

# **“Biomarcadores no Tumor Testicular de Células Germinativas: O Presente e o Futuro”**

**Marta Silva Serra**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Medicina**

(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Dr. Mário José Pereira Lourenço

**março de 2024**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Marta Silva Serra, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 41422 de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 04 /03 /2024



## Dedicatória

Ao meu Nini, à minha Nem, à minha Titi e à minha Mãe.

Ao meu avô Couto e à minha avó Celeste.

Dizer que vos amo é pouco.

Dedicar-vos este trabalho é pouco.

Fizeram de mim o que eu sou hoje. Apoiam-me incondicionalmente, em todos os momentos da minha vida. São tudo para mim. São todo o meu coração.

Dedico-vos esta Dissertação, e dedicar-vos-ei, sempre, todos os restantes trabalhos que farei ao longo do meu percurso, porque não há ninguém que esteja tão presente na minha vida, que me apoie tanto e que tenha tanto orgulho em mim como vocês, a minha família, a minha essência, o meu tudo.

Sei que ainda tenho muito caminho para percorrer, mas que esta Dissertação seja um primeiro marco de tudo o resto que estará por vir.

*“I’m on the hunt for who I’ve not yet become”*



## Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Mário Lourenço, por toda a compreensão, disponibilidade e atenção demonstradas desde o início deste trabalho até à sua conclusão.

Aos meus padrinhos, Alcides e Carla, e à Beatriz, por serem a minha família de coração, por tudo o que são e fazem por mim, e por me apoiarem desde sempre.

A todos aqueles que têm um lugar especial no meu coração, que acompanham o meu percurso e que me apoiam desde sempre, mesmo estando longe fisicamente. Um obrigada especial à minha Ana, por ser a minha metade e a pessoa que está sempre lá para mim; à Joana, por ser a amizade que nunca muda; e às minhas Vivi e Mariana por me apoiarem incondicionalmente em tudo e mais alguma coisa.

À Covilhã, que tanto me acabou por dar, a casa que se acabou por tornar. Às pessoas que esta cidade me trouxe e às quais não tenho palavras suficientes para agradecer tudo o que fizeram por mim. Entre os momentos mais felizes, até aos momentos mais complicados que enfrentei durante estes anos, vocês têm sido a constante motivação e o contínuo apoio que me fez e que me faz continuar a cada dia.

À Catarina e à Sara, as minhas *roomies*, que estão a meu lado desde o primeiro segundo desta jornada e que me dão os melhores conselhos nos meus muitos momentos de aflição.

A ti, Mafalda, por tudo o que temos partilhado, por nunca duvidares e acreditares sempre em mim, por seres o meu arco-íris e a minha luz nos dias mais escuros. Às minhas Marianas, Oliveira, por seres a minha parceira diária de todos os momentos, a minha força extra e a minha eterna confidente; Peixoto, por seres a pessoa que me fez redescobrir o que me faz realmente feliz e por teres essa tua personalidade que me mostra a cada momento que a vida tem tantas aventuras bonitas para se viverem; Lourenço, por seres a pessoa que me faz querer sonhar e explorar cada parte do mundo de mochila às costas e a que me transmite tanta energia e espontaneidade.

Ao Mário e ao Rui, por termos partilhado tantos momentos, por poder contar convosco para tudo o que precisar e por me terem feito encontrar a casa que já há muito tempo precisava.

Não seria quem sou hoje se não vos tivesse na minha vida e nada deste trabalho teria sido possível realizar sem vocês.



## Resumo

O cancro testicular é a neoplasia sólida mais prevalente entre os jovens adultos do sexo masculino, com uma crescente incidência. A heterogeneidade dos Tumores Testiculares de Células Germinativas (TTCGs) e as limitações dos biomarcadores séricos tradicionais, como AFP, LDH e  $\beta$ -hCG impulsionaram a procura por novos marcadores, mais sensíveis e específicos para a melhoria do diagnóstico, estadiamento e *follow-up*.

A pesquisa de biomarcadores emergentes revelou avanços notáveis com a introdução de biomarcadores moleculares e epigenéticos, tais como os micro-RNAs, cfDNA e CTCs, e biomarcadores imunológicos e imunohistoquímicos, que apresentam propriedades capazes de superar as limitações dos métodos convencionais. Entre todos, o miR-371a-3p destaca-se pela sua elevada sensibilidade e especificidade na identificação precoce de TTCGs, diferenciação histológica e predição de recidivas.

A integração destas descobertas na prática clínica tem o potencial de redefinir os padrões de diagnóstico, prognóstico e tratamento, melhorando significativamente os resultados clínicos. No entanto, reflete-se a necessidade crescente de validação destes biomarcadores inovadores com estudos mais abrangentes para a sua incorporação na prática clínica.

## Palavras-chave

Tumores Testiculares; Tumores Testiculares de Células Germinativas; Biomarcadores; Biomarcadores Séricos; Biomarcadores Imunológicos e Imunohistoquímicos; Diagnóstico; *Follow-up*; AFP;  $\beta$ -HCG; LDH; micro-RNAs; miR-371a-3p; cfDNA; CTCs



## **Abstract**

Testicular cancer is the most prevalent solid neoplasm among young adult males, with an increasing incidence. The heterogeneity of Testicular Germ Cell Tumours (TGCTs) and the limitations of traditional serum biomarkers such as AFP, LDH, and  $\beta$ -hCG have driven the search for new, more sensitive, and more specific markers to enhance diagnosis, staging, and follow-up.

Emerging biomarker research has shown notable progress with the introduction of molecular and epigenetic biomarkers, such as microRNAs, cfDNA, and CTCs, as well as immunological and immunohistochemical biomarkers, which possess properties capable of overcoming the limitations of conventional methods. In this group, miR-371a-3p stands out for its high sensitivity and specificity in early identification of TGCTs, histological differentiation, and prediction of relapses.

The integration of these findings into clinical practice has the potential to redefine standards for diagnosis, prognosis, and treatment, significantly improving clinical outcomes. However, there is a growing need for validation of these innovative biomarkers through more comprehensive studies before their incorporation into clinical practice.

## **Keywords**

Testicular Tumours; Testicular Germ Cell Tumours; Biomarkers; Serum Biomarkers; Immunological and Immunohistochemical Biomarkers; Diagnosis; Follow-up; AFP (Alpha-fetoprotein);  $\beta$ -HCG (Beta-human chorionic gonadotropin); LDH (Lactate dehydrogenase); microRNAs; miR-371a-3p; cfDNA (cell-free DNA); CTCs (Circulating Tumour Cells).



# Índice

<b>Dedicatória</b> .....	v
<b>Agradecimentos</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Palavras-chave</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>Índice</b> .....	xiii
<b>Lista de Figuras</b> .....	xvi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xvii
<b>Lista de Acrónimos</b> .....	xix
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Metodologia</b> .....	3
<b>3. Tumores Testiculares</b> .....	4
<b>3.1 Epidemiologia, Etiologia e Visão Geral</b> .....	4
<b>3.2 Subtipos Histológicos</b> .....	5
<b>3.3 Apresentação Clínica e Diagnóstico</b> .....	7
<b>4. Biomarcadores Tumorais</b> .....	9
<b>4.1 Definição e Formas de Obtenção</b> .....	9
<b>4.2 Aplicabilidade, Importância e Relevância</b> .....	10
<b>5. Biomarcadores Atuais/ Tradicionais</b> .....	12
<b>5.1 Biomarcadores Séricos</b> .....	12
<b>5.1.1 AFP</b> .....	13
<b>5.1.2 <math>\beta</math>-hCG</b> .....	13
<b>5.1.3 LDH</b> .....	14
<b>5.2 Limitações</b> .....	15
<b>6. Novos Biomarcadores</b> .....	17
<b>6.1 Biomarcadores Séricos Moleculares/ Epigenéticos</b> .....	17
<b>6.1.1 micro-RNAs</b> .....	17
<b>6.1.2 cfDNA e ctDNA</b> .....	23

<b>6.1.3 CTCs</b> .....	24
<b>6.1.4 Outros</b> .....	25
<b>6.2 Biomarcadores Imunológicos e Imunohistoquímicos</b> .....	26
<b>6.2.1 c-KIT (CD117) e CD30</b> .....	27
<b>6.2.2 SALL4</b> .....	28
<b>6.2.3 OCT3/4 e NANOG</b> .....	29
<b>6.2.4 SOX2 e SOX17</b> .....	29
<b>6.2.5 LIN28A</b> .....	30
<b>6.2.6 HMGA1/2 e Aurora B cinase</b> .....	30
<b>7. Limitações e Perspetivas Futuras</b> .....	31
<b>8. Conclusão</b> .....	33
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	34



## Lista de Figuras

<b>Figura 1. Esquema dos diferentes tipos de TTCGs</b> (adaptada de Cheng et al (7); NCGIS- Neoplasia de Células Germinativas <i>In Situ</i> ; Seta a tracejado- indica uma possível via, não estabelecida, da progressão tumoral) .....	6
<b>Figura 2. Classificação dos Biomarcadores</b> (adaptado de Mirsha A. e Verma M (2010)(11)) .....	11

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1. Classificação TNM para o Cancro Testicular (adaptada de (3)).....</b>	<b>8</b>
<b>Tabela 2. Sumário das informações relativas aos biomarcadores séricos tradicionais AFP, <math>\beta</math>-hCG e LDH (adaptada de (4,9,15–19)) .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 3. Comparação da capacidade diagnóstica dos biomarcadores clássicos e dos principais clusters de miRNAs .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 4. Resumo da Capacidade Diagnóstica do miR-371a-3p.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 5. Expressão diagnóstica de potenciais biomarcadores imunohistoquímicos (adaptada de (12,67)) .....</b>	<b>27</b>



## Lista de Acrónimos

AFP -	Alfa-Fetoproteína
AURKB -	Aurora B Cinase
AJCC -	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
cfDNA -	<i>Cell free DNA</i>
ctDNA -	<i>Circulating Tumor DNA</i>
CTC -	<i>Circulating Tumor Cell</i>
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
E -	Especificidade
EAU -	<i>European Association of Urology</i> - Associação Europeia de Urologia
ECD -	Exames Complementares de Diagnóstico
IU -	Unidade Internacional
LDH -	Lactato Desidrogenase
mRNA	RNA Mensageiro
miRNA -	micro Ácido Ribonucleico
NCGIS -	Neoplasia de Células Germinativas <i>In Situ</i>
NSE -	Enolase Neuro-Específica
OMS -	Organização Mundial de Saúde
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
PLAP -	Fosfatase Alcalina Placentária
TC -	Tomografia Computorizada
TNM -	T- Tumor, N- Gânglios Linfáticos, M-Metástases
TRA-1-60 -	Anticorpo do Recetor das Células T <i>locus</i> alfa-1-60
TTCG -	Tumor Testicular de Células Germinativas
TTCNG -	Tumor Testicular de Células Não Germinativas
RASSF1am -	Gene Supressor Tumoral da Família de Domínio de Associação Ras1, Isoforma A, Metilado
RNA -	Ácido Ribonucleico
S -	Sensibilidade
β-hCG -	Gonadotrofina Coriónica Humana, subunidade β



## 1. Introdução

O cancro testicular, apesar de raro, é a neoplasia sólida mais comum entre os jovens adultos do sexo masculino, representando apenas cerca de 1% de todos os cancros na idade adulta. A incidência do cancro testicular tem vindo a aumentar nas últimas décadas, sendo a população caucasiana europeia a que apresenta um maior aumento anual, de cerca de 6%. (1–3)

Histologicamente, o cancro testicular divide-se em Tumores Testiculares de Células Germinativas (TTCGs), que representam 90% a 95% de todos os tumores testiculares, sendo os restantes 5% a 10% classificados em Tumores Testiculares de Células Não Germinativas (TTCNGs). Por sua vez, os TTCGs dividem-se em Seminomas, que constituem 60% destes tumores, e em Não Seminomas, perfazendo os restantes 40%, que englobam o carcinoma embrionário, o carcinoma do saco vitelino, o coriocarcinoma e o teratoma. (1)

Tendo em conta o aumento da incidência desta neoplasia, bem como a heterogeneidade que os tumores testiculares apresentam, torna-se evidente a necessidade de existirem biomarcadores universais que permitam um diagnóstico precoce, uma constante monitorização da doença e a avaliação do prognóstico. Atualmente, os biomarcadores mais comumente utilizados no diagnóstico e estadiamento do cancro testicular compreendem a alfafetoproteína (AFP, produzida pelas células do saco vitelino), a lactato desidrogenase (LDH) e a gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG, expressa pelos trofoblastos). (1)

Um biomarcador ideal deve apresentar uma elevada especificidade e sensibilidade e deve ser facilmente acessível para uma determinação não invasiva. No entanto, estes biomarcadores séricos clássicos apresentam limitações, já que se encontram elevados noutros tipos de cancros, bem como em diversas situações clínicas, o que aumenta o número de falsos positivos e confere-lhes uma baixa especificidade. (1,4) Assim, tem-se tornado cada vez mais premente a validação de novos biomarcadores com maior sensibilidade e especificidade relativamente aos tradicionalmente utilizados.

Recentemente, têm sido estudados novos biomarcadores séricos epigenéticos e moleculares, nomeadamente micro-RNAs, cfDNA, ctDNA e CTCs, bem como potenciais biomarcadores imunológicos e imunohistoquímicos, como c-KIT, OCT3/4, SALL4, SOX2/17, entre outros. Diversos estudos levados a cabo têm demonstrado a capacidade diagnóstica destes biomarcadores, revelando a sua potencial aplicabilidade clínica, já que conseguem ultrapassar, na maioria dos casos, a sensibilidade e especificidade diagnósticas dos biomarcadores séricos tumorais clássicos.

Desta forma, esta revisão bibliográfica tem como objetivos primários rever e analisar a informação atualmente existente no âmbito dos biomarcadores de TTCGs, avaliar a utilidade e aplicabilidade clínicas dos biomarcadores clássicos, identificar as principais limitações associadas aos mesmos, rever estudos de investigação recentes relativos a novos biomarcadores com potencial clínico e avaliar a sua eficácia. Como objetivos secundários, pretende-se explorar as perspetivas futuras desta área de investigação, avaliar os principais desafios e limitações ainda existentes e destacar a importância da implementação clínica de novos biomarcadores no diagnóstico, prognóstico e *follow-up* dos pacientes com TTCGs.

## 2. Metodologia

Para a redação desta revisão narrativa bibliográfica foi realizada, de uma forma não sistemática, a pesquisa e análise de um conjunto de artigos científicos, de língua inglesa, indexados na base de dados “*PubMed*”. Para pesquisa, utilizaram-se os termos *mesh* “*testicular germ cell tumour*”, “*testicular germ cell tumour biomarkers*”, “*testicular cancer biomarkers*” e “*testicular tumour new biomarkers*”, sendo feita uma restrição de espaço temporal para artigos publicados, entre os anos de 2012 e 2023.

Foram utilizados como critérios de inclusão artigos de investigação científica com estudos realizados apenas em seres humanos, artigos científicos de investigação e de revisão que abordassem biomarcadores relacionados com tumores testiculares de células germinativas, que demonstrassem e comparassem a aplicabilidade clínica entre os biomarcadores clássicos e os biomarcadores mais recentes e que discutissem as suas perspetivas futuras. Excluíram-se os artigos de investigação realizados em animais, os artigos que não se concentrassem na descrição de biomarcadores utilizados no âmbito de tumores testiculares de células germinativas e os que não abordassem a sua aplicabilidade clínica, nem as inovações feitas nesta área.

Realizou-se a pesquisa direta de artigos de investigação mencionados na bibliografia consultada, independentes do espaço temporal selecionado. Foram ainda analisadas as últimas *Guidelines* da Associação Europeia de Urologia relativas ao Cancro Testicular (2023).

## 3. Tumores Testiculares

### 3.1 Epidemiologia, Etiologia e Visão Geral

Apesar da sua relativa raridade, o cancro testicular assume uma posição de destaque entre as neoplasias sólidas, sendo a forma mais comum de cancro entre os jovens adultos do sexo masculino. Compreender a epidemiologia deste tipo de cancro é crucial, uma vez que, embora represente apenas cerca de 1% de todos os cancros em adultos e 5% dos cancros urológicos, a sua incidência tem apresentado um aumento notável nas últimas décadas, particularmente nos países ocidentais, podendo atingir 3 a 11 casos por 100 000 homens por ano. (1–3)

As taxas de incidência mais elevadas registam-se nos países industrializados, como a Europa, América do Norte e Austrália, perfazendo, em conjunto, 49,6% do total de casos mundiais. Os números são particularmente elevados na Europa, sendo que a população caucasiana europeia é a que reporta um maior aumento da incidência de cancro testicular anual, de aproximadamente 6%. (1) Em 2020 registaram-se cerca de 25 000 novos casos de cancro testicular, o que representa 33,7% de todos os casos mundiais. De realçar que, nesse mesmo ano, os principais 10 países com taxas de incidência de cancro testicular mais elevadas foram todos europeus. (2)

O cancro testicular engloba quer os Tumores Testiculares de Células Germinativas (TTCGs), quer os restantes Tumores de Células Não Germinativas (TTCNGs). Focando a atenção para os TTCGs, acredita-se que a sua origem está relacionada com defeitos na maturação normal dos gonócitos, durante a espermatogénese. Pensa-se que os TTCGs se desenvolvem a partir de uma Neoplasia de Células Germinativas Intratubular pré-maligna, também designada por Neoplasia de Células Germinativas *In Situ* (NCGIS). (5,6)

A nível epigenético, os TTCGs são frequentemente caracterizados por anomalias cromossómicas e baixas taxas de mutações somáticas, sendo a marca genética mais comum, entre os diferentes subtipos, a amplificação do braço curto do cromossoma 12 (12p). (5,7) Foi relatado que a maioria dos TTCGs com um perfil invasivo, relacionados com a NCGIS, apresentam uma sobre-expressão de um isocromossoma do braço curto do cromossoma 12 (i12p), enquanto os restantes apenas apresentam cópias adicionais do cromossoma 12p, sem a formação do isocromossoma. Assim, o i12p pode constituir um marcador genético específico deste subtipo de tumores testiculares. (6,7)

A nível dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de neoplasia testicular, destaca-se a presença de criptorquidismo (anomalia genética em que há ausência da descida dos testículos até à bolsa escrotal), de hipospádias (deficiência congénita na qual o orifício uretral não se localiza na cabeça do pénis), de história pessoal e/ou familiar de cancro testicular e infertilidade ou baixa concentração espermática. São igualmente de realçar a existência de defeitos no desenvolvimento sexual, a idade (sendo a maior incidência entre os 15 e os 40 anos) e a etnia (sendo a raça caucasiana a que apresenta a maior incidência). (2,3,5,7–10) Dos fatores referidos, o maior risco relativo é conferido por se ter um irmão com antecedentes de cancro testicular, o que aumenta o risco em, aproximadamente, 10 vezes. Já a presença de criptorquidismo aumenta o risco em 3,7 a 7,5 vezes. (2,9)

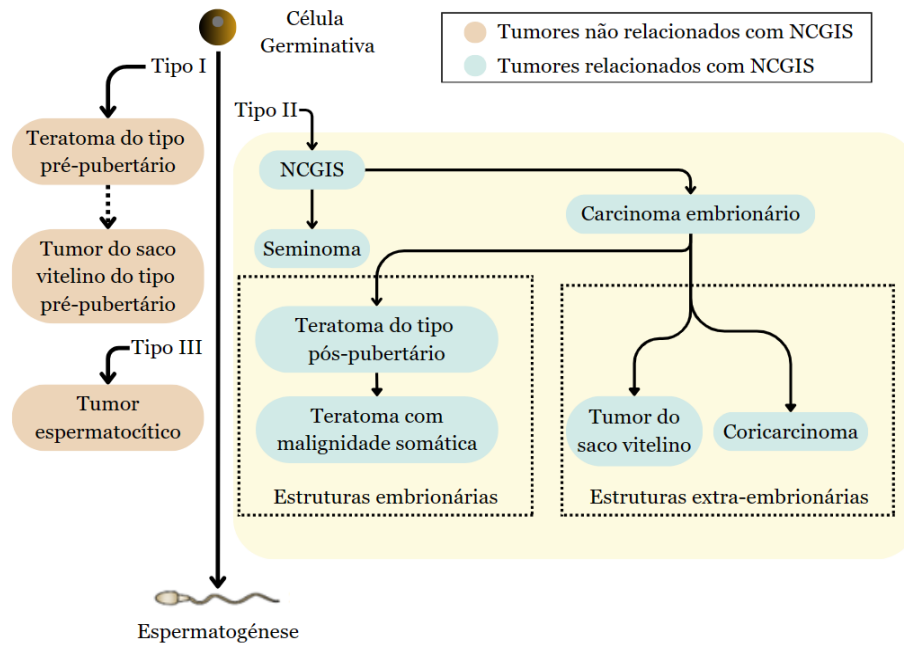
### 3.2 Subtipos Histológicos

O cancro testicular pode ser dividido, consoante a sua histologia, em Tumores Testiculares de Células Germinativas (TTCGs), que representam 90% a 95% de todos os tumores testiculares, sendo a restante pequena percentagem classificada em Tumores Testiculares de Células Não Germinativas (TTCNGs). (1–3)

De acordo com o sistema de classificação dos tumores testiculares de células germinativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), bem como das mais recentes *Guidelines* da Associação Europeia de Urologia (EUA), os TTCGs dividem-se em três principais grupos (representados na *Figura 1*): (3,6,7)

- **TTCGs Tipo I:** Tumores que ocorrem, predominantemente, em pacientes de idade pré-pubertária, cuja origem não está relacionada com NCGIS;
- **TTCGs Tipo II:** Tumores que se originam de NCGIS, em idade pós-pubertária;
- **TTCGs Tipo III:** Tumores espermatocíticos, diagnosticados numa idade mais avançada, sem origem em NCGIS.

Por sua vez, os TTCGs Tipo II podem-se subdividir em Seminomas (que correspondem a 60%), e em Não Seminomas (cerca de 40%). Os últimos englobam o carcinoma embrionário, o carcinoma do saco vitelino, o coriocarcinoma e o teratoma, sendo que a maioria dos Não Seminomas acaba por ser constituída por tumores mistos destes quatro subtipos histológicos. (1,9) No entanto, para além desta divisão clássica geral, existem muitos outros subtipos, uma vez que os TTCGs apresentam uma elevada heterogeneidade histológica. (1,7)



**Figura 1. Esquema dos diferentes tipos de TTCGs** (adaptada de Cheng et al (7); NCGIS- Neoplasia de Células Germinativas *In Situ*; Seta a tracejado- indica uma possível via, não estabelecida, da progressão tumoral)

Adicionalmente, os TTCNGs, que perfazem menos de 5% dos tumores testiculares, não derivam de NCGIS nem apresentam alterações no cromossoma 12p. Compreendem os tumores testiculares adultos e os tumores para-testiculares, com uma apresentação clínica semelhante aos restantes tumores testiculares. No entanto, apenas são identificados após examinação histológica e, por serem extremamente raros, requerem uma avaliação multidisciplinar aquando do seu diagnóstico.(3)

Dentro deste tipo de tumores existem os seguintes subtipos: (3)

- **Tumores Espermatocíticos:** ocorrem exclusivamente nos testículos e não apresentam elevação dos marcadores tumorais;
- **Tumores Estromais do Cordão Espermático:** são relativamente incomuns, mas representam o 2º maior grupo de tumores testiculares primários, sendo os TTCGs o 1º. Este subtipo inclui os Tumores das células de Leydig, os Tumores das células de Sertoli, os Tumores das células da Granulosa, os Tumores de grupo Tecoma/Fibroma e os Tumores Paratesticulares dos Epidídimos e do Cordão Espermático;
- **Mesotelioma da Túnica Vaginal Testicular:** tumor raro, mas bastante agressivo, estando recomendado um tratamento local precoce mais agressivo, como a hemiescrotectomia.

### 3.3 Apresentação Clínica e Diagnóstico

O tumor testicular pode-se apresentar de diversas formas clínicas, sendo a mais comum a presença de uma massa testicular indolor ou um achado ecográfico acidental. (3) Adicionalmente, também se pode manifestar como um nódulo escrotal doloroso (em cerca de 27% dos pacientes), como um endurecimento, ou pelo surgimento de um sintoma após um evento traumático. É ainda de realçar a possibilidade de existir um quadro sintomático de dor abdominal, dor lombar, dor nos flancos, rigidez testicular, sensação de peso ou inchaço escrotal. (3,8) Outros pacientes podem revelar aumento dos gânglios linfáticos, presença de massas retroperitoneais ou ginecomastia. (9)

Perante achados suspeitos ou existência de sintomatologia inespecífica é importante proceder-se à contínua avaliação do quadro. Após recolha da história clínica, com a descrição detalhada dos sintomas apresentados, deve ser feito um exame físico completo, de ambos os testículos e, na presença de achados suspeitos de malignidade, tais como áreas endurecidas, firmes ou fixas ao tecido escrotal aderente, devem ser feitos exames complementares de diagnóstico (ECD). (3,8)

Para o diagnóstico de tumor testicular ser feito, para além do exame físico, devem ser prescritos outros ECD, ocupando a ecografia transescrotal o primeiro lugar, enquanto exame inicial preferencial de avaliação de massas testiculares, e que apresenta uma sensibilidade de 92% a 98% e uma especificidade de 95% a 99,8%. A ecografia confirma a presença de massa testicular, determina a sua localização intra ou extratesticular, indica o volume e a localização anatómica da lesão e avalia o testículo contralateral, descartando outras lesões. A presença de uma massa com características indicativas de TTCGs na ecografia, nomeadamente heterogeneidade, hipoeogenicidade e presença de vascularização, requer a referenciação para uma orquiectomia inguinal radical, já que é o procedimento de diagnóstico patológico definitivo, bem como a base do tratamento inicial nestes casos. (3,8,9)

Para estadiamento da neoplasia, recorre-se ao sistema TNM (T- tumor, N- gânglios linfáticos, M- metástases), ao qual se acrescenta o ponto “S”, correspondente aos marcadores séricos tumorais (*Tabela 1*). Assim, procede-se à quantificação pré-operatória dos marcadores séricos tumorais ( $\beta$ -hCG, AFP e LDH), bem como à sua quantificação pós-operatória, como medida de prognóstico e consequente *follow-up*. Acrescentando, para identificar possíveis metástases, recorre-se à Tomografia Computorizada (TC) abdominal, pélvica e/ou torácica, bem como, quando necessário, a outros exames imagiológicos. (3,8,9)

**Tabela 1. Classificação TNM para o Cancro Testicular** (adaptada de (3))

<b>pT-Tumor Primário</b>			
<b>pTX</b>	Tumor primário não pode ser avaliado*		
<b>pTo</b>	Sem evidência de tumor primário (ex. cicatriz histológica nos testículos)		
<b>pTis</b>	Neoplasia de células germinativas <i>in situ</i>		
<b>pT1</b>	Tumor limitado aos testículos e epidídimos sem invasão vascular/linfática; tumor pode invadir a túnica albugínea mas não a túnica vaginalis**		
<b>pT2</b>	Tumor limitado aos testículos e epidídimos com invasão vascular/linfática; ou tumor com extensão através da túnica albugínea com envolvimento da túnica vaginalis		
<b>pT3</b>	Tumor invade o cordão espermático com ou sem invasão vascular/linfática		
<b>pT4</b>	Tumor invade o escroto com ou sem invasão vascular/linfática		
<b>N- Gânglios Linfáticos Regionais (Clínico)</b>			
<b>NX</b>	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados		
<b>No</b>	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais		
<b>N1</b>	Metástase com massa no gânglio linfático de 2 cm ou menos na maior dimensão ou múltiplos gânglios linfáticos, nenhum deles com mais de 2 cm na maior dimensão		
<b>N2</b>	Metástase com massa no gânglio linfático maior que 2 cm, mas não maior que 5 cm na sua maior dimensão; ou mais de 5 gânglios positivos, nenhum com mais de 5 cm; ou evidência de extensão extraganglionar do tumor		
<b>N3</b>	Metástase com massa no gânglio linfático maior que 5 cm na sua maior dimensão		
<b>pN- Gânglios Linfáticos Regionais (Patológico)</b>			
<b>pNX</b>	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados		
<b>pNo</b>	Gânglio linfático regional sem metástases		
<b>pN1</b>	Metástase com massa no gânglio linfático de 2 cm ou menos na maior dimensão e 5 ou menos gânglios positivos, nenhum com mais de 2 cm na sua maior dimensão		
<b>pN2</b>	Metástases com massa no gânglio linfático maior que 2 cm mas não mais que 5 cm na sua maior dimensão; ou mais que 5 gânglios positivos, nenhum maior que 5 cm; ou evidência de extensão extraganglionar do tumor		
<b>pN3</b>	Metástases no gânglio linfático maior que 5 cm na sua maior dimensão		
<b>M- Metástases Distantes</b>			
<b>MX</b>	Metástases distantes não podem ser avaliadas		
<b>Mo</b>	Não existem metástases distantes		
<b>M1</b>	Existem metástases distantes ***		
<b>M1a</b>	Metástases dos gânglios linfáticos não regionais ou do pulmão		
<b>M1b</b>	Metástases distantes para além dos gânglios linfáticos não regionais ou do pulmão		
<b>S- Marcadores Tumorais Séricos (Pré-quimioterapia)</b>			
<b>SX</b>	Estudos de marcadores séricos não disponíveis ou não realizados		
<b>So</b>	Níveis de estudo de marcadores séricos dentro dos limites normais		
	<b>LDH (U/l)</b>	<b>hCG (mIU/mL)</b>	<b>AFP (ng/mL)</b>
<b>S1</b>	<1,5 X N	e <5 000	e <1 000
<b>S2</b>	1.5-10 x N	ou 5 000-50 000	ou 1 000-10 000
<b>S3</b>	>10 x N	ou >50 000	ou >10 000

\*Exceto para pTis e pT4, onde a orquiectomia radical nem sempre é necessária para fins de classificação, a extensão do tumor primário é avaliada na amostra de orquiectomia radical;

\*\*A 8ª edição do AJCC subdivide o seminoma puro T1 em T1a e T1b dependendo do tamanho não superior a 3cm ou superior a 3cm na maior dimensão;

\*\*\*A 8ª edição do AJCC considera a invasão dos tecidos moles hilares e a invasão do epidídimo como pT2, enquanto o envolvimento descontínuo do cordão espermático é considerado como pM1.

## **4. Biomarcadores Tumoraais**

### **4.1 Definição e Formas de Obtenção**

De entre várias definições, um biomarcador pode ser descrito como qualquer substância, estrutura ou processo biológico que possa ser objetivamente mensurado no corpo humano (quer na circulação sanguínea, quer noutros fluidos corporais). Reflete a forma como este responde ou reage a diferentes processos, quer fisiológicos quer condições patológicas, ou a certas terapêuticas e intervenções. (11,12) Os biomarcadores podem ser proteínas (enzimas, recetores), ácidos nucleicos (miRNAs, cfDNA, ctDNA), péptidos, ou ser o resultado de alterações genéticas, epigenéticas, proteómicas ou metabólicas. (13) Assim, os biomarcadores tumorais podem corresponder a uma molécula especificamente secretada pelo tumor ou corresponder a processos biológicos resultantes da sua presença, traduzindo a existência de neoplasia. (12,13)

Existem diferentes técnicas de obtenção e medição dos biomarcadores, sendo a maior distinção entre as técnicas invasivas, como a biópsia sólida de amostras tecidulares específicas, e as técnicas não invasivas, como a biópsia líquida. (14,15)

As biópsias sólidas tecidulares são, atualmente, o método utilizado para se estudar o meio tumoral e, conseqüentemente, a informação molecular que este proporciona. No entanto, esta técnica está associada a diversas implicações, quer a nível da complexidade e riscos associados ao procedimento clínico, quer a nível do aumento de possíveis danos para o paciente, o que tem justificado a procura por métodos mais acessíveis e mais cómodos de se realizarem. (14,15) Outras desvantagens inerentes às biópsias sólidas, como custos financeiros mais elevados, necessidade de um meio cirúrgico para a realização do procedimento e aumento do tempo despendido para esta técnica, podem condicionar um atraso no início do tratamento, comprometendo o prognóstico da doença. (14)

Destarte, têm sido estudados e investigados diferentes métodos que permitam quantificar biomarcadores, de uma forma minimamente invasiva, tal como é o caso da biópsia líquida. (15) Esta consiste na obtenção de biomarcadores tumorais existentes, quer em amostras de fluidos corporais, quer na circulação sanguínea (através de amostras de sangue ou da análise do soro ou do plasma), quer em excreções ou secreções (fezes, urina, expetoração). (13,14)

Acredita-se que estes biomarcadores sejam libertados para a corrente sanguínea durante a apoptose ou a necrose de células tumorais, sendo que a sua elevada concentração no sangue

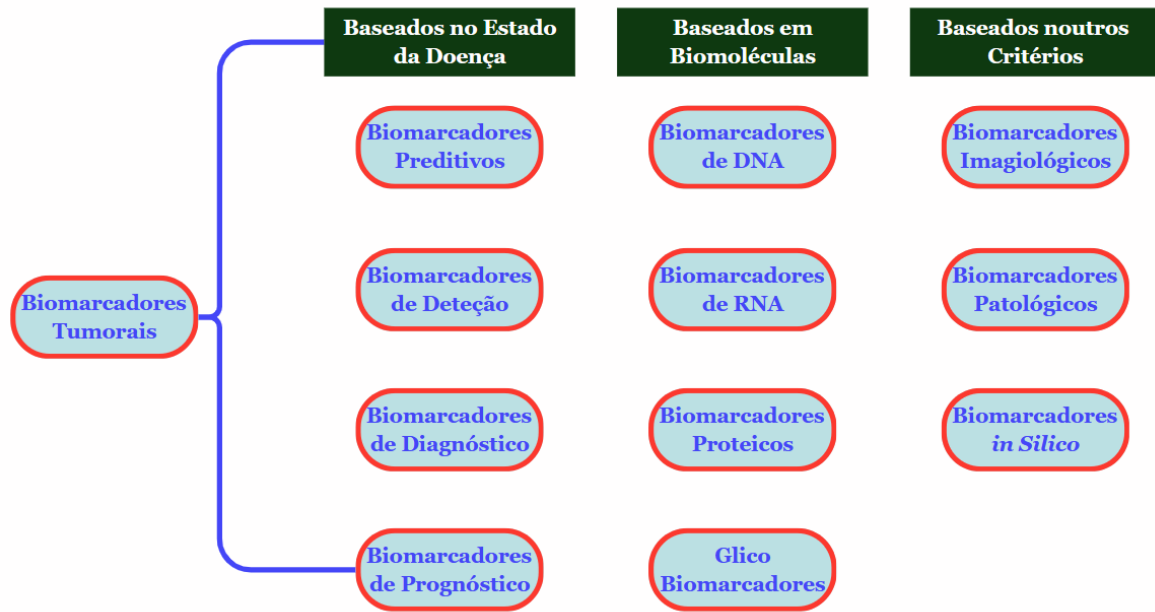
ou noutros fluidos corporais pode contribuir para diminuir o tempo associado ao diagnóstico, conduzindo a uma melhoria no prognóstico global. (14) Desta forma, a biópsia líquida permite, de uma maneira mais acessível, de uma forma mais confortável, mais rápida e com menos custos associados, analisar a dinâmica tumoral, bem como a sua heterogeneidade. (15)

## **4.2 Aplicabilidade, Importância e Relevância**

Com o desenvolvimento e inovação biotecnológica têm surgido cada vez mais métodos de classificação de biomarcadores tumorais, não havendo uma única distinção das suas aplicabilidades clínicas. (11)

De uma forma geral, os biomarcadores podem ter diferentes finalidades, destacando-se as de avaliação de risco (predisposição e probabilidade de determinada pessoa desenvolver cancro); rastreio (detecção precoce de neoplasia); diagnóstico (avaliar a presença ou ausência de cancro e distinguir entre achados benignos e malignos, auxiliando no diagnóstico diferencial); prognóstico (probabilidade de existir recorrência de doença, na ausência de tratamento); predição (prever a resposta do paciente a um determinado tratamento, avaliando a eficácia de diferentes tipos de tratamento); monitorização (monitorizar a probabilidade de recorrência após a terapêutica ou monitorizar a resposta ou progressão da doença). Adicionalmente, podem ser reportadas outras aplicabilidades dos biomarcadores, tais como farmacodinâmicas (auxiliam na monitorização das doses dos fármacos utilizados em diversos tratamentos, na sua dose ótima, abaixo do seu nível de toxicidade), entre outras. De realçar que diferentes aplicabilidades clínicas podem ser fornecidas por um mesmo biomarcador. (11–13)

Acrescentando, conforme a classificação feita por *Mirsha e Verma* (11), apresentada na *Figura 2*, os biomarcadores tumorais podem ainda ser divididos de acordo com o estado da doença em que o paciente se encontra; de acordo com o tipo de biomoléculas correspondentes ao biomarcador; ou segundo outros critérios variados, tais como imagiológicos, patológicos, entre outros.



**Figura 2. Classificação dos Biomarcadores** (adaptado de Mirsha A. e Verma M (2010)(11))

Desta forma, as diferentes funcionalidades dos biomarcadores conferem-lhes uma extrema importância e relevância na gestão adequada e atempada da doença. Auxiliam desde a fase pré-diagnóstica (de rastreio e avaliação do risco), passando pela fase diagnóstica (contribuindo para um diagnóstico precoce), até à fase pós-diagnóstica (com a instituição da melhor terapêutica e monitorização da resposta da neoplasia aos fármacos usados, bem como a restante evolução da mesma).

A crescente necessidade de se encontrarem biomarcadores capazes de melhorar o diagnóstico pré-orquiectomia, aprimorar o *follow-up* dos pacientes ao diminuir a necessidade de se realizarem exames imagiológicos de rotina, entre outros, tem vindo a motivar o aumento da contínua investigação no âmbito de potenciais novos biomarcadores. (1,15) Assim, torna-se premente obter o melhor biomarcador capaz de complementar os procedimentos atuais de diagnóstico e seguimento na área dos TTCGs.

## 5. Biomarcadores Atuais/ Tradicionais

### 5.1 Biomarcadores Séricos

A AFP (alfafetoproteína), a  $\beta$ -hCG (gonadotrofina coriônica humana) e a LDH (lactato desidrogenase) são os biomarcadores tumorais séricos globalmente utilizados que auxiliam a gestão clínica dos pacientes com TTCGs, encontrando-se elevados em, aproximadamente, 60% dos tumores testiculares. (15,16)

Estes biomarcadores devem ser determinados antes e após a orquiectomia, assim como durante o período de *follow-up*. Se após a orquiectomia for obtido um declínio dos biomarcadores inferior ao esperado, poderá revelar-se um quadro de doença metastática, sendo necessário realizar mais exames imagiológicos e, caso tal se confirme, iniciar um tratamento mais dirigido e agressivo, como a quimioterapia. Por sua vez, se após o tratamento primário se obtiver uma redução inicial dos biomarcadores, com um aumento subsequente no período de *follow-up*, pode-se estar perante uma recidiva tumoral, sendo extremamente importante atuar rapidamente, a nível terapêutico. Desta forma, estes biomarcadores são, atualmente, muito importantes para o diagnóstico atempado de TTCGs, para o estadiamento da doença, para monitorização do sucesso terapêutico e para a previsão e deteção precoce de recidivas da doença, durante o seu seguimento. (9,16,17)

Os dados relativos a estes biomarcadores foram publicados, essencialmente, no século passado, havendo poucos estudos recentes que retratem e que elucidem melhor a associação da sua positividade com os diferentes parâmetros clínicos. Recentemente, *Dieckmann* et al. publicou um estudo coorte retrospectivo em pacientes com TTCGs, com o objetivo de pesquisar a frequência da elevação da concentração destes biomarcadores séricos, assim como a associação entre a sua positividade e diferentes características clínicas. De forma geral, com este estudo, demonstrou-se uma elevação sérica de, pelo menos, um dos três biomarcadores em 59,5% de todos os casos da coorte de pacientes com TTCGs, e de uma elevação de  $\beta$ -hCG, AFP e LDH em 37,9%, 25,6% e 32,9% dos casos, respetivamente. (17)

As taxas de prevalência de cada um dos biomarcadores é significativamente maior nos Não Seminomas do que nos Seminomas. A taxa de elevação de  $\beta$ -hCG e de LDH correlacionou-se igualmente com um estadiamento clínico mais avançado, em comparação à doença localizada, enquanto os valores médios de AFP não revelaram ser significativamente diferentes consoante os estadiamentos clínicos. (17)

Entre estes três biomarcadores, a AFP e a  $\beta$ -hCG são os mais informativos e particularmente mais importantes e decisivos para determinar o prognóstico dos pacientes com TTCGs, bem como auxiliar na avaliação de resultados. Por sua vez, o LDH é um biomarcador mais inespecífico, sendo, no entanto, igualmente útil na determinação do prognóstico e estratificação do risco dos pacientes, especialmente em caso de não seminomas disseminados. (9)

### **5.1.1 AFP**

A AFP (alfa-fetoproteína) é uma glicoproteína produzida, no primeiro trimestre da gestação, pelo saco vitelino, e, nos últimos trimestres, pelo fígado fetal, com algum contributo do restante trato gastrointestinal. (16,18,19) A AFP é a principal proteína de ligação sérica fetal, contribuindo para o transporte de hormonas, minerais, bilirrubina, entre outros. Após o parto, as funções e a elevada concentração desta proteína são substituídas pela albumina, derivada, exclusivamente, do fígado. (18,19)

A AFP desempenha um papel de biomarcador tumoral, especialmente a nível dos TTCGs, sendo que os seus valores se elevam, em cerca de 50% a 70% dos não seminomas, maioritariamente nos tumores do saco vitelino e, raramente, em carcinomas embrionários e teratomas imaturos. Em contrapartida, a AFP não é detetada na presença de seminomas. (15) No entanto, tal como demonstrado na *Tabela 2*, esta glicoproteína encontra-se elevada em diferentes condições clínicas de etiologia tumoral, como carcinoma hepatocelular, pancreático e pulmonar, assim como patologias não neoplásicas, tais como várias formas de doença hepática crónica, em pacientes sujeitos a procedimentos cirúrgicos envolvendo o trato gastrointestinal ou o fígado, entre outras. Desta forma, é preciso ter em conta as elevações da AFP que não estão associadas a TTCGs, nomeadamente se for uma concentração moderadamente elevada, mas estável. Se existir uma concentração elevada, que vai aumentando constantemente, pode-se estar perante um não seminoma, possivelmente metastático, requerendo uma monitorização mais rigorosa. (9,15)

### **5.1.2 $\beta$ -hCG**

A hCG (gonadotrofina coriónica humana) é um heterodímero composto por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . (20) É produzida pelas células placentárias (os sinciotrofoblastos) e promove, essencialmente, a diferenciação dos órgãos fetais durante a gestação, sendo assim detetável durante a gravidez. No entanto, além dos sinciotrofoblastos, os tumores trofoblásticos e não trofoblásticos também expressam hCG. (15,20) Ensaios capazes de determinar concentrações tanto de hCG isolada, como da sua

subunidade  $\beta$ -hCG, têm sido recomendados para a monitorização e gestão da conduta terapêutica, particularmente, em tumores testiculares. (20)

A nível dos TTCGs, a hCG é, maioritariamente, produzida pelos componentes do coriocarcinoma não seminomatoso. (17,19) Acrescentando, geralmente, são detetadas elevadas concentrações séricas de hCG em 40-50% dos não seminomas e concentrações mais reduzidas em 15-20% dos seminomas. (19,20) Para além de se encontrar elevada nos TTCGs, tal como evidenciado na *Tabela 2*, a  $\beta$ -hCG pode também ser mensurada noutras situações clínicas, como na presença de carcinoma gástrico, neuroendócrino, pulmonar, linfomas, adenocarcinomas, entre outros. A presença de hipogonadismo ou hipertiroidismo pode contribuir para o registo de falsos positivos, aumentando a concentração da  $\beta$ -hCG. Deste modo, em casos de elevação moderada deve-se ter em conta as diferentes condições que podem estar associadas a esse aumento antes de se proceder a um diagnóstico ou tratamento, uma vez que as elevações da  $\beta$ -hCG não são específicas dos TTCGs. (9,16)

### **5.1.3 LDH**

A LDH (lactato desidrogenase) é uma enzima da via glicolítica que catalisa a conversão do L-lactato a piruvato, desempenhando uma função importante na regulação do metabolismo celular. (15,19) É um tetrâmero composto por 2 subunidades e apresenta 5 isoenzimas (LDH-1 a LDH-5). (21)

A LDH encontra-se globalmente presente no citoplasma de todas as células humanas, variando a composição da isoenzima nos diferentes tecidos corporais. A LDH-1 encontra-se predominantemente nos eritrócitos, coração e rim, enquanto a LDH-5 predomina no fígado e músculo esquelético. As restantes derivam, essencialmente, de leucócitos, gânglios linfáticos, pulmão e baço. A isoenzima que mais se expressa nos TTCGs é a LDH-1, elevada em 40%-60% de todos os TTCGs. (15,17,21)

Níveis elevados de LDH podem ocorrer em diversas condições clínicas como distúrbios músculo-esqueléticos, hemólise celular, enfarte do miocárdio, embolismo pulmonar, entre outros (*Tabela 2*). A sua elevada concentração pode ainda estar relacionada com o aumento do *turnover* celular, associado a diferentes processos fisiológicos, ou a síndrome de lise tumoral, presente em diferentes neoplasias. (15,19)

**Tabela 2. Sumário das informações relativas aos biomarcadores séricos tradicionais AFP,  $\beta$ -hCG e LDH (adaptada de (4,9,15-19))**

	<b>AFP</b>	<b><math>\beta</math>-hCG</b>	<b>LDH</b>
<b>Local de produção</b>	Saco vitelino; fígado	Sinciciotrofoblastos	Presente no citoplasma de todas as células humanas
<b>Valores séricos normais</b>	<12ng/ml	1IU/L a 5-10IU/L	Depende do local da amostra recolhida
<b>Seminomas</b>	Nunca elevada nos seminomas puros	Elevada em 15%-20%	Elevada em 40%-60%
<b>Não Seminomas</b>	Elevada em 50%-70%	Elevada em 40%-60%	Elevada em 40%-60%
<b>Outros tumores que elevam os valores normais</b>	Hepatocelular; gástrico; pancreático; pulmonar; colorretal	Neuroendócrino; vesical; pulmonar; cabeça e pescoço; gastrointestinal; colo do útero; vaginal; linfoma; leucemia; adenocarcinoma	Linfomas; carcinoma pulmonar de pequenas células; tumores ósseos (sarcoma de Ewing, osteossarcoma);
<b>Outras condições clínicas que elevam os valores normais</b>	Consumo crónico de álcool; Doenças hepáticas crónicas (hepatite, cirrose); obstrução do trato biliar; ataxia telangiectasia hereditárias	Hipogonadismo; hipertiroidismo	Doenças hemolíticas; insuficiência renal; enfarte do miocárdio; embolismo pulmonar; infeções; inflamação; atividade física rigorosa

## 5.2 Limitações

Tal como evidenciado anteriormente, assim como exposto na *Tabela 2*, apesar da AFP, LDH e  $\beta$ -hCG serem os biomarcadores tumorais séricos convencionais utilizados para o auxílio no diagnóstico e restante *follow-up* no âmbito dos tumores testiculares, a sua concentração pode estar elevada em muitas outras condições clínicas, tornando-se uma das principais limitações destes biomarcadores.

De realçar que, uma vez que concentrações normais podem não excluir doença, ou, já que qualquer um dos três marcadores pode estar igualmente elevado noutras patologias ou estados fisiológicos, estes biomarcadores apresentam limitações quanto à sua sensibilidade e especificidade, respetivamente. (15)

Para um biomarcador ser considerado clinicamente útil e eficaz, para além de necessitar de uma boa relação custo/benefício, tem de apresentar uma alta sensibilidade e especificidade, ser de rápido acesso, ser obtido de uma forma minimamente invasiva e ser capaz de fornecer resultados num curto espaço de tempo. Destarte, as limitações relativas à especificidade e sensibilidade associadas à AFP, LDH e  $\beta$ -hCG têm-se tornado, cada vez mais, um obstáculo à sua contínua aplicação universal, especialmente em pacientes com seminomas (em que a

concentração de AFP não apresenta utilidade para o seguimento ou estratificação do risco). (1,4,19)

Atualmente, o foco dos cuidados de saúde tem sido direcionado para a melhoria da sobrevida e qualidade de vida do paciente, para a otimização das terapêuticas existentes e para a procura de novos meios que permitam orientar a tomada de decisões terapêuticas em cenários clínicos mais complicados. (4) Deste modo, tendo em conta que os biomarcadores séricos tradicionais não respondem na sua totalidade às crescentes exigências clínicas, torna-se necessária a contínua procura por marcadores mais sensíveis e mais específicos, capazes de tornar o diagnóstico mais atempado e preciso, assim como a monitorização mais eficiente da evolução da doença.

## 6. Novos Biomarcadores

### 6.1 Biomarcadores Séricos Moleculares/ Epigenéticos

#### 6.1.1 micro-RNAs

Os micro-RNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificante, constituídos por cerca de 19 a 24 nucleótidos, que controlam a expressão genética a nível pós-translacional, através da interação direta com o RNA mensageiro (mRNA). Desempenham funções reguladoras importantes relacionadas, nomeadamente, com o crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular. Sabe-se, ainda, que os miRNAs regulam os genes supressores tumorais e os oncogenes, apresentando um potencial carcinogénico, uma vez que a sua expressão se encontra desregulada em situações neoplásicas. (1,4,22–24)

No cancro, os miRNAs que funcionam como oncogenes, ao silenciar os genes supressores tumorais, encontram-se elevados, enquanto os miRNAs responsáveis por inibir a transcrição de oncogenes, funcionando como supressores tumorais, estão diminuídos, o que leva ao aumento de oncogenes e conseqüente desenvolvimento tumoral. Tal foi demonstrado, inicialmente, por Voorhoeve *et al.*, que constatou que os miRNAs, particularmente, o miR-372 e o miR-373, funcionam, efetivamente, como oncogenes e estão envolvidos na tumorigénese dos TTCGs, através da supressão da via p53. (25) Os miRNAs são assim libertados pelas células cancerígenas na corrente sanguínea, podendo assumir uma função de biomarcadores séricos não invasivos, facilmente obtidos por biópsia líquida. (1,4,15,22–26)

Os micro-RNAs apresentam características adicionais que os tornam distintos dos restantes biomarcadores séricos tumorais, conferindo-lhes vantagens a nível do diagnóstico e restante *follow-up*. São moléculas estáveis em diferentes fluidos corporais e após colheita de amostras sanguíneas; são fáceis de obter sem causar danos adicionais ao paciente; são mais resistentes à degradação enzimática; apresentam um tempo de semi-vida mais curto que os biomarcadores séricos tradicionais (<24h); e o seu padrão de expressão permite avaliar o estadió e a progressão tumoral de forma dinâmica e em tempo real. (4,22,23)

Estas moléculas são ainda específicas para a linhagem celular de interesse, podendo funcionar como uma vantagem no âmbito do diagnóstico e monitorização dos tumores testiculares, uma vez que todos têm origem numa célula germinal primordial. (4) Desta forma, o papel dos miRNAs na área dos TTCGs tem sido cada vez mais estudado e aprofundado, ao longo das últimas décadas.

A primeira associação entre TTCGs e microRNAs reporta, tal como já referido, o ano de 2006 por Voorhoeve *et al.*, tendo sido feitos estudos ao longo dos últimos anos que caracterizaram a expressão de diferentes *clusters* de miRNAs e que confirmaram a sua sobre-expressão universal em TTCGs. (4,22,25,27) Entre os vários miRNAs existentes, demonstrou-se que os mais associados e específicos para os TTCGs são os pertencentes ao *cluster* miR-371-3 (miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p), localizado no cromossoma 19, o miR-367-3p e o *cluster* miR-302 (miR-302a-3p, miR-302b-3p e miR-302c-3p), localizados no cromossoma 4. (23,27)

Inicialmente, demonstrou-se que estes *clusters* se encontravam mais elevados em pacientes com diferentes subtipos histológicos de TTCGs ou até NCGIs, com exceção de teratomas, relativamente a pacientes saudáveis, pacientes com TTCNGs, ou pacientes com massas testiculares não neoplásicas. Foi igualmente registada a redução dos níveis elevados de miRNAs para o seu valor basal após realização de quimioterapia, revelando possíveis propriedades diagnósticas e prognósticas destes biomarcadores. (28–36) Efetivamente, constatou-se que os miRNAs, essencialmente pertencentes aos *clusters* miR-371-3 e miR-367, podem ser usados para diagnosticar TTCGs, com uma sensibilidade diagnóstica superior aos biomarcadores tradicionais (consultar *Tabela 3*). (33,37)

Foi ainda documentada a correlação dos níveis de miRNAs com o estadió clínico, bem como a sua elevada concentração na presença de doença metastática ou localmente avançada. Verificou-se, de igual modo, o aumento destes níveis em casos de doença residual e recidiva tumoral, após tratamento inicial. Com efeito, Plaza *et al.*, concluiu que os níveis de miR-371a-3p, miR-373-3p e miR-367-3p estavam mais elevados antes do início da quimioterapia em pacientes que desenvolveram uma recidiva do que nos que atingiram remissão completa. Tais achados revelaram, assim, a potencial aplicabilidade clínica destes microRNAs no prognóstico e *follow-up* dos TTCGs. (31,33,37,38)

**Tabela 3. Comparação da capacidade diagnóstica dos biomarcadores clássicos e dos principais clusters de miRNAs**

			AFP	HCG	miR371a-3p		miR-373-3p		miR367-3p		Obs.
A.	Tp. Est.	População Estudada	S	S	S	E	S	E	S	E	
Gillis <i>et al.</i> , 2013 (37)	Estudo Retrospectivo	80 TTCGs; 47Ctrls; 11 amostras pré e pós orquiectomia; 12 massas testiculares não-TTCGs	36%	57%	98%	48,3%	98%	48,3%	98%	48,3%	A “S” e “E” dos clusters de miRNAs foi analisada em conjunto.
van Aghhoven <i>et al.</i> , 2017 (33)	Estudo Retrospectivo	1 SE e 5 NS recidivantes	50%	67%	100%	---	100%	---	75%	---	
Dieckmann <i>et al.</i> , 2017 (39)	Estudo Retrospectivo	166 TTCGs; 12 TTCNGs 106 Ctrls (12 saudáveis e 94 com PTB)	50%	50%	88,7%	93,4%	---	---	---	---	A “S” de AFP, HCG e LDH foi analisada em conjunto.
Dieckmann <i>et al.</i> , 2019 (40)	Estudo Prospetivo Multicêntrico	616 TTCGs (359 SE e 257 NS); 258 Ctrls	<50%	<50%	90,1%	94,0%	---	---	---	---	A “S” de AFP, HCG e LDH foi analisada em conjunto, sendo <50% nos SE e um pouco mais alta em NS.
Myklebust <i>et al.</i> , 2021 (41)	Estudo Prospetivo	21 tumores não- TTCGs; 159 TTCGs (97 SE e 62 NS)	52%	51%	89%	---	---	---	---	---	
Sequeira <i>et al.</i> , 2022 (42)	Estudo Retrospectivo	107 amostras de: 56 TTCGs; 3 TTCNGs; 47 Ctrls; 1 HPTC secretor de AFP	65%	65%	93,6%	100%	---	---	---	---	A “S” de AFP, HCG e LDH foi analisada em conjunto.

A.-Autores do Estudo; Ctrls-Controlos; E-Especificidade; HPTC-Hepatocarcinoma; NS-Não Seminoma; Obs.- Observações; S-Sensibilidade; SE-Seminoma; TTCGs-Tumores Testiculares de Células Germinativas; TTCNGs-Tumores Testiculares de Células Não Germinativas; Tp. Est.- Tipo de Estudo; PTB- Patologia Testicular Benigna; “---”- Valor não especificado

Com a evolução da investigação nesta área, constatou-se que, de entre todos os miRNAs existentes, o miR-371a-3p apresenta, efetivamente, o maior poder diagnóstico, estando os estudos recentes cada vez mais focados e direcionados para a análise específica das potenciais propriedades deste biomarcador e consequente aplicabilidade clínica. Tal foi inicialmente demonstrado num estudo retrospectivo, em 2012, por Dieckmann *et al.*, que concluiu que o miR-371a-3p revelava as maiores diferenças entre os seus níveis séricos pré e pós-operatórios, de entre os restantes miRNAs do mesmo *cluster*. (30) No ano 2017, este mesmo autor, demonstrou que, efetivamente, o miR-371a-3p apresenta o maior poder discriminativo entre controlos e TTCGs, atingindo uma sensibilidade de 88,7% e uma especificidade de 93,4%. (39) Em 2019, acabou por realizar um estudo prospetivo multicêntrico e obter valores superiores de sensibilidade e especificidade diagnósticas para este biomarcador de 90,1% e 94%, respetivamente. (40)

Adicionalmente, obtiveram-se mais resultados que comprovaram a elevada eficácia e precisão diagnóstica do miR-371a-3p, comparativamente aos restantes miRNAs. Em 2017, van Aghtoven e Looijenga, num estudo retrospectivo, concluíram que, na sua junção, os miR-371a-3p, miR-373-3p e miR-367-3p apresentavam uma sensibilidade diagnóstica de 92% e uma especificidade de 91%, enquanto a análise isolada do miR-371a-3p revelou valores muito semelhantes de sensibilidade e especificidade, de 90% e 86%, respetivamente. (32) Num estudo prospetivo-retrospectivo de 2019, Nappi *et al.* demonstrou a elevada sensibilidade e especificidade diagnósticas de miR-371a-3p, no contexto de TTCGs ativo, de 96% e 100%, respetivamente. (43) Em 2021, Piao *et al.* concluiu, retrospectivamente, que o miR-371a-3p apresenta uma sensibilidade e especificidade, de 90% e 86%, respetivamente. Acrescentou que nenhuma outra combinação de miRNAs se mostrou mais eficaz no diagnóstico de TTCGs, o que comprova que a avaliação isolada do miRNA 371a-3p é suficiente para o diagnóstico de TTCGs. (44) A *Tabela 4* resume estes principais resultados relativos à sensibilidade e especificidade diagnósticas do miR-371a-3p, demonstrados por estes estudos ao longo dos anos.

Outros estudos publicados revelaram que este micro-RNA apresenta, efetivamente, um desempenho superior aos biomarcadores séricos tradicionais, com maior capacidade diagnóstica para todos os subtipos histológicos de TTCGs. De uma forma geral, o miR-371a-3p apresenta uma sensibilidade superior a 90%, enquanto a sensibilidade combinada dos biomarcadores séricos internacionalmente utilizados não ultrapassa os 70%. O miR-371a-3p é, desta forma, o biomarcador com melhor sensibilidade e precisão diagnóstica para a deteção e monitorização e pacientes com TTCGs, superando, em larga escala, o desempenho dos biomarcadores séricos tradicionais, ilustrado na *Tabela 3*. (39–42)

**Tabela 4. Resumo da Capacidade Diagnóstica do miR-371a-3p**

Capacidade Diagnóstica do miR-371a-3p							
Autores do estudo	Tipo de Estudo	População Estudada	Cluster de miRNA analisado	S	E	VPP	VPN
Syring <i>et al.</i> , 2014 (31)	Prospetivo	1º coorte: 30 TTCGs (15 SE e 15 NS), 18 Ctrls; 2º coorte: 59 TTCGs (40 SE, 19 NS), 17 NNT, 84 Ctrls	miR-302a-3p miR-302b-3p miR-302c-3p miR-367-3p miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p	84,7%	99%	--	--
van Aghoven e Looijenga, 2017 (32)	Retrospectivo	250 TTCGs (110 NS, 128 SE, 6 TT, 6 NCGIS); 60 TTCNGs; 104 Ctrls	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	90%	86%	94%	79%
Dieckmann <i>et al.</i> , 2017 (39)	Retrospectivo	166 TTCGs; 12 TTCNGs (Tumores de células de Leydig); 106 Ctrls (12 saudáveis e 94 com patologia testicular benigna)	miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p miR-367-3p	88,7%	93,4%	--	--
Leão <i>et al.</i> , 2018 (34)	Retrospectivo	82 TTCGs (NS)	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	88,7%	93,4%	94%	100%
Napi <i>et al.</i> , 2019 (43)	Prospetivo-Retrospectivo	132 amostras de 111 pacientes com dx recente de TTCG ou antecedentes	miR-371a-3p	96%	100%	100%	98%
Dieckmann <i>et al.</i> , 2019 (40)	Prospetivo Multicêntrico	616 TTCGs (359 SE e 257 NS); 258 Ctrls	miR-371a-3p	90,1%	94%	100%	98%
Piao <i>et al.</i> , 2021 (44)	Análise Multi-Institucional Retrospectiva	157 TTCGs; 172 com patologia testicular não maligna	miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p miR-367-3p	90%	85%	--	--
Sequeira <i>et al.</i> , 2022 (42)	Retrospectivo	107 amostras de: 56 TTCGs; 3 TTCNGs; 47 Ctrls; 1 hepatocarcinoma secretor de AFP	miR-371a-3p	93%	100%	100%	96%

Ctrl-Controlos; dx-Diagnóstico; E-Especificidade; NS-Não Seminoma; NCGIS-Neoplasia de Células Germinativas *in situ*; NNT-Neoplasia Não Testicular; S-Sensibilidade; SE-Seminoma; TT-Teratoma; TTCGs-Tumor Testiculares de Células Germinativas; TTCNGs-Tumor Testiculares de Células Não Germinativas; "--"-Valor Não Especificado

Tal como já havia sido demonstrado para o conjunto dos *clusters* mais associados à tumorigênese dos TTCGs, os estudos direcionados para a análise isolada do miR-371a-3p comprovaram, semelhantemente, que o aumento dos níveis deste biomarcador se associam com o estadió clínico, diâmetro e carga tumoral. Os níveis elevados em contexto de TTCGs ativos mostram uma redução após tratamento apropriado, nomeadamente em contexto pós quimioterapia ou pós orquiectomia. Comprovou-se, igualmente, que os níveis de miR-371a-3p se encontram elevados na presença de doença metastática, permitindo assim um diagnóstico mais atempado, o que poderá melhorar o prognóstico do paciente. (35,36,39,40,45-48)

Adicionalmente, evidenciou-se que existe uma elevação dos níveis de miR-371a-3p em contexto de recidiva da doença, com aumento dos mesmos à medida que a data da deteção da recidiva se ia aproximando. Porém, não existe relação entre o subsequente desenvolvimento de recidiva e os níveis deste biomarcador no momento imediato após orquiectomia. Verificou-se, ainda, o retorno aos níveis normais após remissão clínica, posteriormente à realização de quimioterapia. Comprovadamente, o miR-371a-3p é um biomarcador potencial muito sensível, precoce e não invasivo para o diagnóstico de recidiva tumoral em pacientes com TTCGs, sendo capaz de sinalizar doença residual após tratamento, no contexto de pós-orquiectomia ou de vigilância ativa. (40,43,47,49,50)

Para além de todas as características descritas, o miR-371a-3p, enquanto biomarcador, tem a capacidade de obter melhorias nas taxas de tratamento apropriado, reduzir as taxas de sobre e subtratamento e reduzir taxas de morbimortalidade associadas a certos tratamentos, como a quimioterapia. (51) Destarte, torna-se evidente a elevada capacidade diagnóstica que o miR-371a-3p apresenta, no âmbito dos TTCGs, podendo vir a tornar-se num excelente biomarcador deste tipo de tumores na prática clínica atual.

Contudo, uma das limitações apontadas ao miR-371a-3p e aos restantes miRNAs dos principais *clusters* analisados é a incapacidade de diagnosticar teratomas. No entanto, foram publicados artigos que demonstram propriedades diagnósticas de outros miRNAs, nomeadamente pertencentes ao cluster miR-375. Nappi *et al*, num estudo prospetivo multi-institucional, demonstrou que a expressão de miR-375 foi significativamente mais elevada em pacientes com teratoma residual, com uma capacidade diagnóstica de sensibilidade igual a 52% e uma especificidade de 70%. Acrescentou que a avaliação simultânea do miR-371 e do miR-375 aumentou a exatidão da previsão de teratomas, uma vez que a presença de miR-371 indica TTCGs ativo, enquanto a sua ausência e sobre-expressão de miR-375 sugere a presença de teratomas. (52) Leão *et al*. evidenciou que o supressor tumoral hipermetilado RASSF1Am detetou 88% dos teratomas, apresentando os níveis mais

elevados, igualmente, em tumores do saco vitelino, comparativamente aos outros subtipos de TTCGs. Demonstrou ainda que a combinação de RASSF1Am e de miR-371a-3p apresenta um elevado potencial de diagnóstico no âmbito dos TTCGs, o que pode potenciar a gestão clínica dos pacientes. (53)

### **6.1.2 cfDNA e ctDNA**

*Cell-free* DNA (cfDNA) são fragmentos de cadeia dupla de DNA livre circulante, não relacionados diretamente com nenhuma estrutura subcelular, molecular ou tecidual, que se encontram presentes em diversos fluidos corporais como o plasma ou soro, sendo que a sua libertação para a corrente sanguínea pensa-se estar relacionada com processos de apoptose e necrose celulares. Os seus níveis são variavelmente detetados em vários processos, quer patológicos (tumores de diferentes subtipos histológicos, doenças inflamatórias, traumatismos, sépsis, entre outros), quer fisiológicos (como a coagulação), sendo que o seu valor enquanto potencial biomarcador tumoral tem sido cada vez mais estudado ao longo dos anos. (14,54)

Com efeito, evidenciou-se o aumento dos níveis de cfDNA global em pacientes com cancro, sendo que existe uma porção de cfDNA especificamente derivada de células tumorais, o ctDNA (*circulating tumour* DNA), que pode conter as mesmas alterações genéticas e epigenéticas provenientes do tumor primário, permitindo uma investigação mais direcionada para o microambiente tumoral. A análise deste ctDNA poderá assim permitir o estudo de mutações, de alterações no número de cópias, de fusões genéticas e de metilação do DNA tumoral. Efetivamente, foi descoberto que o ctDNA encontra-se presente em níveis significativamente elevados em pacientes com diferentes tipos de cancro, especialmente em estadios avançados, sendo que a biópsia líquida baseada na análise de ctDNA poderá trazer vantagens a nível da avaliação da progressão e prognóstico tumoral. No entanto, para a sua deteção correta, são necessárias técnicas mais precisas, como métodos de fluorescência ou PCR, capazes de separar o DNA circulante tumoral do restante DNA livre circulante. (1,14,15,54,55)

No âmbito dos tumores testiculares, concluiu-se que a concentração total de cfDNA é significativamente mais elevada em pacientes com TTCGs do que em controlos saudáveis, estando a elevação dos seus níveis relacionada com a progressão da doença e a sua diminuição com a resolução do tratamento. (15,56,57) Demonstrou-se que o cfDNA permite uma distinção entre pacientes com TTCGs e indivíduos saudáveis, com uma sensibilidade de 87% e uma especificidade de 97%. De acrescentar que, mesmo em pacientes com uma concentração de biomarcadores tumorais séricos tradicionais negativa, os níveis de cfDNA

permitiram uma distinção com elevada precisão, atingindo uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 97%. (56) No entanto, não existe um limite distinto dos níveis de cfDNA para as amostras normais e para as tumorais, pelo que, sozinho, não é um biomarcador suficientemente sensível para identificar e monitorizar a gestão dos TTCGs, devendo ser feita uma avaliação e interpretação conjuntas com outros biomarcadores. (54,57)

### 6.1.3 CTCs

As CTCs são células tumorais circulantes, derivadas, principalmente, de lesões primárias durante a sua formação e desenvolvimento inicial, que circulam na corrente sanguínea com destino a potenciais locais metastáticos. São células fáceis de ser detetadas na circulação e conseguem fornecer informações, em tempo real, sobre a progressão e disseminação tumoral. (14,15)

Na prática clínica, a obtenção destas células tornou-se possível com o desenvolvimento de métodos de deteção específicos, tais como técnicas baseadas em citometria de fluxo com hibridação *in situ* (FISH), PCR em tempo real (RT-PCR) e pela extração de DNA e RNA. A técnica citométrica com maior utilidade para a quantificação das CTCs é a aplicada pelo sistema *Cell Search*, permitindo a análise direta das CTCs, caracterizando-as a nível molecular, genotipicamente e fenotipicamente. Efetivamente, o sistema *Cell Search* comprovou a relação entre a presença de CTCs antes do início da quimioterapia em alguns tipos de cancro, nomeadamente da mama, colorretal e do pulmão, sendo que a alteração no número destas CTCs, durante o tratamento, foi capaz de prever a sobrevivência dos pacientes, o que realça o seu potencial poder prognóstico. (58,59)

No âmbito dos TTCGs, Nastaly *et al.*, concluiu que, de forma geral, a deteção de CTCs encontra-se relacionada com estadios tumorais mais avançados, com uma histologia tumoral mais agressiva e com a elevação dos marcadores séricos tumorais tradicionais. Efetivamente, registaram-se percentagens de CTCs mais elevadas em pacientes com não seminomas (especialmente tumores do saco vitelino e teratomas) do que em pacientes com seminomas. Acrescentando, nos pacientes com TTCGs foi demonstrado uma percentagem superior de amostras positivas para CTCs provenientes de sangue da veia testicular, de 64%, comparativamente a amostras retiradas de sangue periférico, com apenas 18% de positividade. No entanto, nas amostras de sangue periférico, demonstrou-se uma correlação entre a presença de CTCs e o estadio clínico, atingindo-se uma positividade de 41% em pacientes com tumores metastáticos e de 100% em pacientes com doença recidivante e refratária à quimioterapia. (60)

No entanto, apesar de já ter sido demonstrado a correlação entre o aumento da concentração de CTCs em pacientes com diferentes tipos de cancro, bem como com a resposta ao tratamento, o seu valor clínico permanece controverso. É necessário realizar estudos com métodos mais padronizados, por forma a que se obtenham resultados capazes de validar e determinar a sua potencial precisão diagnóstica. (14,15)

#### **6.1.4 Outros**

Foram igualmente estudados outros biomarcadores séricos com o intuito de serem posteriormente validados para aplicação clínica. Entre estes, destacam-se a PLAP (fosfatase alcalina placentária), o TRA-1-60 (anticorpo do recetor das células T *locus* alfa-1-60), a NSE (enolase neuro-específica) e os N-glicanos. No entanto, por estarem associados a elevados falsos positivos, a sua potencialidade clínica deixou de ser alvo de investigação recente. (1,15)

A PLAP é uma proteína de ligação à membrana, expressa, geralmente, em células trofoblásticas e células germinativas fetais, não sendo expressa em espermatócitos normais do testículo adulto. Em alguns estudos foi evidenciada a presença de atividade específica desta proteína na presença de tumores testiculares, comparativamente ao tecido normal, o que a tornaria um potencial biomarcador de TTCCGs. Num estudo desenvolvido por Koshida *et al.*, foi demonstrada a elevação da concentração da PLAP em cerca de 51% dos pacientes com seminomas, mas com uma taxa de falsos positivos de 1,6% em todas as amostras analisadas. Noutros estudos, no entanto, foi detetada a sua presença em pacientes com tumores de células não germinativas, bem como registados níveis séricos elevados em fumadores, mesmo na ausência de tumor testicular. Assim, a sua potencial utilidade clínica foi perdendo credibilidade. (1,15,61,62)

O TRA-1-60 é um antigénio de superfície celular, expresso, essencialmente, por carcinoma embrionário e carcinoma *in situ* testicular. Lajer *et al.*, demonstrou que os níveis de TRA1-60 estavam elevados em 79% dos pacientes com não seminomas, especialmente do tipo carcinoma embrionário, e em 80% dos pacientes com seminomas disseminados. No entanto, após o fim da quimioterapia, 33% dos pacientes com não seminomas continuaram a apresentar valores aumentados deste marcador, sem manifestarem recidiva da doença, pondo em causa a sua utilidade clínica. Outros estudos demonstraram, a redução dos seus elevados níveis após a realização de quimioterapia, e a elevação dos níveis de TRA-1-60 cerca de 1 mês antes de qualquer evidência radiológica de reincidência tumoral. Todavia, apresenta uma taxa elevada de falsos positivos, o que o torna pouco confiável e impossibilita a sua aplicabilidade clínica. (1,63)

A NSE apresenta utilidade enquanto marcador de cancro pulmonar de pequenas células, melanoma e tumores neuroendócrinos. Adicionalmente, revelou estar elevada em pacientes com TTCGs, sendo que em cerca de 30 a 50% dos pacientes com doença ativa, os níveis elevados de NSE demonstram a existência de tecido tumoral maligno, especialmente do tipo seminoma. Efetivamente, Fosså *et al.*, concluiu que 6 de 21 pacientes com seminoma no estadio I e 11 de 16 pacientes com seminoma metastático, apresentaram uma concentração sérica de NSE elevada, normalizando após orquiectomia no primeiro grupo e mantendo-se elevada nos pacientes com doença metastática. Noutro estudo, publicado por Kuzmits *et al.*, verificou-se um aumento da NSE sérica em 73% dos pacientes com seminoma metastático, reduzindo-se ao seu valor basal após a realização de quimioterapia. Nesse mesmo estudo apenas foi registada uma elevação da concentração de NSE em cerca de 15% dos pacientes com não seminomas metastáticos. Porém, por estar associada a uma elevada taxa de falsos positivos durante a monitorização de pacientes com tumor testicular, também não foi dada continuidade ao seu potencial de biomarcador em TTCGs. (1,64,65)

Os N-glicanos têm-se mostrado promissores no que toca ao diagnóstico e prognóstico de tumores de células germinativas. As alterações nos glicanos, nomeadamente as glicosilações (modificações pós-translacionais muito comuns na maioria das proteínas), estão correntemente associadas a patologia, nomeadamente a neoplasias. Acrescentando, os níveis de N-glicanos mostraram estar elevados em pacientes com tumores testiculares, independentemente da histologia. Num estudo realizado por Narita *et al.*, concluiu-se que, a nível de diagnóstico, a concentração de N-glicanos encontrou-se elevada em 83% pacientes com TTCGs, sendo que os biomarcadores tumorais convencionais estavam negativos. Adicionalmente, verificou-se que um valor elevado de N-glicanos estava associado a um pior prognóstico. Não obstante, é necessária uma investigação mais detalhada, com a realização de estudos mais aprofundados que confirmem a utilidade dos N-glicanos para se conseguir validar o seu potencial enquanto biomarcador tumoral testicular. (1,15,66)

## **6.2 Biomarcadores Imunológicos e Imunohistoquímicos**

Ao longo dos anos tem sido investigado o potencial clínico enquanto biomarcadores testiculares, de diversos genes, marcadores imunohistoquímicos e outras proteínas, demonstrando maior capacidade diagnóstica, comparativamente aos biomarcadores tradicionais. Entre estes destacam-se o c-KIT, CD30, SALL4, OCT3/4, NANOG, SOX2/17, HMGA1/2, Aurora B cinase, entre outros. No entanto, a maioria dos estudos publicados reporta a década passada, não tendo sido continuada a investigação para a prática clínica atual. (12,61,67)

Estes biomarcadores demonstraram capacidade discriminatória entre diferentes subtipos de tumores testiculares, revelando vantagens adicionais quando analisados em associação entre eles. Como exemplo, perante um TTCGs positivo para os marcadores OCT3/4 e NANOG, que requer uma diferenciação adicional entre seminoma e carcinoma embrionário, combinações de c-KIT/SOX17 (positivos para seminomas) e CD30/SOX2 (positivos para carcinomas embrionários), podem ser bastante úteis no diagnóstico precoce e estadiamento. (67)

Uma das principais limitações destes biomarcadores imunohistoquímicos é a maioria não ser específica para os TTCGs, encontrando-se elevados noutras patologias e noutros tipos de cancro, o que limita a aplicabilidade clínica dos mesmos. Por sua vez, podem trazer vantagens na distinção e caracterização histológica adicional, assumindo uma importância no diagnóstico, estadiamento e prognóstico dos pacientes com TTCGs.

A *Tabela 5* resume a potencial aplicabilidade diagnóstica dos principais biomarcadores imunohistoquímicos, descritos de seguida.

**Tabela 5. Expressão diagnóstica de potenciais biomarcadores imunohistoquímicos** (adaptada de (12,67))

	c-KIT	CD30	SALL4	OCT4	NANOG	SOX2	SOX17	LIN28A	HMGA1	HMGA2	AUKB
<b>NGIS</b>	+	-	+	+	+	-	+	+	NE	NE	NE
<b>SE</b>	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<b>NS</b>	<b>CE</b>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	<b>TT</b>	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
	<b>CC</b>	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
	<b>TSV</b>	-	-	+	-	-	-	+/-	+	-	+

CC-Coriocarcinoma; CE-Carcinoma Embrionário; NCGIS-Neoplasia de Células Germinativas In Situ; NE-Não Especificado; NS-Não Seminomas; SE-Seminoma; TSV-Tumor do Saco Vitelino; TT-Teratoma

### 6.2.1 c-KIT (CD117) e CD30

O gene c-KIT, também conhecido por CD117, por reagir com o anticorpo do *cluster* de diferenciação 117, codifica o recetor do fator de crescimento de mastócitos/ células tronco e desempenha um papel crucial em diversos processos fisiológicos como o crescimento e proliferação celulares, a hematopoiese, a angiogénese e a gametogénese. No âmbito dos tumores testiculares, foi demonstrado que mutações ativadoras do c-KIT são consideradas oncogénicas, principalmente no contexto de seminomas, encontrando-se em elevada quantidade nestes casos, apresentando uma sensibilidade diagnóstica de 88% a 100% para este subtipo histológico. Foi registada uma elevada concentração de c-KIT em NCGIS, com uma sensibilidade de 96%, e apenas verificada uma concentração em 32% a 44% em não seminomas. Para além de estar elevado no contexto de tumores testiculares, o c-KIT

também é expresso em carcinomas pulmonares, carcinoma renal, carcinoma do timo e alguns carcinomas ováricos e da mama. (61,67,68)

O CD30 é um recetor de citocinas que pertence à família do Fator de Necrose Tumoral. Anticorpos para o CD30 são usados com marcadores de diagnóstico em hematopatologia sendo que, no geral, é considerado um biomarcador útil para carcinomas embrionários, demonstrando uma sensibilidade entre 83% e 100%, sendo positivo em apenas até 50% dos seminomas. Tumores do saco vitelino, NCGIS ou teratomas são negativos para o CD30. (61,67)

Na análise conjunta do c-KIT e do CD30, Leroy *et al.* demonstrou que a positividade de CD30 e a negatividade de c-KIT foi útil no diagnóstico de seminomas e de carcinoma embrionário, registando-se uma sensibilidade de 77% e de 79%, respetivamente, e obtendo-se uma especificidade de 100% na distinção destes subtipos histológicos. (69)

#### **6.2.2 SALL4**

O SALL4 é um fator de transcrição que interage com mais 3 genes, OCT4, NANOG e SOX2 na manutenção da pluripotência das células estaminais e células tronco embrionárias. O SALL4 encontra-se expresso em células germinativas primordiais e em alguns órgãos fetais durante a organogénese inicial. Nos testículos adultos é expresso em pouca quantidade nas espermatogónias normais, mas encontra-se em elevada concentração no contexto de TTCGs, especialmente em não teratomas. (61,67,70)

Num estudo de Miettinen *et al.* o SALL4 foi expresso em diversos subtipos de TTCGS, nomeadamente em 100% de seminomas, de carcinomas embrionários e de tumores do saco vitelino, em 84% de coriocarcinomas e em 60% de teratomas maduros. No entanto, foi também identificado em carcinomas serosos pouco diferenciados do ovário, carcinoma urotelial de alto grau, adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal e em carcinomas da mama. (70) Outros estudos comprovaram a sua sobre expressão em seminomas e em células de carcinoma embrionário, com uma sensibilidade de 100% em ambos, em tumores do saco vitelino, com uma sensibilidade entre 93% a 100% e em núcleos de NCGIS, com uma sensibilidade não determinada, podendo expressar-se em tecidos somáticos imaturos de teratomas. (61,67)

### **6.2.3 OCT3/4 e NANOG**

As proteínas codificadas pelos genes OCT3/4 e a proteína NANOG são dos principais fatores de transcrição expressos em células embrionárias precoces e em células germinativas primordiais dos gonócitos fetais, sendo responsáveis pela sua pluripotência. O OCT3/4 é responsável pela inibição da apoptose das células embrionárias, enquanto o NANOG garante a autorrenovação das células tronco embrionárias nos gonócitos fetais. (23,61,67,71)

No âmbito dos TTCGs, o potencial do NANOG enquanto biomarcador embrionário de TTCGs comprovou-se ao estar sobreexpresso em seminomas, com uma sensibilidade de 100%, e em NCGIS e carcinomas embrionários, com uma sensibilidade indeterminada. A sua concentração foi negativa para teratomas, tumores do saco vitelino e coriocarcinomas. (67)

O OCT4 é expresso em células de carcinomas embrionários, em seminomas e em NCGIS pré-invasiva (apresentando uma sensibilidade de 100%). O OCT4 apresenta 99% de especificidade na distinção entre NCGIS e espermatogónias benignas, o que comprova o seu potencial enquanto biomarcador testicular. Por outro lado, não se encontra presente em teratomas, em células de tumores do saco vitelino nem em coriocarcinomas. Para além de se encontrar elevado em tumores testiculares, foi identificado em carcinoma pulmonar e carcinoma do timo. (23,61)

### **6.2.4 SOX2 e SOX17**

A família de proteínas codificada pelo gene SOX desempenha variadas funções, desde o desenvolvimento embrionário e manutenção das células estaminais à homeostase dos tecidos adultos. A SOX2 desempenha um papel importante na patogénese de diferentes tumores, incluindo os TTCGs, possivelmente através da interação com o OCT4. A SOX2 não é encontrada em células germinativas primordiais nem nos gonócitos fetais. Para além da sua expressão em TTCGs, o SOX2 pode ser identificado em adenocarcinomas somáticos, como os do ovário, da mama e da próstata, sendo que a sua expressão encontra-se correlacionada com o grau de invasão dos diferentes tipos de cancros. (61,67)

Num estudo de Nonaka *et al.*, foi demonstrada a expressão difusa de SOX17 e a negatividade de SOX2 em 100% dos seminomas, em contraste com a expressão difusa de SOX2 e a negatividade de SOX17 em 100% dos carcinomas embrionários. A concentração de SOX17 foi variável em tumores do saco vitelino, e a de SOX2 foi negativa. Ambas as concentrações

de SOX2 e SOX17 foram variáveis no contexto de teratomas e negativas para coriocarcinomas. A nível de NCGIS, foi registada uma elevada concentração de SOX17 e ausência de SOX2. (67,72)

### **6.2.5 LIN28A**

A LIN28A é uma proteína de ligação ao RNA que desempenha funções a nível da manutenção da pluripotência das células estaminais embrionárias. Num estudo de Cao *et al.* foi registada a sua elevada concentração no âmbito de TTCCGs em 100% de NCGIS, de carcinomas embrionários, de tumores do saco vitelino e de seminomas. Foi também detetada concentração variável em 29% dos teratomas e em 75% dos coriocarcinomas. (12,73)

Esta proteína pode assim desempenhar funções de marcador de diagnóstico, com um potencial semelhante ao do SALL4, acrescentando a utilidade no diagnóstico de tumores do saco vitelino ao OCT4 (que é negativo para este subtipo histológico). (73)

### **6.2.6 HMGA1/2 e Aurora B cinase**

A família de proteínas HMG (proteínas de alta mobilidade do grupo A) demonstrou funcionar como oncogene, encontrando-se expressa em diferentes tumores. No âmbito dos TTCCGs, foi demonstrado que a proteína HMGA1 se encontra sobre expressa em seminomas e a HMGA2 em tumores do saco vitelino. Ambas são detetadas em carcinomas embrionários e são ambas negativas em teratomas. (16,23,74)

A Aurora B cinase (AURKB) é a cinase reguladora do ciclo celular mais estudada no âmbito dos TTCCGs e desempenha funções de marcador tumoral uma vez que é capaz de discriminar diferentes subtipos histológicos de TTCCGs. Encontra-se sobeexpressa em NCGIS, seminomas e carcinoma embrionário, estando ausente em teratomas e em tumores do saco vitelino (12,23).

## 7. Limitações e Perspetivas Futuras

A pesquisa de biomarcadores de tumores testiculares de células germinativas está em constante evolução, na tentativa de se encontrarem os melhores métodos de deteção, prognóstico e monitorização destas neoplasias. De entre todos os biomarcadores analisados, os microRNAs surgem como protagonistas das perspetivas futuras desta área em investigação, especialmente o miR-371a-3p pela sua elevada eficácia, comprovada em diversos estudos. No entanto, apesar dos avanços alcançados, ainda existem limitações que necessitam de melhoria, antes da introdução de novos biomarcadores na prática clínica.

As principais limitações consistem na maioria dos estudos publicados apresentar falta de padrões de uniformização de protocolos na preparação, manuseamento e armazenamento da amostra; falta de validação analítica dos equipamentos utilizados; e heterogeneidade no tipo e na quantidade de amostras utilizadas. Existem diferentes formas de comunicação de resultados e ainda se encontra em falta um valor de *cut-off* padronizado e significativo para relevância dos resultados, o que confere uma elevada variabilidade intra e interexperimental, condicionando a reprodutibilidade dos estudos. A natureza retrospectiva da maioria dos estudos publicados constitui mais uma limitação, para além do número reduzido de amostras e de pacientes recrutados em cada um deles. (11,15,26)

Dada a raridade dos TTCGs, abordagens multi-institucionais através da partilha de dados, amostras e conhecimento pode acelerar a validação de biomarcadores e facilitar a sua implementação na prática clínica. Para tal, será necessário uniformizar e universalizar protocolos e relatórios, através da implementação de condutas de investigação e de divulgação mais precisas e robustas. É ainda necessária a realização de mais estudos prospetivos, em larga escala, que forneçam dados significativamente relevantes para a validação clínica da função dos biomarcadores emergentes nesta área. (11,15)

A investigação realizada no âmbito dos novos biomarcadores, tanto das suas características moleculares, como das suas potencialidades clínicas, torna-os candidatos a instrumentos de medicina de precisão, permitindo uma abordagem cada vez mais personalizada na gestão da doença. A utilização futura de biomarcadores específicos, especialmente de micro-RNAs, com diferentes propriedades clínicas a nível do diagnóstico, prognóstico e monitorização da doença, ao longo de todo o tratamento, poderão auxiliar na estratificação mais precisa dos pacientes, permitindo decisões terapêuticas cada vez mais individualizadas, assim como melhorias na eficácia do tratamento. Acrescentando, investigações seguintes, podem-se concentrar na validação clínica em larga escala, através do aperfeiçoamento das técnicas de

deteção, e da utilização de painéis de múltiplos microRNAs para estudos mais abrangentes. (15,27)

Futuramente, tornar-se-á relevante a discussão da pertinência da análise integrada de diferentes tipos de biomarcadores. A combinação dos novos biomarcadores, entre os quais microRNAs, CTCs e cfDNA, com os biomarcadores tradicionais, como a AFP e  $\beta$ -hCG, pode fornecer uma visão mais holística da biologia tumoral, contribuindo para aprimorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico e *follow-up*. Deverá ainda ser comparada a pertinência da contínua quantificação dos biomarcadores clássicos, com a sua completa substituição por novos biomarcadores mais sensíveis e específicos, como os miRNAs. (15,27)

Num futuro mais próximo espera-se que a validação clínica do miR-371a-3p seja alcançada, traduzindo-se na sua aplicação clínica no diagnóstico, prognóstico e seguimento dos pacientes com tumores testiculares de células germinativas. A partir desse marco nesta área em investigação, é de acreditar que se consigam ainda mais melhorias e avanços na deteção precoce da doença, de possíveis recidivas e da monitorização cada vez mais personalizada do tratamento. Apesar do futuro ser incerto, é com certeza que a investigação de biomarcadores cada vez mais sensíveis e específicos não vai deixar de existir, procurando-se sempre alcançar a maior eficácia possível na gestão destes tumores.

## 8. Conclusão

A análise abrangente dos biomarcadores séricos tumorais existentes na prática clínica atual, tais como a AFP, B-HCG e LDH permitiu refletir acerca da sua importância na avaliação inicial dos pacientes com Tumores Testiculares de Células Germinativas, mas as suas limitações associadas à baixa sensibilidade e especificidade e elevados falsos positivos, levou à procura de marcadores inovadores, capazes de ultrapassá-las. Foram estudados diversos marcadores, tais como CTCs, cfDNA, ctDNA, marcadores imunológicos e imunohistoquímicos, com particular ênfase nos microRNAs. Estes destacam-se como agentes promissores para uma abordagem mais precisa e sensível, possibilitando avanços significativos na área dos TTCGs.

Entre os biomarcadores emergentes, o miR-371a-3p assume uma posição de destaque pelos seus ótimos valores de eficácia na identificação precoce de TTCGs, diferenciação entre subtipos histológicos, predição de recidivas e avaliação da resposta ao tratamento. A sua elevada sensibilidade e especificidade, comparativamente aos tradicionais e aos novos biomarcadores, torna o miR-371a-3p no principal biomarcador estudado com propriedades que podem impulsionar a sua introdução na prática clínica.

A incorporação do miR-371a-3p na gestão de TTCGs irá permitir avanços na abordagem não invasiva, permitindo diminuir custos relacionados com exames mais invasivos, melhorar a eficácia do diagnóstico atempado, melhorar a monitorização da resposta ao tratamento, e diminuir taxas de recidivas não detetadas, aumentando a qualidade de vida dos pacientes. Ficam a faltar estudos mais abrangentes, de larga escala, que validem de forma significativa a introdução da quantificação deste biomarcador na gestão clínica dos TTCGs.

A diversidade de biomarcadores discutidos reflete a complexidade clínica desta neoplasia, permitindo uma compreensão abrangente dos desafios enfrentados no seu diagnóstico, prognóstico e monitorização, na procura constante por uma abordagem de medicina de precisão menos invasiva. A contínua pesquisa e inovação neste campo é crucial para melhorar a gestão dos tumores testiculares de células germinativas e proporcionar melhores resultados clínicos aos pacientes.

## Referências Bibliográficas

1. Leão R, Ahmad AE, Hamilton RJ. Testicular Cancer Biomarkers: A Role for Precision Medicine in Testicular Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(1): e176–83.
2. Giona S. The Epidemiology of Testicular Cancer. In: Barber N, Ali A, editors. *Urologic Cancers*. Brisbane (AU): Exon Publications. 2022; p. 107–16.
3. Nicol D, Berney D, Boormans JL, di Nardo D, Fankhauser CD, Fischer S, et al. *EAU Guidelines on Testicular Cancer*. 2023.
4. Soleimani M, Kollmannsberger C, Nappi L. Emerging Role of Biomarkers in Testicular Germ Cell Tumors. *Curr Oncol Rep*. 2022 (4):437–42.
5. Batool A, Karimi N, Wu XN, Chen SR, Liu YX. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(9):1713–27.
6. Williamson SR, Delahunt B, Magi-Galluzzi C, Algaba F, Egevad L, Ulbright TM, et al. The World Health Organization 2016 classification of testicular germ cell tumours: a review and update from the International Society of Urological Pathology Testis Consultation Panel. Vol. 70, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 335–46.
7. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(29).
8. Baird DC, Meyers GJ, Hu JS. Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2018;97(4):261–8.
9. Gilligan T, Lin DW, Aggarwal R, Chism D, Cost N, Derweesh IH, et al. Testicular cancer, version 2.2020. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2019;17(12):1529–54.
10. Moul JW. Timely Diagnosis of Testicular Cancer. *Urologic Clinics of North America*. 2007; 34(2):109–17.
11. Mishra A, Verma M. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? *Cancers* 2010; 2(1):190–208.

12. Lakpour N, Saliminejad K, Ghods R, Reza Sadeghi M, Pilatz A, Khosravi F, et al. Potential biomarkers for testicular germ cell tumour: Risk assessment, diagnostic, prognostic and monitoring of recurrence. *Andrologia*. 2021 ;53(4).
13. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. 2012;6(2):140–6.
14. Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
15. Lobo J, Leão R, Jerónimo C, Henrique R. Liquid Biopsies in the Clinical Management of Germ Cell Tumor Patients: State-of-the-Art and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):1–22.
16. Mir MC, Pavan N, Gonzalvo ML. Current Clinical Applications of Testicular Cancer Biomarkers. *Urologic Clinics of North America*. 2016;43(1):119–25.
17. Dieckmann KP, Simonsen-Richter H, Kulejewski M, Anheuser P, Zecha H, Isbarn H, et al. Serum Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours: Frequencies of Elevated Levels and Extents of Marker Elevation Are Significantly Associated with Clinical Parameters and with Response to Treatment. *Biomed Res Int*. 2019;1–22.
18. Murray MJ, Nicholson JC.  $\alpha$ -Fetoprotein. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2011;96(4):141–7.
19. Murray MJ, Huddart RA, Coleman N. The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours. *Nat Rev Urol*. 2016;13(12):715–25.
20. Stenman UH, Alfthan H, Hotakainen K. Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clin Biochem*. 2004;37(7):549–61.
21. Jialal I, Sokoll LJ. Clinical Utility of Lactate Dehydrogenase: A Historical Perspective. *Am J Clin Pathol*. 2015; 143:158–9.
22. Chavarriaga J, Hamilton RJ. miRNAs for testicular germ cell tumours: Contemporary indications for diagnosis, surveillance, and follow up. *Andrology*. 2022;11(4):628–33.
23. De Martino M, Chieffi P, Esposito F. MiRNAs and biomarkers in testicular germ cell tumors: An update. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1–11.

24. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer – An Emerging Concept. Vol. 12, EBioMedicine. Elsevier B.V.; 2016. p. 34–42.
25. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 2006;124(6):1169–81.
26. Nappi L, Kollmannsberger C, Nichols C. The role of micro-RNAs in management of germ cell tumors: Future directions. *Curr Opin Urol*. 2020;30(2):258–63.
27. Leão R, Albersen M, Looijenga LHJ, Tandstad T, Kollmannsberger C, Murray MJ, et al. Circulating MicroRNAs, the Next-Generation Serum Biomarkers in Testicular Germ Cell Tumours: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2021;80(4):456–66.
28. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. Identification of microRNAs from the miR-371-373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(1):119–25.
29. Belge G, Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Bullerdiek J. Serum levels of MicroRNAs miR-371-3: A novel class of serum biomarkers for testicular germ cell tumors? *Eur Urol*. 2012;61(5):1068–9.
30. Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Flor I, Löning T, Bullerdiek J, et al. MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 2012;107(10):1754.
31. Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Circulating Serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as Biomarkers in Patients with Testicular Germ Cell Cancer. *Journal of Urology*. 2014;193(1):331–7.
32. Van Agthoven T, Looijenga LHJ. Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum-based microRNA detection (ampTSMiR test). *Oncotarget*. 2016;8(35):58037–49.
33. van Agthoven T, Eijkenboom WMH, Looijenga LHJ. microRNA-371a-3p as informative biomarker for the follow-up of testicular germ cell cancer patients. *Cellular Oncology*. 2017;40(4):379–88.

34. Leão R, van Agthoven T, Figueiredo A, Jewett MAS, Fadaak K, Sweet J, et al. Serum miRNA Predicts Viable Disease after Chemotherapy in Patients with Testicular Nonseminoma Germ Cell Tumor. *Journal of Urology*. 2018;200(1):126–35.
35. Radtke A, Cremers JF, Kliesch S, Riek S, Junker K, Mohamed SA, et al. Can germ cell neoplasia in situ be diagnosed by measuring serum levels of microRNA371a-3p? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(11):2383–92.
36. Belge G, Grobelny F, Radtke A, Bodes J, Matthies C, Wülfing C, et al. Serum levels of microRNA-371a-3p are not elevated in testicular tumours of non-germ cell origin. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021;147(2):435–43.
37. Gillis AJM, Rijlaarsdam MA, Eini R, Dorssers LCJ, Biermann K, Murray MJ, et al. Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle. *Mol Oncol*. 2013;7(6):1083–92.
38. Plaza XR, van Agthoven T, Meijer C, van Vugt MATM, de Jong S, Gietema JA, et al. MiR-371a-3p, miR-373-3p and mir-367-3p as serum biomarkers in metastatic testicular germ cell cancers before, during and after chemotherapy. *Cells*. 2019;8(10).
39. Dieckmann KP, Becker P, Ruf C, Oing C, Oechsle K, Bokemeyer C, et al. Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. *Eur Urol*. 2017;71(2):213–20.
40. Dieckmann KP, Radtke A, Geczi L, Matthies C, Anheuser P, Eckardt U, et al. Serum Levels of MicroRNA-371a-3p (M371 Test) as a New Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Results of a Prospective Multicentric Study. Vol. 37, *J Clin Oncol*. 2019.
41. Myklebust MP, Thor A, Rosenlund B, Gjengstø P, Karlsdottir Á, Brydøy M, et al. Serum miR371 in testicular germ cell cancer before and after orchiectomy, assessed by digital-droplet PCR in a prospective study. *Sci Rep*. 2021;11(1):15582.
42. Sequeira JP, Lobo J, Constâncio V, Brito-Rocha T, Carvalho-Maia C, Braga I, et al. DigiMir Test: Establishing a Novel Pipeline for MiR-371a Quantification Using Droplet Digital PCR in Liquid Biopsies From Testicular Germ Cell Tumor Patients. *Front Oncol*. 2022;12.
43. Nappi L, Thi M, Lum A, Huntsman D, Eigl BJ, Martin C, et al. Developing a Highly Specific Biomarker for Germ Cell Malignancies: Plasma miR371 Expression Across

- the Germ Cell Malignancy Spectrum. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(33):3090.
44. Piao J, Lafin JT, Scarpini CG, Nuño MM, Syring I, Dieckmann KP, et al. A Multi-institutional Pooled Analysis Demonstrates That Circulating miR-371a-3p Alone is Sufficient for Testicular Malignant Germ Cell Tumor Diagnosis. *Clin Genitourin Cancer*. 2021;19(6):469–79.
  45. Spiekermann M, Belge G, Winter N, Ikogho R, Balks T, Bullerdiek J, et al. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. *Andrology*. 2015;3(1):78–84.
  46. Anheuser P, Radtke A, Wülfing C, Kranz J, Belge G, Dieckmann KP. Serum Levels of MicroRNA371a-3p: A Highly Sensitive Tool for Diagnosing and Staging Testicular Germ Cell Tumours: A Clinical Case Series. *Urol Int*. 2017;99(1):98–103.
  47. Terbuch A, Adiprasito JB, Stiegelbauer V, Seles M, Klec C, Pichler GP, et al. Mir-371a-3p serum levels are increased in recurrence of testicular germ cell tumor patients. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
  48. Mego M, van Agthoven T, Gronosova P, Chovanec M, Miskovska V, Mardiak J, et al. Clinical utility of plasma miR-371a-3p in germ cell tumors. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1128–36.
  49. Lobo J, Leão R, Gillis AJM, van den Berg A, Anson-Cartwright L, Atenafu EG, et al. Utility of Serum miR-371a-3p in Predicting Relapse on Surveillance in Patients with Clinical Stage I Testicular Germ Cell Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(3):483–91.
  50. Fankhauser CD, Christiansen AJ, Rothermundt C, Cathomas R, Wettstein MS, Grossmann NC, et al. Detection of recurrences using serum miR-371a-3p during active surveillance in men with stage I testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 2022;126(8):1140–4.
  51. Bagrodia A, Savelyeva A, Lafin JT, Speir RW, Chesnut GT, Frazier AL, et al. Impact of circulating microRNA test (miRNA-371a-3p) on appropriateness of treatment and cost outcomes in patients with Stage I non-seminomatous germ cell tumours. *BJU Int*. 2021;128(1):57–64.
  52. Nappi L, Thi M, Adra N, Hamilton RJ, Leao R, Lavoie JM, et al. Integrated Expression of Circulating miR375 and miR371 to Identify Teratoma and Active Germ

- Cell Malignancy Components in Malignant Germ Cell Tumors. *Eur Urol.* 2021;79(1):16–9.
53. Lobo J, van Zogchel LMJ, Nuru MG, Gillis AJM, van der Schoot CE, Tytgat GAM, et al. Combining hypermethylated rassf1a detection using ddPCR with mir-371a-3p testing: An improved panel of liquid biopsy biomarkers for testicular germ cell tumor patients. *Cancers (Basel).* 2021;13(20):5228.
  54. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer.* 2011. p. 426–37.
  55. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget.* 2016;7(30).
  56. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FGE, Mueller SC, von Ruecker A, et al. Cell-Free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients With Testicular Germ Cell Cancer. *Journal of Urology.* 2009;181(1):363–71.
  57. Boublikova L, Kramarzova KS, Zwyrtkova M, Bakardjieva-Mihaylova V, Stuchly J, Rosova B, et al. The clinical value of circulating free tumor DNA in testicular germ cell tumor patients. *Urol Oncol.* 2022;40(9): 412.e15-412.e24.
  58. Nastaly P, Honecker F, Pantel K, Riethdorf S. Detection of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Patients with Testicular Germ Cell Tumors. *Methods Mol Biol.* 2021; 2195:245–61.
  59. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol.* 2010;2(6):351.
  60. Nastaly P, Ruf C, Becker P, Bednarz-Knoll N, Stoupiec M, Kavsar R, et al. Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors. *Clinical Cancer Research.* 2014;20(14):3830–41.
  61. Damjanov I. Testicular Germ Cell Tumors: Serological and Immunohistochemical Diagnosis. *Acta Mmedica Academica.* 2021;50(1):58–70.
  62. Koshida K, Uchibayashi T, Yamamoto H, Hirano K. Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. *Br J Urol.* 1996; 77:138–42.

63. Lajer H, Daugaard G, Andersson AM, Skakkebæk NE. Clinical use of serum TRA-1-60 as tumor marker in patients with germ cell cancer. *Int J Cancer*. 2002;100(2):244–6.
64. Fosså SD, Klepp O, Paus E. Neuron-specific enolase – a serum tumour marker in seminoma? *British Journal of Cancer*. 1992;65(2):297–9.
65. Kuzmits R, Scherthaner G, Krisch K. Serum neuron-specific enolase: A marker for response to therapy in seminoma. *Cancer*. 1987;60(5):1017–21.
66. Narita T, Hatakeyama S, Yoneyama T, Narita S, Yamashita S, Mitsuzuka K, et al. Clinical implications of serum N-glycan profiling as a diagnostic and prognostic biomarker in germ-cell tumors. *Cancer Med*. 2017;6(4):739–48.
67. Siegmund SE, Mehra R, Acosta AM. An update on diagnostic tissue-based biomarkers in testicular tumors. *Hum Pathol*. 2022; 3:1–24.
68. Nakai Y, Nonomura N, Oka D, Shiba M, Arai Y, Nakayama M, et al. KIT (c-kit oncogene product) pathway is constitutively activated in human testicular germ cell tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 337(1):289–96.
69. Leroy X, Augusto D, Leteurtre E, Gosselin B. CD30 and CD117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2002; 50(2):283–5.
70. Miettinen M, Wang Z, Mccue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Biernat W, et al. SALL4 Expression in Germ Cell and Non-Germ Cell Tumours: A Systematic Immunohistochemical Study of 3215 cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014; 38(3):410–20.
71. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LHJ, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer*. 2005; 104(10):2092–8.
72. Nonaka D. Differential Expression of SOX2 and SOX17 in Testicular Germ Cell Tumors. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(5):731–6.
73. Cao D, Allan RW, Cheng L, Peng Y, Guo CC, Dahiya N, et al. RNA-binding protein LIN28 is a marker for testicular germ cell tumors. *Hum Pathol*. 2011;42(5):710–8.

74. Franco R, Esposito F, Fedele M, Liguori G, Pierantoni GM, Botti G, et al. Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. *Journal of Pathology*. 2008;214(1):58–64.