,4	-,4	
	Intestino	n	0	0	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,9	-,7	-,4	2,6	

CASE_LBL * T_3 Crosstabulation

			T_3		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,4	1,4	

CASE_LBL * T_4 Crosstabulation

			T_4	Total
			5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_5 Crosstabulation

			T_5		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Bas	n	0	1	1
	ais	Resíduo ajustado	-1,4	1,4	

CASE_LBL * T_6 Crosstabulation

			T_6		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	N	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Bas	N	0	1	1
	ais	Resíduo ajustado	-1,4	1,4	

CASE_LBL * T_7 Crosstabulation

			T_7	Total
			1 Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	
	Epitélio_Respiratório	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_8 Crosstabulation

			T_8			Total
			1 Ck7	2 Lp34	3 TTF1	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	0	1
		Resíduo ajustado	-1,2	2,0	-,7	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-,7	-,7	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,2	-,7	2,0	
	Intestino	n	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-,7	-,7	

CASE_LBL * T_9 Crosstabulation

			T_9		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,4	1,4	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	

CASE_LBL * T_10 Crosstabulation

			T_10		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,4	1,4	

CASE_LBL * T_11 Crosstabulation

			T_11			Total
			1 Ck7	2 Lp34	3 TTF1	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	0	1
		Resíduo ajustado	-,9	1,7	-,9	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,7	-,9	-,9	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,9	-,9	1,7	

CASE_LBL * T_12 Crosstabulation

			T_12		Total
			3 TTF1	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,4	1,4	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-,4	

CASE_LBL * T_13 Crosstabulation

			T_13		Total
			2 Lp34	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,4	1,4	
	Intestino	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-,4	

CASE_LBL * T_14 Crosstabulation

			T_14	Total
			2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_15 Crosstabulation

			T_15		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-.9	.9	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,7	-1,7	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-.9	.9	

CASE_LBL * T_16 Crosstabulation

			T_16			Total
			2 Lp34	3 TTF1	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,7	-.9	-.9	
	Epitélio_Respiratório	n	0	0	1	1
		Resíduo ajustado	-.9	-.9	1,7	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	1	0	1
		Resíduo ajustado	-.9	1,7	-.9	

CASE_LBL * T_17 Crosstabulation

			T_17	Total
			2 Lp34	
CASE_LBL	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_18 Crosstabulation

			T_18		Total
			2 Lp34	3 TTF1	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	
	Epitélio_Respiratório	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,4	1,4	

CASE_LBL * T_19 Crosstabulation

			T_19	
			2 Lp34	Total
CASE_LBL	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_20 Crosstabulation

			T_20		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,2	1,2	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-1,2	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-1,2	
	Epitélio_Respiratório	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,2	1,2	

CASE_LBL * T_21 Crosstabulation

			T_21		Total
			2 Lp34	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-1,4	
	Epitélio_Respiratório	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,4	1,4	

CASE_LBL * T_22 Crosstabulation

			T_22		Total
			2 Lp34	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-1,2	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	N	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,2	1,2	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,2	1,2	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	1,2	-1,2	

CASE_LBL * T_23 Crosstabulation

			T_23	Total
			2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	1
		Resíduo ajustado	.	

CASE_LBL * T_24 Crosstabulation

			T_24				Total
			1 Ck7	2 Lp34	5 LP34_Ck7	6 Lp34_TTF1	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	0	0	1
		Resíduo ajustado	-9	2,2	-6	-6	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	N	0	0	1	0	1
		Resíduo ajustado	-9	-6	2,2	-6	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	1	0	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-6	-6	-6	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	0	0	1
		Resíduo ajustado	1,4	-6	-6	-6	
	Epitélio_Respiratório_Alveolos	n	0	0	0	1	1
		Resíduo ajustado	-9	-6	-6	2,2	

CASE_LBL * T_25 Crosstabulation

			T_25				Total
			1 Ck7	2 Lp34	5 LP34_Ck7	6 Lp34_TTF1	
CASE_LBL Epiderme	n		0	1	0	0	1
	Resíduo ajustado		-,9	<u>2,2</u>	-,6	-,6	
Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n		0	0	1	0	1
	Resíduo ajustado		-,9	-,6	<u>2,2</u>	-,6	
Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n		1	0	0	0	1
	Resíduo ajustado		1,4	-,6	-,6	-,6	
Epitélio_Respiratório	n		1	0	0	0	1
	Resíduo ajustado		1,4	-,6	-,6	-,6	
Epitélio_Respiratório_Alveolos	n		0	0	0	1	1
	Resíduo ajustado		-,9	-,6	-,6	<u>2,2</u>	

CASE_LBL * T_26 Crosstabulation

			T_26				Total
			1 Ck7	2 Lp34	5 LP34_Ck7	6 Lp34_TTF1	
CASE_LBL Epiderme	n		0	1	0	0	1
	Resíduo ajustado		-,9	<u>2,2</u>	-,6	-,6	
Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n		0	0	1	0	1
	Resíduo ajustado		-,9	-,6	<u>2,2</u>	-,6	
Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n		1	0	0	0	1
	Resíduo ajustado		1,4	-,6	-,6	-,6	
Epitélio_Respiratório	n		1	0	0	0	1
	Resíduo ajustado		1,4	-,6	-,6	-,6	
Epitélio_Respiratório_Alveolos	n		0	0	0	1	1
	Resíduo ajustado		-,9	-,6	-,6	<u>2,2</u>	

CASE_LBL * T_27 Crosstabulation

			T_27		Total
			2 Lp34	5 LP34_Ck7	
CASE_LBL	Epiderme	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	,9	-,9	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	,9	-,9	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-1,7	1,7	

CASE_LBL * T_28 Crosstabulation

			T_28		Total
			1 Ck7	2 Lp34	
CASE_LBL	Epiderme	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,5	,5	
	Epiderme_Células_Basais	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,5	,5	
	Epiderme_Glândulas_Sebáceas	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,5	,5	
	Epiderme_Glândulas_sudoriporas	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,5	,5	
	Epitélio_Respiratório	n	1	0	1
		Resíduo ajustado	2,4	-2,4	
	Epitélio_Respiratório_Células_Basais	n	0	1	1
		Resíduo ajustado	-,5	,5	