

---

TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

# Studii asupra unui nou marker imunohistochimic tumoral, receptorii de FSH, în diferite neoplazii

---

Doctorand **Eduard-Alexandru Bonci**

---

Conducător de doctorat Prof. Asoc. Dr. **Doina Piciu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>Introducere</b>	3
<b>Stadiul actual al cunoașterii</b>	3
<b>Studiul 1 - Receptorii pentru FSH: o analiză a unui anticorp policlonal ca marker imunohistochimic pentru cercetarea cancerului</b>	4
<b>Studiul 2 - Receptorii pentru FSH: o analiză a unui anticorp monoclonal ca marker imunohistochimic pentru cercetarea cancerului</b>	6
<b>Studiul 3 - FSH ca factor de prognostic în patologia malignă testiculară. O analiză retrospectivă instituțională și recenzie a literaturii de specialitate</b>	7
<b>Concluzii generale, originalitate și contribuții inovative</b>	10

## **Cuvinte cheie:**

- *cancer*
- *angiogeneză*
- *hormon foliculostimulant*
- *imunohistochimie*

---

## **Introducere**

În urmă cu aproximativ 10 ani, un studiu publicat în reputatul jurnal medical „The New England Journal of Medicine” de către un grup de cercetători franco-american a evidențiat, utilizând un anticorp monoclonal nedisponibil comercial (FSHR323), prezența surprinzătoare a receptorilor hormonului foliculostimulant (FSHR) la nivelul endoteliului vaselor sanguine peritumorale aparținând exclusiv unor țesuturi maligne. Prin urmare, cercetările din ultima decadă au încercat să stabilească rolul și implicațiile FSHR de la nivelul proliferărilor neoplazice precum și posibilele implicații terapeutice sau diagnostice generate de utilizarea acestora.

Prezenta cercetare doctorală, începută în anul 2016, și-a propus să se alăture demersului de a studia rolul FSHR la nivelul proliferărilor tumorale maligne.

## **Stadiul actual al cunoașterii**

FSHR este o proteină transmembranară glicozilată un membru al familiei de receptori cuplați cu proteina G. Din punct de vedere istoric, acești receptori au fost considerați a fi prezenți numai în celulele granuloase ovariene și celulele Sertoli. Oarecum mai controversate sunt raportările privind FSHR în celulele endoteliale ovariene și testiculare, uter, adipocite, condrocite, osteoclaste, monocite și hepatocite.

Recent, prezența lor a fost identificată într-o gamă largă de proliferări umane maligne și benigne. Un studiu care a inclus 1336 de pacienți diagnosticați cu diferite tipuri de cancer primar (prostată, vezică urinară, rinichi, sân, colon, pancreas, ficat, plămân, stomac, testicul, ovar) a demonstrat, pe piesele de anatomie patologică obținute în urma tratamentului chirurgical, prezența FSHR la nivelul endoteliului vaselor sanguine tumorale periferice pe o distanță de aproximativ 10 mm intra- și extratumoral. Evidențierea prezenței FSHR în endoteliul vaselor de sânge adiacente tumorilor maligne, folosind un anticorp monoclonal FSHR extrem de specific (FSHR323), a condus la formularea unei noi ipoteze conform căreia acești receptori dețin un rol cheie în carcinogeneză și angiogeneza tumorală.

Numeroase cercetări au încercat să demonstreze prezența receptorilor de FSH la nivelul mai multor neoplazii, rolul acestora nefiind încă complet elucidat.

# **Studiul 1 - Receptorii pentru FSH: o analiză a unui anticorp policlonal ca marker imunohistochimic pentru cercetarea cancerului**

## **Introducere și ipoteza de lucru**

Până în prezent, diferite grupuri de cercetători au încercat să identifice și să cuantifice prezența FSHR în diverse tumori solide maligne și să demonstreze presupusul său rol în angiogeneză. Prezentul studiu a avut ca scop optimizarea metodologiei de evidențiere a FSHR. Astfel, s-a evaluat un anticorp policlonal disponibil comercial în cercetarea imunohistochimică a FSHR în țesuturile extragonadale. Au fost efectuate colorații imunohistochimice pe o gamă variată de țesuturi umane normale, benigne și maligne pentru a evalua diferențele și asemănările dintre rezultatele obținute, precum și compararea prezentului studiu cu rezultatele raportate de către alte echipe de cercetători.

## **Material și metodă**

Au fost analizate 16 probe de țesuturi umane diferite (tumori benigne și maligne), obținute în urma unor intervenții chirurgicale practicate în cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” din Cluj-Napoca, România (IOCN). Pentru fiecare probă de țesut, imunohistochimia cu anticorp anti-FSHR policlonal a fost efectuată pe o secțiune de parafină de 4 μm grosime, prelevată din fiecare dintre cele 16 specimene chirurgicale. Folosind NovoLink Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, Newcastle, Marea Britanie), s-a dezvoltat un protocol de colorație optimizat prin efectuarea mai multor teste de imunohistochimie respectând instrucțiunile producătorului, la care s-au adăugat modificările proprii aduse de echipa de cercetători. A fost folosită o scală descriptivă pentru caracterizarea intensității colorației imunohistochimice pentru FSHR: colorație negativă, slabă, moderată sau intensă.

## **Rezultate**

În țesuturile ovariene normale, a fost observată o colorație intensă pentru FSHR pe stroma corticală, celulele granuloase, celulele tecale și endoteliul vaselor de sânge. De asemenea, histiocitele au prezentat o colorație intensă. În țesutul ovarian patologic anticorpul a fost testat atât pe țesut benign cât și pe țesut malign. Chistadenofibromul seros benign ovarian a prezentat o intensă colorație pentru FSHR pe componenta epitelială și endoteliul vaselor de sânge. Carcinomul ovarian seros de grad înalt a prezentat o colorație negativă pentru celulele tumorale, dar intens pozitivă pentru histiocite și moderată pentru endoteliul vaselor de sânge. În țesutul testicular normal celulele Leydig, celulele Sertoli, celulele germinale și endoteliul vaselor de sânge au prezentat o imunoreacție intensă. Folosind o mostră de țesut cu seminom testicular, au

fost obținute rezultate similare celor menționate anterior, respectiv o colorație intensă a celulelor Leydig, a celulelor Sertoli, a celulelor germinale și a endoteliului vaselor sanguine.

Efectuarea imunohistochimiei cu anticorpol policlonal anti-FSHR pe țesutul cutanat normal a evidențiat o colorație moderată a epidermului și intensă a celulelor inflamatorii și a endoteliului vaselor de sânge. Folosind un eșantion de țesut de melanom malign al pielii, anticorpol policlonal anti-FSHR a produs o colorație intensă a celulelor inflamatorii și o colorație moderată a stratului bazal epidermal; a fost observată o colorație negativă a melanocitelor tumorale.

Adenomul folicular tiroidian a prezentat o imunocolorație intensă la polii apicali ai celulelor și în focarele inflamatorii. O colorație moderată a fost obținută la nivelul endoteliului vaselor de sânge. Carcinomul papilar tiroidian a avut o colorație uniformă și moderată. De asemenea, histiocitele prezente au prezentat o imunoreacție intensă în ambele probe de țesut.

Investigând țesutul mamar normal s-a observat o colorație moderată a epiteliului ductal și a celulelor mioepiteliale bazale. De asemenea, a fost identificată o colorație slabă a celulelor epiteliale acinare. Țesutul mamar tumoral benign analizat (fibroadenom) a prezentat o colorație intensă a epiteliului, respectiv o colorație moderată la nivelul endoteliului vaselor de sânge. Carcinomul de sân invaziv triplu-negativ, fără chimioterapie neoadjuvană, a evidențiat o colorație slabă a celulelor tumorale și o imunoreacție intens pozitivă la nivelul endoteliului vaselor de sânge situate la periferia tumorii. Carcinomul mamar invaziv subtip luminal A cu chimioterapie neoadjuvantă și carcinomul mamar invaziv subtip luminal A fără chimioterapie neoadjuvantă au prezentat o colorație slabă, aproape negativă, a celulelor tumorale. S-a observat o intensă colorație a endoteliului vaselor de sânge aparținând probei de țesut provenită de la pacienta tratată cu chimioterapie neoadjuvantă comparativ cu colorația negativă obținută pe proba de țesut provenită de la pacienta fără chimioterapie neoadjuvantă.

În cele din urmă, testele de imunoreacție au fost efectuate pe o tumoră fibrohistiocitară benignă și o tumoră fibroblastică malignă (mixofibrosarcom). Țesutul histiocitar fibros benign a relevat o colorație intensă a celulelor inflamatorii și a endoteliului vaselor de sânge. Mixofibrosarcomul a prezentat o imunoreacție intensă la nivelul celulelor tumorale, a focarelor inflamatorii cât și la nivelul endoteliului vaselor de sânge.

## **Concluzii**

În concluzie, investigarea FSHR în țesuturi extragonadale utilizând anticorpol policlonal studiat este momentan nesatisfăcătoare și nu putem recomanda utilizarea anticorpolui testat. Rolul exact al FSHR în carcinogeneză poate fi investigat prin

intermediul imunohistochemiei doar cu ajutorul unor anticorpi foarte specifici, precum anticorpii FSHR323.

## **Studiul 2 - Receptorii pentru FSH: o analiză a unui anticorp monoclonal ca marker imunohistochimic pentru cercetarea cancerului**

### **Introducere și ipoteza de lucru**

Studiul 1 a demonstrat că utilizarea unui anticorp policlonal disponibil comercial poate avea o sensibilitate crescută, dar o specificitate relativ redusă. Astfel, a fost evaluată posibila utilitate a unui anticorp monoclonal, disponibil comercial și neutilizat până la momentul respectiv, în cercetarea imunohistochimică a FSHR în țesuturile extragonadale.

### **Material și metodă**

A fost analizate 16 probe de țesuturi umane diferite (tumori benigne și maligne), obținute în urma unor intervenții chirurgicale practicate IOCN. Pentru fiecare probă de țesut, imunohistochemia a fost efectuată pe o secțiune de parafină de 4 μm grosime, prelevată din fiecare dintre cele 16 specimene chirurgicale, cu anticorp anti-FSHR monoclonal. Folosind NovoLink Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, Newcastle, Marea Britanie), s-a dezvoltat un protocol de colorație optimizat prin efectuarea mai multor teste de imunohistochemie respectând instrucțiunile producătorului, la care s-au adăugat modificările proprii aduse de echipa de cercetători. A fost folosită o scală descriptivă pentru caracterizarea intensității colorației imunohistochimice pentru FSHR: colorație negativă, slabă, moderată sau intensă.

### **Rezultate**

În țesuturile ovariene normale, a fost evidențiată o colorație slab pozitivă a celulelor granuloase și a celulelor tecale; toate celelalte tipuri de celule au fost negative, cu excepția histiocitelor care au prezentat o imunoreacție intens pozitivă. Chistadenofibromul seros benign ovarian a prezentat o colorație negativă. Carcinomul ovarian seros de grad înalt a evidențiat absența imunoreacției pentru FSHR în celulele tumorale, dar a avut o colorație intens pozitivă pentru histiocite. De asemenea, endoteliul vaselor de sânge a evidențiat absența imunoreacției. În țesutul testicular normal a fost observată o imunoreacție slab pozitivă pentru celulele Leydig, celulele Sertoli, celulele germinale și endoteliul vaselor de sânge. Țesutul de seminom testicular, a evidențiat rezultate similare cu cele menționate anterior.

Efectuarea imunohistochimiei cu anticorpus monoclonal anti-FSHR nu a relevat imunoreacție pozitivă în nici una dintrele structurile celulare ale țesutului cutanat normal. Folosind un eșantion de țesut cu melanom malign de tegument, anticorpus monoclonal anti-FSHR a prezentat o colorație intensă doar pentru histiocite.

Imunocolorația a fost negativă atât în cazul adenomului folicular tiroidian, cât și în cazul carcinomului papilar tiroidian, exceptând histiocitele, care au prezentat o imunoreacție intensă în ambele probe de țesut.

La nivelul probelor de țesut mamar normal și benign (fibroadenom) a fost observată lipsa unei imunoreacții pozitive utilizând anticorpus monoclonal. Imunohistochimia cu anticorpus monoclonal anti-FSHR pentru cele trei probe de carcinom mamar nu a pus în evidență nicio structură intra- sau intercelulară cu colorație pozitivă.

În cele din urmă, testele de imunoreacție au fost efectuate pe o tumoră fibrohistiocitară benignă și o tumoră fibroblastică malignă (mixofibrosarcom). Țesutul histiocitar fibros benign a relevat o colorație slabă a celulelor inflamatorii și a endoteliului vaselor de sânge. Mixofibrosarcomul a prezentat o imunoreacție negativă, cu excepția unei slabe pozitivități a focarelor inflamatorii.

### **Concluzii**

În concluzie, imunohistochimia pentru evidențierea FSHR este în prezent dificilă. Astfel, investigarea FSHR în țesuturi extragonadale folosind anticorpus monoclonal analizat în acest studiu nu a evidențiat rezultate fiabile pentru a-l recomanda în cercetări viitoare cu privire la rolul deținut de FSHR în carcinogeneză. La momentul actual, înțelegerea rolului exact al FSHR în carcinogeneză folosind imunohistochimia poate fi investigat în mod pragmatic doar prin utilizarea unor anticorpi fiabili și foarte specifici.

## **Studiul 3 – FSH ca factor de prognostic în patologia malignă testiculară. O analiză retrospectivă instituțională și recenzie a literaturii de specialitate**

### **Introducere și ipoteza de lucru**

Literatura medicală a ultimului deceniu a raportat prezența ubicuitară a FSHR la nivelul tumorilor primare maligne sau metastazelor. Tumorile testiculare maligne studiate au prezentat un număr crescut de FSHR în endoteliul vaselor sanguine peritumorale. Totuși, datorită lipsei unui echilibru între specificitatea și sensibilitatea anticorpilor anti-FSHR disponibili comercial, cuantificarea prezenței și implicațiilor

FSHR în carcinogeneză s-a dovedit a fi un „nod gordian”. Astfel, studierea posibilului rol al hormonului foliculostimulant (FSH) în modularea activității FSHR în țesuturile neoplazice ar putea reprezenta o nouă abordare de investigare a rolului FSHR în procesul de angiogeneză tumorală, precum și o nouă direcție de cercetare în domeniul oncologic.

Scopul acestui studiu pilot a fost de a testa indirect prezența și influența FSHR în carcinogeneză prin intermediul FSH seric. Prin urmare, datele prezentate în acest capitol au analizat existența unor posibile corelații între nivelul seric al FSH și recidivele tumorale maligne.

### **Material și metodă**

Au fost analizate retrospectiv 1678 determinări serice ale FSH obținute în cadrul laboratorului Synevo al IOCN în perioada 1 ianuarie 2010 – 31 decembrie 2019. În final, au fost identificați 1108 pacienți unici, dintre care doar 766 au avut cel puțin o determinare serică de FSH și au fost tratați chirurgical în cadrul IOCN. În urma analizării lotului de pacienți, două cohorte de pacienți au fost considerate eligibile, din punct de vedere numeric, pentru o analiză statistică corespunzătoare (cohorta de pacienți cu patologie primară mamară, respectiv testiculară). Datorită heterogenității și variației nivelelor serice de FSH la pacienții de gen feminin (perioadă fertilă, premenopauză sau menopauză; variabilitate în funcție de faza ciclului menstrual; etc.) s-a decis excluderea cohortei de pacienți cu patologie primară mamară. Prin urmare, efectuarea unor analize statistice cât mai precise și furnizarea unor rezultate reprezentative au constituit principalele motive pentru analizarea retrospectivă doar a cohortei de pacienți cu patologie primară testiculară.

### **Rezultate**

Grupul de studiu a inclus 38 de pacienți diagnosticați cu tumori maligne testiculare pentru care s-a practicat orhiectomie unilaterală și cel puțin o determinare serică postoperatorie de FSH. Din cele 38 de cazuri au fost excluse două cazuri cu metastaze prezente la momentul diagnosticului și un caz cu tumoră testiculară bilaterală.

Vârsta medie  $\pm$  deviația standard a grupului de pacienți cu nivele serice normale de FSH a fost de  $34,22 \pm 7,84$  ani, iar cea a grupului cu nivele serice crescute a fost de  $38,18 \pm 6,09$  ani, fără a fi sesizate diferențe semnificative statistic între mediile de vârstă ale celor două grupuri de pacienți ( $p = 0,179$ ). Grupul de pacienți cu valori serice normale ale FSH a prezentat o valoare medie  $\pm$  deviație standard de  $7,75 \pm 2,39$  mUI/mL, pe când grupul cu valori serice crescute o valoare medie de  $20,83 \pm 11,64$  mUI/mL.

Dozarea serică a FSH a fost efectuată după intervenția chirurgicală, în grupul cu FSH seric normal după o medie  $\pm$  deviație standard de  $3,28 \pm 5,27$  luni și o mediană de



1,36 luni (IQR = 1,02) (interval 0,3 - 21,96), respectiv  $5,19 \pm 7,07$  luni și o mediană de 1,66 luni (IQR = 6,86) (interval 0,43 - 22,4) pentru grupul cu FSH seric crescut. Totuși, nu a fost găsită o diferență semnificativă statistic între mediile celor două grupuri de pacienți ( $p = 0,397$ ). De asemenea, a fost investigată posibila influență a tratamentului adjuvant asupra nivelului seric de FSH. Astfel, mediana nivelului seric de FSH la pacienții cu tratament adjuvant a fost de 10,7 mUI/mL (IQR = 5,85) (interval 3,3 - 49,4), iar mediana nivelului seric de FSH la pacienții fără tratament adjuvant a fost 6,65 mUI/mL (IQR = 2,92) (range 4,9-9,9). Pacienții cu tratament adjuvant au prezentat un nivel seric al FSH semnificativ statistic mai mare decât pacienții fără tratament adjuvant ( $p = 0,04$ ).

La o urmărire mediană de 54,97 luni (interval 4,3 - 139,63), au fost decelate 6 recidive loco-regionale sau la distanță pentru întreaga cohortă de pacienți. Recidivele tumorale decelate au reprezentat procentaje diferite (11,54% versus 33,33%) în cadrul celor două grupuri de pacienți. Totuși, analiza statistică nu a evidențiat o corelație semnificativă statistică între nivelul seric al FSH și rata recidivelor tumorale ( $p = 0,162$ ). De asemenea, mediana intervalului liber de boală pentru grupul de pacienți cu FSH seric normal a fost de 36,43 luni (interval 36,16 - 49,6), respectiv 13,56 luni (interval 4,76 - 13,66) pentru grupul de pacienți cu FSH seric crescut. Numărul mic de recidive nu a permis efectuarea unor analize statistice pentru evaluarea semnificației statistice a diferențelor sesizate între medianele intervalului liber de boală.

De asemenea, a fost investigată și existența unei posibile diferențe între nivelele serice medii de FSH pentru pacienții cu recidivă tumorală comparativ cu cei fără recidivă tumorală. Cele două grupuri de pacienți (fără recidivă versus cu recidivă tumorală), nu au înregistrat o diferență semnificativă statistic ( $p = 0,470$ ) între mediile nivelurilor de FSH seric ( $11,17 \pm 9,05$  mUI/mL versus  $10,85 \pm 3,87$  mUI/mL). Medianele au fost 8,5 mUI/mL (IQR = 5,53) (interval 3,3 - 49,4) pentru pacienții fără recidivă tumorală, respectiv 11,35 mUI/mL (IQR = 6,85) (interval 5,9 - 16,2) la pacienții cu recidivă tumorală.

## **Concluzii**

În concluzie, rezultatele studiului par să indice apariția mai rapidă și într-un procentaj mai mare a recidivelor tumorale în cazul pacienților diagnosticați cu cancer testicular non-metastatic și nivele serice postoperatorii crescute ale FSH, însă fără a atinge pragul de semnificație statistică. Prin urmare, înțelegerea rolului exact al influenței și interacțiunii FSH cu FSHR în procesul de carcinogeneză rămâne un subiect controversat, interesant și complex pentru viitoarele studii de cercetare.

## Concluzii generale, originalitate și contribuții inovative

1. Utilizând o gamă variată de țesuturi normale și tumorale, primele două studii ale acestei cercetări doctorale nu au putut replica, pe țesuturile tumorale studiate, rezultatele obținute de grupul de cercetători care au utilizat FSHR323.
2. Al treilea studiu cuprins în această cercetare doctorală aduce pentru prima dată în discuție analizarea unei potențiale implicări a nivelelor serice de FSH în evoluția și prognosticul pacienților oncologici cu tumori maligne testiculare. Rezultatele finale au evidențiat lipsa unei corelații semnificative statistic între nivelul seric crescut de FSH și rata recidivelor tumorale. Totuși, nivelele serice crescute de FSH ar putea indica apariția timpurie a recidivelor tumorale. Conform rezultatelor finale ale studiului nostru, ipoteza utilizării FSH ca marker seric pentru monitorizarea pacienților oncologici diagnosticați cu tumori maligne testiculare poate constitui subiectul unor viitoare studii prospective.
3. Numeroase direcții de cercetare vor trebui abordate, explorate și apoi verificate pentru a elucida surprinzătoarea prezență ubicuitară a FSHR la nivelul tumorilor umane.
4. Lipsa protocoalelor standardizate și a anticorpilor specifici impun numeroase alte studii pentru a elucida rolul FSHR în tumorigeneză.

Am fost prima echipa de cercetători din România care a utilizat un anticorp policlonal sau monoclonal pentru investigarea FSHR în țesuturi umane tumorale. De asemenea, am raportat pentru prima dată la nivel internațional rezultate imunohistochemice comparative între doi anticorpi anti-FSHR disponibili comerciali, unul policlonal și altul monoclonal. Alte aspecte originale și contribuții aduse literaturii de specialitate, ca urmare a primelor două studii, au inclus publicații în premieră privind: analiza imunohistochimică a FSHR în țesuturi tegumentare normale și tumorale, în țesuturi mamare folosind anticorpi anti-FSHR disponibili comercial și în țesuturi tiroidiene folosind un anticorp anti-FSHR monoclonal. Al treilea studiu cuprins în această cercetare doctorală a investigat pentru prima dată posibilitatea utilizării FSH ca marker seric pentru monitorizarea pacienților oncologici diagnosticați cu tumori maligne testiculare.

În concluzie, în lipsa unei inițiative comune globale a comunității de cercetători, cercetările viitoare ale prezenței FSHR la nivelul vaselor sanguine ale formațiunilor tumorale maligne precum și rolul FSH în carcinogeneză se anunță a fi dificile și consumatoare de timp. Totuși, acestea ar putea constitui baza unor noi strategii diagnostice, terapeutice sau prognostice pentru pacienții oncologici.

---

PhD THESIS (ABSTRACT)

# Research into a novel immunohistochemical tumor marker, the FSH receptors, in various neoplasms

---

PhD Student **Eduard-Alexandru Bonci**

---

PhD Supervisor Prof. Asoc. Dr. **Doina Piciu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>Introduction</b>	13
<b>The current state of knowledge</b>	13
<b>Study 1 - FSH receptors: analysis of a polyclonal antibody as an immunohistochemical marker for cancer research</b>	14
<b>Study 2 - FSH receptors: analysis of a monoclonal antibody as an immunohistochemical marker for cancer research</b>	16
<b>Study 3 - Serum FSH as a prognostic factor in testicular malignancy. An institutional retrospective analysis and review of the literature</b>	17
<b>General conclusions, originality and innovative contributions</b>	20

## **Keywords:**

- *cancer*
- *angiogenesis*
- *follicle-stimulating hormone*
- *immunohistochemistry*

---

## **Introduction**

Approximately ten years ago, a study was published in the renowned medical journal "The New England Journal of Medicine" by French-American researchers. They used a commercially unavailable monoclonal antibody (FSHR323) and managed to highlight the surprising presence of follicle-stimulating hormone receptors (FSHR) in the endothelium of peritumoral blood vessels belonging exclusively to malignant tissues. Therefore, research over the last decade has sought to establish the role and implications of FSHR in neoplastic proliferation and the possible therapeutic or diagnostic implications of their use.

The current doctoral research started in 2016, aimed to study the role of FSHR in malignant tumor proliferation.

## **The current state of knowledge**

FSHR is a glycosylated transmembrane protein and a member of the G protein-coupled receptor family. Historically, these receptors have been considered to be present only in ovarian granular cells and Sertoli cells. Somewhat more controversial are reports describing FSHR in ovarian and testicular endothelial cells, uterus, adipocytes, chondrocytes, osteoclasts, monocytes and hepatocytes.

Recently, their presence has been identified in a wide range of malignant human proliferations. A study that included 1336 patients diagnosed with different primary cancer types (prostate, bladder, kidney, breast, colon, pancreas, liver, lung, stomach, testicle, ovary) analyzed pathological anatomy specimens obtained after surgical treatment. The results demonstrated the presence of FSHR in the endothelium of blood vessels located at the periphery of the tumors, over a distance of about 10 mm intra- and extratumoral. Once the presence of FSHR in the endothelium of blood vessels adjacent to malignant tumors was highlighted using a highly specific FSHR monoclonal antibody (FSHR323), this led to the formulation of a new hypothesis: FSHR receptors play a crucial role in carcinogenesis and tumor angiogenesis.

Numerous studies have tried to demonstrate the presence of FSHR in several neoplasms, but their role has not yet been fully elucidated.

# **Study 1 - FSH receptors: analysis of a polyclonal antibody as an immunohistochemical marker for cancer research**

## **Introduction and study hypothesis**

Various groups of researchers have tried to identify and quantify the presence of FSHR in various malignant solid tumors and demonstrate its presumed role in angiogenesis. The present study aimed to optimize the methodology used to identify FSHR. Thus, a commercially available polyclonal antibody was evaluated for immunohistochemical research of FSHR in extragonadal tissues. Immunohistochemical staining was performed on a wide range of normal, benign and malignant human tissues. The approach aimed to assess the differences and similarities between the results obtained in various tissues and compare the present study findings with the ones reported by other research teams.

## **Material and method**

Sixteen samples of different human tissues (benign and malignant tumors) were collected for analysis during surgery performed in the "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Institute of Oncology from Cluj-Napoca, Romania (IOCN). Immunohistochemical staining with polyclonal anti-FSHR antibody was performed on a 4 µm thick paraffin section of each tissue specimen. An optimized staining protocol was developed after the research team used the NovoLink Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, Newcastle, UK) to perform several immunohistochemistry tests using a tailored approach that improved the manufacturer's instructions. A descriptive scale was used to characterize the intensity of immunohistochemical staining for FSHR: negative, weak, moderate or intense staining.

## **Results**

In normal ovarian tissue, intense staining for FSHR was observed in the cortical stroma, granular cells, thecal cells and endothelium of blood vessels. The histiocytes also showed intense staining. In pathological ovarian tissue, the antibody was tested on both benign and malignant tissues. Benign ovarian serous cystadenofibroma showed intense staining for FSHR on both the epithelial component and endothelium of blood vessels. High-grade serous ovarian carcinoma showed negative staining for tumor cells, but the coloration was intensely positive for histiocytes and moderately positive in blood vessel endothelium. Components of normal testicular tissue, such as Leydig cells, Sertoli cells, germ cells and blood vessel endothelium, showed intense immunoreaction. Using a test sample of testicular seminoma, results similar to those mentioned above were obtained,

specimens displaying intense staining of Leydig cells, Sertoli cells, germ cells and blood vessels endothelium.

Performing immunohistochemistry with the anti-FSHR polyclonal antibody on normal skin tissue showed moderate and intense staining of the epidermis of inflammatory cells and the endothelium of blood vessels. In a malignant melanoma skin tissue sample, the anti-FSHR polyclonal antibody led to the intense staining of the inflammatory cells and the moderate staining of the epidermal basal layer; negative staining of tumor melanocytes was observed.

Thyroid follicular adenoma showed intense immunostaining in the apical poles of cells and inflammatory foci. Moderate staining was observed in the endothelium of the blood vessels. Thyroid papillary carcinoma was uniform and moderate in color. Moreover, histiocytes present in both tissue samples showed an intense immunoreaction.

The ductal epithelium cells and basal myoepithelial cells from normal breast tissue displayed moderate staining. Acinar epithelial cells presented weak staining. The analyzed benign tumor breast tissue (fibroadenoma) showed intense staining of the epithelium, respectively, moderate staining of blood vessel endothelium. The triple-negative invasive breast carcinoma, without neoadjuvant chemotherapy, showed a weak coloration of tumor cells and an intense positive immunoreaction in the endothelium of blood vessels located at the periphery of the tumor. Both neoadjuvant chemotherapy-treated and non-treated luminal invasive breast carcinoma subtype A had a weak, almost negative coloration of tumor cells. Tissue samples from patients treated with neoadjuvant chemotherapy showed intense staining of the blood vessel endothelium, compared to the specimens from patients without neoadjuvant chemotherapy that displayed negative staining.

Finally, immunoreaction tests were performed on a benign fibrohistiocytic tumor and a malignant fibroblastic tumor (myxofibrosarcoma). The benign fibrous histiocytic tissue revealed intense staining of inflammatory cells and blood vessels endothelium. Mixofibrosarcoma showed intense immunoreaction in tumor cells, inflammatory foci, and blood vessels endothelium.

## **Conclusions**

In conclusion, the polyclonal antibody used in our research proved unsatisfactory for FSHR identification in extragonadal tissues; therefore we cannot recommend this approach. The exact role of FSHR in carcinogenesis can only be investigated by immunohistochemistry with the help of highly specific antibodies, such as the FSHR323 antibody.

## **Study 2 - FSH receptors: analysis of a monoclonal antibody as an immunohistochemical marker for cancer research**

### **Introduction and study hypothesis**

Study 1 demonstrated that the use of a commercially available polyclonal antibody was highly sensitive but had relatively low specificity. Thus, we evaluated the practicality of a monoclonal antibody that was commercially available but had not been used in the immunohistochemical research of FSHR in extragonadal tissues.

### **Material and method**

Sixteen samples of different human tissues (benign and malignant tumors) were analyzed and obtained following the IOCN. For each tissue sample, immunohistochemistry with a monoclonal anti-FSHR antibody was performed on a 4  $\mu\text{m}$  thick paraffin section. An optimized staining protocol was developed after the research team used the NovoLink Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, Newcastle, UK) to perform several immunohistochemistry tests using a tailored approach that improved the manufacturer's instructions. A descriptive scale was used to characterize the intensity of immunohistochemical staining for FSHR: negative, weak, moderate or intense staining.

### **Results**

In normal ovarian tissues, a weakly positive coloration of granular cells and thecal cells was highlighted; all other cell types were negative, except for histiocytes, which showed an intensely positive immunoreaction. Benign ovarian serous cystadenofibroma displayed negative staining. High-grade serous ovarian carcinoma showed no FSHR immunoreaction in tumor cells, but the coloration was strongly positive for histiocytes. Moreover, the blood vessel endothelium had no immunoreaction. Leydig cells, Sertoli cells, germ cells and blood vessel endothelium from normal testicular tissue presented a weak positive immunoreaction. The testicular seminoma tissue showed similar results to those mentioned above.

Performing immunohistochemistry with the anti-FSHR monoclonal antibody did not reveal a positive immunoreaction in any of the cellular structures of normal skin tissue. In a tissue sample of malignant skin melanoma, the anti-FSHR monoclonal antibody showed intense staining only for histiocytes.



Immunocoloration was negative in thyroid follicular adenoma and thyroid papillary carcinoma, except for histiocytes, which showed intense immunoreaction in both tissue samples.

There was no positive immunoreaction in tissue samples from the normal and benign breast (fibroadenoma). Immunohistochemistry with the anti-FSHR monoclonal antibody for the three breast carcinoma samples did not reveal any positive intra- or intercellular structure.

Finally, immunoreaction tests were performed on a sample of benign fibrohistiocytic tumor and a specimen of malignant fibroblastic tumor (myxofibrosarcoma). The benign fibrous histiocyte tissue revealed poor staining of inflammatory cells and blood vessels endothelium. The myxofibrosarcoma specimen showed a negative immunoreaction, except for a weak positivity observed in the inflammatory foci.

### **Conclusions**

In conclusion, the use of immunohistochemistry in order to highlight FSHR is currently a precarious approach. The monoclonal antibody used in our experiment did not show reliable results for FSHR analysis in extragonadal tissue. Therefore, we cannot currently recommend this research pathway for future investigation regarding the role of FSHR in carcinogenesis. The immunohistochemistry approach in the study of FSHR in carcinogenesis can yield pragmatic results only using reliable and highly specific antibodies.

## **Study 3 – Serum FSH as a prognostic factor in testicular malignancy. An institutional retrospective analysis and review of the literature**

### **Introduction and study hypothesis**

The medical literature of the last decade has reported the ubiquitous presence of FSHR in primary malignancies or metastases. The malignant testicular tumors that were included in studies showed an increased number of FSHR in the peritumoral blood vessel endothelium. However, due to the lack of a balance between the specificity and sensitivity of commercially available anti-FSHR antibodies, quantifying the presence and implications of FSHR in carcinogenesis is a "Gordian knot". Thus, investigating the role of follicle stimulating hormone (FSH) in modulating FSHR activity in neoplastic tissues

could be a novel approach to study FSHR in the process of tumor angiogenesis, as well as a new direction cancer research.

This pilot study aimed to indirectly test the presence and influence of FSHR in carcinogenesis via serum FSH. Therefore, the data presented in this chapter analyzed the existence of possible correlations between serum FSH levels and malignant tumor recurrence.

### **Material and method**

A retrospective analysis was performed on 1678 serum FSH determinations processed in the IOCN Synevo laboratory between the 1<sup>st</sup> of January 2010 and the 31<sup>st</sup> of December 2019. Finally, 1108 unique patients were identified, of which only 766 had at least one serum FSH determination and were surgically treated in IOCN. Following the analysis of this group of patients, two cohorts of patients were considered eligible regarding size for an appropriate statistical analysis (cohort of patients with primary breast and testicular pathology). Due to the heterogeneity and variation of serum FSH levels in female patients (fertile period, premenopause or menopause; variability depending on the menstrual cycle phase; etc.), female patients with primary breast pathology were excluded. Therefore, an accurate statistical analysis that could generate representative results was the main reason for selecting patients with primary testicular pathology as the cohort of patients included.

### **Results**

The study group included 38 patients diagnosed with testicular malignancies for whom both unilateral orchiectomy and at least one postoperative serum FSH determination were performed. Three cases were excluded: two patients with metastases at the moment of diagnosis and one patient with bilateral testicular tumor.

The mean age  $\pm$  standard deviation of patients with normal serum FSH levels was  $34.22 \pm 7.84$  years and  $38.18 \pm 6.09$  years for the group with elevated serum levels, without statistically significant differences between the means ( $p = 0.179$ ). Concerning FSH serum level, the group of patients with normal serum FSH had a mean  $\pm$  standard deviation of  $7.75 \pm 2.39$  mIU/mL, while the group with high serum values had a mean value of  $20.83 \pm 11.64$  mIU/mL.

Serum FSH dosing was performed after surgery in the group with normal serum FSH after a mean  $\pm$  standard deviation period of  $3.28 \pm 5.27$  months and a median of 1.36 months (IQR = 1.02) (range 0.3 - 21.96), respectively  $5.19 \pm 7.07$  months and a median of 1.66 months (IQR = 6.86) (range 0.43 - 22.4) for the group with elevated serum FSH. However, no statistically significant difference was found between the two groups of patients ( $p = 0.397$ ). The possible influence of adjuvant treatment on serum

FSH levels was also investigated. Thus, the median serum FSH level in patients with adjuvant treatment was 10.7 mIU/mL (IQR = 5.85) (range 3.3 - 49.4) and the median serum FSH level in patients without adjuvant treatment was 6.65 mIU/mL (IQR = 2.92) (range 4.9–9.9). Patients with adjuvant therapy had a statistically higher serum FSH level than patients without adjuvant therapy ( $p = 0.04$ ).

At a median follow-up period of 54.97 months (range 4.3 - 139.63), six loco-regional or distant recurrences were detected for the entire cohort of patients. The tumor recurrences represented different percentages (11.54% versus 33.33%) in the two groups of patients. However, the statistical analysis did not reveal a statistically significant correlation between the serum level of FSH and the rate of tumor recurrence ( $p = 0.162$ ). Moreover, patients with normal serum FSH had a median period of the disease-free interval of 36.43 months (range 36.16 - 49.6), while patients with elevated serum FSH had a median of 13.56 months (range 4.76 - 13.66) of disease-free interval. However, the small number of recurrences did not allow statistical analyses to assess the statistical significance of the differences between the medians of the disease-free interval.

The existence of a possible difference between mean serum FSH levels for patients with tumor recurrence compared to those without tumor recurrence was also investigated. The two groups of patients (no recurrence versus tumor recurrence) did not show a statistically significant difference ( $p = 0.470$ ) between the mean levels of serum FSH ( $11.17 \pm 9.05$  mIU/mL versus  $10.85 \pm 3.87$  mIU/mL). The medians were 8.5 mIU/mL (IQR = 5.53) (range 3.3 - 49.4) for patients without tumor recurrence and 11.35 mIU/mL (IQR = 6.85) (range 5.9 - 16.2) in patients with tumor recurrence.

## **Conclusions**

In conclusion, the study results seem to indicate a faster and higher percentage of tumor recurrence in patients diagnosed with non-metastatic testicular cancer and elevated postoperative serum levels of FSH, but without reaching the statistical significance threshold. Therefore, understanding the exact role of FSH influence and interaction with FSHR in the carcinogenesis process remains a controversial, exciting and complex topic for future research studies.

## **General conclusions, originality and innovative contributions**

1. Examining a wide range of normal and tumor tissues, the first two studies of this doctoral research could not replicate the results obtained by the group of researchers who used FSHR323.
2. The third study included in this doctoral research addressed for the first time the potential involvement of serum FSH in the evolution and prognosis of cancer patients with testicular malignancies. The final results did not prove a statistically significant correlation between the elevated serum FSH levels and tumor recurrence rate. However, elevated serum FSH levels may be an early indicator for the onset of tumor recurrence. According to the final results of our study, the hypothesis of using FSH as a serum marker for monitoring cancer patients diagnosed with testicular malignancies may be the subject of future prospective studies.
3. Numerous research directions will need to be addressed, explored and verified to elucidate the surprising ubiquitous presence of FSHR in human tumors.
4. The lack of standardized protocols and specific antibodies requires numerous other studies to elucidate the role of FSHR in tumorigenesis.

We were the first team of researchers in Romania to use a polyclonal or monoclonal antibody to investigate FSHR in human tumor tissues. For the first time internationally, we also reported comparative immunohistochemical results between two commercially available anti-FSHR antibodies, one polyclonal and one monoclonal. As a result of the first two studies, we mention the following first-time publications among our original contributions to the literature: results of immunohistochemical analysis of FSHR in normal and cancerous skin tissues, respectively in breast tissues using commercially available anti-FSHR antibodies and in thyroid tissues using a monoclonal anti-FSHR antibody. The third study included in this doctoral research was the first investigation that assessed the possibility of using FSH as a serum marker for follow-up purposes in patients with testicular malignancies.

In conclusion, in the absence of a joint global initiative of the research community, future research on the presence of FSHR in the blood vessels of malignant tumors, respectively the role of FSH in carcinogenesis seems to be a time-consuming and challenging approach. However, this hypothesis could be the basis for new diagnostic, therapeutic or prognostic strategies for cancer patients.