U.PORTO

MESTRADO INTEGRADO
MEDICINA

Biomarcadores na Neoplasia Testicular

Emanuel Augusto Pereira Esteves

M

2022

Biomarcadores na Neoplasia Testicular

Mestrado Integrado de Medicina

Dissertação | Artigo de Revisão

Estudante: Emanuel Augusto Pereira Esteves

Aluno do 6º ano profissionalizante de Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Endereço: Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº228, 4050-313 Porto

Endereço eletrónico: emanuelpereira97@live.com.pt

Orientador: Prof. Dr. Avelino Manuel Fraga Ferreira

Assistente Graduado Sénior de Urologia no Centro Hospitalar Universitário do Porto

Diretor do Serviço de Urologia - Centro Hospitalar Universitário do Porto

Professor Catedrático Convidado de Urologia - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Endereço: avfraga@gmail.com

Coorientador: Dr. André Marques Pinto

Assistente de Urologia no Centro Hospitalar Universitário do Porto

Endereço: andre.fmpinto@gmail.com

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Porto, junho de 2022

Biomarcadores na Neoplasia Testicular

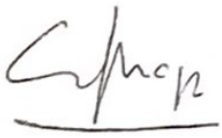
Mestrado Integrado de Medicina

Dissertação | Artigo de Revisão

Assinatura: Emanuel Augusto Pereira Esteves



Assinatura: Prof. Dr. Avelino Manuel Fraga Ferreira



Assinatura: Dr. André Marques Pinto

Assinado por: **André Filipe Marques Pinto**
Num. de Identificação: 13508057
Data: 2022.06.07 23:21:14+01'00'



Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Porto, junho de 2022

Agradecimentos

Findada mais uma etapa, de um longo rally. Em primeiro lugar, um obrigado a todos os que me apoiaram a começá-lo, sem eles não seria possível. Um obrigado também a todos os que fizeram parte destas classificativas, a todos os que de uma forma ou outra me orientaram e incentivaram a terminá-la. Ao longo dos 6 anos, ficam cravadas na estrada muitas memórias; porque não interessa só o lugar onde chegamos, mas sim o percurso que tomamos.

Um agradecimento ao Professor Doutor Avelino Fraga por ter alvitrado esta temática e pela disponibilidade na orientação desta dissertação e ao Dr. André Marques Pinto pelas sugestões, conselhos, e apoio no desenvolvimento rigoroso desta dissertação.

RESUMO

Enquadramento

O cancro testicular é a neoplasia mais comum nos jovens adultos caucasianos do sexo masculino, sendo que 90% são tumores das células germinativas, podendo ser classificados em seminomas e tumores das células germinativas não seminomatosas. Inicialmente, qualquer massa testicular deve ser considerada cancro até prova em contrário. Após confirmação por ecografia escrotal, devem ser pesquisados os biomarcadores – alfa-fetoproteína, subunidade β da gonadotrofina coriónica humana e desidrogenase do lactato. Apenas 30% dos seminomas e 60% dos indivíduos em estadio inicial apresentam aumento de pelo menos um destes marcadores, demonstrando assim, baixa sensibilidade e especificidade diagnóstica. O diagnóstico e estadiamento definitivo é apenas obtido após a orquidectomia, que poderá ser um procedimento curativo. Porém, alguns indivíduos poderão necessitar de realizar quimioterapia. O doseamento dos biomarcadores deve ser realizado antes e após a orquidectomia, num contexto de estadiamento e seguimento. Deste modo, o diagnóstico e prognóstico deverão ser o mais rigorosos possível. Neste sentido, diversos biomarcadores estão em investigação, destacando-se microRNA, *cell free* DNA (cfDNA) e células circulantes tumorais (CTC).

Objetivos

Realizar uma revisão bibliográfica sobre os diversos biomarcadores no cancro testicular. Definir as limitações dos biomarcadores previamente utilizados, abordando as novidades nesta área de investigação e as suas vantagens no diagnóstico, decisão terapêutica e consequente prognóstico.

Metodologia

A pesquisa e análise do conteúdo bibliográfico foi realizada nas bases de dados PubMed® e Google Scholar®. Foram selecionados artigos em inglês que melhor se enquadram no tema abordado. Incluiu-se artigos de investigação desde 2009 a 2021, tendo-se excluído aqueles em que o título e/ou resumo não se enquadravam com os objetivos da presente revisão. Quando oportuno, foram também referenciados artigos de revisão e *guidelines*. Também foi realizada a pesquisa direta de artigos mencionados na bibliografia consultada.

Discussão

Vários estudos demonstram uma relação entre a carga tumoral e os diversos biomarcadores. Deve privilegiar-se a análise de amostras de sangue do plexo pampiniforme. O miR-371a-3p é o biomarcador mais promissor, sendo a sua sensibilidade e especificidade bastante superiores às dos marcadores clássicos. A interpretação conjunta de microRNA e marcadores clássicos

permite conclusões mais sólidas. No diagnóstico de teratomas, os microRNA carecem de investigação. Na prática clínica, a utilização de cfDNA e CTC não parece ser viável.

Conclusão

As dúvidas relativamente à viabilidade da utilização na prática clínica destes marcadores mantêm-se. Sendo o miR-371a-3p o marcador mais universalmente aceite, justificar-se-á um estudo alargado, de maneira a compreender se a sobrevida dos indivíduos melhora com a utilização integrada de novos biomarcadores no cancro testicular.

Palavras chave:

"Testicular Neoplasms" "Biomarkers" "MicroRNAs" "Diagnosis" "Prognosis" "Follow-up" "Serum Tumor Markers"

ABSTRACT

Introduction

Testicular cancer is the most common neoplasm in young Caucasian male adults, 90% of which are germ cell tumors, which can be classified into seminomas and non-seminomatous germ cell tumors. Initially, any testicular mass should be considered cancer until proven otherwise. After confirmation by scrotal ultrasound, biomarkers should be investigated – alpha-fetoprotein, β subunit of human chorionic gonadotropin, and lactate dehydrogenase. Only 30% of seminomas and 60% of individuals in the initial stage show an increase in at least one of these markers, thus demonstrating low diagnostic sensitivity and specificity. Definitive diagnosis and staging are only obtained after orchidectomy, which may be a curative procedure. However, some individuals may need chemotherapy. The measurement of biomarkers should be performed before and after orchidectomy, in the context of staging and follow-up. Therefore, diagnosis and prognosis should be as accurate as possible. In this sense, several biomarkers are under investigation, especially microRNA, cell free DNA (cfDNA), and circulating tumor cells (CTC).

Objective

To carry out a literature review on the various biomarkers in testicular cancer. Define the limitations of previously used biomarkers, addressing the novelties in this area of investigation and their advantages in diagnosis, therapeutic decision, and consequent prognosis.

Methods

The bibliographic content analysis was carried out in PubMed® and Google Scholar® databases. Articles in English that best fit the topic addressed were selected. Research articles from 2009 to 2021 were included, excluding those in which the title and/or abstract did not fit the objectives of this review. When appropriate, review articles and guidelines were also referenced. A direct search for articles mentioned in the consulted bibliography was also carried out.

Discussion

Several studies demonstrate a relationship between tumor burden and different biomarkers. Priority should be given to analyzing blood samples from the pampiniform plexus. miR-371a-3p is the most promising biomarker, and its sensitivity and specificity are far superior to those of classical markers. The joint interpretation of microRNA and classical markers allows for more solid conclusions. In the diagnosis of teratomas, microRNAs need investigation. In clinical practice, the use of cfDNA and CTC does not seem to be feasible.

Conclusion

Doubts regarding the feasibility of using these markers in clinical practice remain. As miR-371a-3p is the most universally accepted marker, an extended study is warranted, to understand whether the survival of individuals improves with the integrated use of new biomarkers in testicular cancer.

Keywords:

"Testicular Neoplasms" "Biomarkers" "MicroRNAs" "Diagnosis" "Prognosis" "Follow-up" "Serum Tumor Markers"

Lista de Abreviaturas

AFP – alfa-fetoproteína

CS1/2/3 – Estadio clínico 1/2/3

cfDNA – *Cell free* DNA

Crtl – Controlo(s)

ctDNA – *Circulating tumor* DNA

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E – Especificidade

EpCAM – *Epithelial cell adhesion molecule*

FGF-2 – Fator de crescimento fibroblástico-2

FGFR2 – Recetor 2 do fator de crescimento fibroblástico

FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência

FSP1 – Proteína fibroblástica específica 1

hCG – Gonadotrofina Coriónica Humana

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

IMC – Índice de Massa Corporal

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LDH – Desidrogenase do Lactato

MCDT – Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica

MeSH – Medical Subject Headings

MFs – Microfilamentos

MIF – Fator de inibidor de macrófago

miRNA – micro Ácido Ribonucleico

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

N/A – Não aplicável

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NNT – Neoplasia não testicular

NSE – Enolase específica neuronal

PCR – *Polymerase chain reaction*

PLAP – Fosfatase alcalina placentária

PTN – Pleiotrofina

qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*

QT – Quimioterapia

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RT-PCR – PCR em tempo real

S – Sensibilidade

TC – Tomografia Computorizada

TCG – Tumor das Células Germinativas

TCGIS – Tumor das Células Germinativas *in situ*

TCG – Tumor das Células Germinativas não seminomatosas

TCL – Tumores das Células de Leydig

TEM – Transição epitélio-mesenquimal

TME – Transição mesênquima-epitelial

TNM – T-tumor; N-gânglios linfáticos; M-metástases

TRA-1-60 – Anticorpo do recetor das células T *locus* alfa-1-60

TP53 – Proteína Tumoral 53

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

Índice

Agradecimentos i
RESUMO ii
ABSTRACT iv
Lista de Abreviaturas vi
Índice vii
Lista de Tabelas viii
Introdução 1
Visão Geral da biópsia líquida 1
Visão Geral Neoplasia Testicular 1
Epidemiologia 1
Classificação Neoplasia testicular 2
Apresentação clínica e diagnóstico 3
Objetivos 4
Metodologia 4
Biomarcadores atuais/clássicos 5
AFP 5
β-hCG 6
LDH 6
Outros marcadores 7
Desafios no diagnóstico da neoplasia testicular 7
Novos biomarcadores 8
MicroRNAs 9
Cell-Free DNA 12
Células Tumorais Circulantes (CTC) 13
Futuro em investigação 15
Limitações 16
Conclusão 16
Anexos 18
Bibliografia 26

Lista de Tabelas

Tabela I: Subtipos histológicos e biomarcadores correspondentes..... 18
Tabela II: Características dos estudos relativos a miRNA..... 19
Tabela III: Características dos estudos relativos a cfDNA 23
Tabela IV: Marcadores identificados no processo de transição epitélio-mesenquimal e transição mesênquima-epitelial..... 24
Tabela V: Características dos estudos relativos a CTC 25

Introdução

Visão Geral da biópsia líquida

Biomarcadores, por definição, são moléculas biológicas que podem ser medidas no sangue ou em outros fluidos corporais. A sua interpretação poderá permitir detetar a presença de processos biológicos normais ou patológicos, assim como avaliar a resposta a intervenções terapêuticas.[1]

Uma biópsia consiste na remoção de uma amostra de células ou tecidos e consequente análise por um patologista.[2] Através destas técnicas, é possível, entre outras coisas, a deteção de um processo patológico.

A biópsia tradicional é limitada pela quantidade de amostra de tecido que pode ser removido, que também é limitada pelas características dos instrumentos utilizados, assim como pelo volume acessível do tecido em causa. Qualquer material tumoral, como ácidos nucleicos, proteínas, vesículas secretórias ou mesmo células tumorais, em teoria, pode entrar na circulação sanguínea. Deste modo, a análise de uma amostra de sangue pode permitir a deteção de células cancerígenas ou fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) tumoral que se encontrem na circulação sanguínea. A este conceito dá-se o nome de biópsia líquida, que poderá ser mais representativa do que a biópsia tradicional.[3–5]

A principal vantagem da biópsia líquida é ser minimamente invasiva, permitindo uma análise seriada da evolução tumoral em tempo real.[6]

Poderá ser, assim, utilizada como ferramenta diagnóstica, de estadiamento e de prognóstico.[7]

Visão Geral Neoplasia Testicular

Epidemiologia

O cancro testicular é a neoplasia mais comum entre os jovens adultos caucasianos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 15 e os 40 anos, tendo a sua incidência aumentado significativamente nas últimas décadas.[8–10] No Reino Unido, no período de 1978 a 2018, aumentou de 3.4 para 6.4 em 100.000 homens-ano; na Suécia, de 1976 a 2016, ocorreu um incremento na incidência deste cancro de 3 a 5.8 casos por 100.000 homens-ano.[11,12] Apesar da melhoria dos cuidados de saúde, prevê-se um incremento de 13% a 32% do número de casos na Europa, até 2035, devido às alterações do estilo de vida, o aumento da idade média da população global e a exposição a eventuais fatores de risco.[13]

São considerados fatores de risco: criptorquidia, diagnóstico prévio de neoplasia testicular, história familiar de neoplasia testicular e cancro da mama, predisposição genética, idade, etnia, infertilidade, exposição a estrogénios, assim como a altura e consequente valor de índice de massa corporal (IMC).[8,14–17] Destes, o principal fator é a criptorquidia, sendo que o risco relativo é 2.9 a 6.3 vezes superior. Mesmo após orquidopexia o risco mantém-se cerca de 2.2 vezes mais elevado do que a restante população. Homens com diagnóstico prévio de neoplasia testicular, têm um risco acrescido 12 vezes superior de desenvolver neoplasia no testículo contralateral. Outro fator de risco é a infertilidade, que, apesar de possuir um mecanismo pouco esclarecido, apresenta uma relação de risco 1.6 a 2.8 vezes superior no desenvolvimento desta neoplasia.[14] Está também documentada uma relação direta entre o risco de neoplasia testicular e a altura dos doentes, assim como um possível relação inversa entre o risco de neoplasia testicular e o IMC.[16]

Classificação Neoplasia testicular

Os tumores das células germinativas (TCG) testiculares representam cerca de 95% de todas as neoplasias testiculares.[13] Segundo a Organização Mundial de Saúde, podemos dividir este tipo de tumores em dois grandes grupos: os que derivam de tumores das células germinativas *in situ* (TCGIS); e os que derivam de outras entidades e que ocorrem predominante em indivíduos pré-púberes.[18]

Os tumores derivados de TCGIS, que representam mais de 95% das neoplasias testiculares[19], podem ser classificados em cinco entidades histológicas: seminoma, carcinoma embrionário, carcinoma do saco vitelino, tumores trofoblásticos e teratoma do tipo pós-pubertário. Porém, são agrupados essencialmente em dois grupos: os seminomas e os tumores das células germinativas não seminomatosas (TCGNS), que representam cerca de 60 e 40% respetivamente. De notar que cerca de 60% dos TCGIS apresentam mais do que um tipo histológico – tumores mistos.[7,9,20]

Os tumores do saco vitelino e os teratomas podem derivar ou não de células germinativas. Nos indivíduos pré-púberes, estes tumores, habitualmente, não se relacionam com TCGIS, apresentando um carácter mais benigno. Nos indivíduos pós-púberes, com a ocorrência da espermatogénese, estes tumores relacionam-se, maioritariamente, com TCGIS. Enquanto os tumores do saco vitelino pré- e pós-pubertário não apresentam diferenças histológicas, o carácter benigno dos teratomas do tipo pré-pubertário resulta da menor atipia citológica que apresentam. Dentro dos teratomas pré-púberes, são reconhecidos subtipos como os cistos dermoides e epidermoides e os tumores carcinoides.[18]

Apresentação clínica e diagnóstico

Na maioria dos indivíduos, cerca de 68%, o diagnóstico é feito em estadios precoces, mas 30% dos casos apresentam metastização.[19]

Frequentemente, a primeira suspeita surge após a deteção de uma tumefação, geralmente indolor, durante a auto palpação testicular. Pode também apresentar-se como um achado imagiológico ou no contexto de investigação pós-traumática. A dor localizada é menos comum, mas quando está presente o diagnóstico diferencial de epididimite deve ser considerado.[14] Contudo, no caso da neoplasia testicular, ao contrário da epididimite, habitualmente não se acompanha de sintomas urinários nem se associa a infeções sexualmente transmissíveis.[21]

A dor à palpação é responsável por alguns falsos diagnósticos de epididimite, pois, apesar de menos comum, na neoplasia testicular a dor está presente em cerca de 50% das apresentações, causada por hemorragia intratumoral.[22]

Numa fase inicial, qualquer massa testicular deve ser considerada cancro até prova em contrário. A ecografia escrotal com doppler é muito útil para caracterizar uma tumefação suspeita. Tipicamente, os achados ecográficos permitem confirmar/localizar a massa como extratesticular, marginal ou intratesticular, sendo caracteristicamente hipoecogénica, vascularizada e heterogénea. Perante uma lesão altamente suspeita, deve proceder-se a uma orquidectomia radical para confirmação definitiva diagnóstica, não havendo lugar a biópsia percutânea trans escrotal, dada a possibilidade de metastização inadvertida.[23]

Com esta abordagem, alguns indivíduos poderão estar a ser sobre tratados. Um estudo relatou que, dos indivíduos com lesões sólidas testiculares vasculares maiores do que 1cm de maior eixo, detetadas por ecografia com doppler, 18% eram benignas. Assim, poder-se-á adotar uma estratégia conservadora em indivíduos sem evidência de doença metastática nem elevação de biomarcadores tumorais, que se apresentam com massas não palpáveis de pequenas dimensões.[24]

De notar que, em certos estadios da doença, a orquidectomia poderá ser adiada de modo a iniciar a quimioterapia (QT), nomeadamente em situações ameaçadoras de vida, geralmente acompanhadas de elevação significativa de biomarcadores, como subunidade beta da gonadotrofina coriónica humana (β-hCG) ou alfa-fetoproteína (AFP), que indicam a forte possibilidade de metastização visceral, não sendo assim necessária a confirmação histológica para iniciar tratamento.[7,18]

Para o estadiamento desta patologia, aplica-se o sistema TNM (T-tumor; N-gânglios linfáticos; M- metástases), integrando também um ponto extra – "S" de *serum tumor markers*. Para tal, os indivíduos devem realizar diversos meios complementares de diagnóstico (MCDT), como:[25]

- Pesquisa e quantificação dos biomarcadores tumorais: AFP, β-hCG, desidrogenase do lactato (LDH).
- Tomografia Computorizada (TC) do tórax, abdómen e pélvis em todos os indivíduos;
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) se TC equívoca ou em indivíduos selecionados;
- RMN cerebral ou TC com contraste se indivíduos com sintomatologia neurológica ou evidência de doença metastizada e níveis elevados de β-hCG;

Ao longo do processo diagnóstico/terapêutico deve ser realizada a pesquisa e quantificação de marcadores séricos tumorais para avaliação de estadiamento e avaliação prognóstica.[23]

Objetivos

Com base nas limitações precedentes, o objetivo desta revisão bibliográfica é abordar os diversos biomarcadores no cancro testicular e analisar a informação atualmente existente, definindo as limitações dos biomarcadores previamente utilizados, abordando as novidades nesta área de investigação e as suas vantagens no diagnóstico, decisão terapêutica e consequente prognóstico.

Metodologia

As bases de dados PubMed® e Google Scholar® foram utilizadas para procurar artigos publicados entre 2009 e 2021, utilizando as seguintes palavras-chave MeSH: "Testicular Neoplasms", "Biomarkers", "MicroRNAs", "Diagnosis", "Prognosis", "Follow-up" e "Serum Tumor Markers". Apenas foram considerados estudos em inglês. No conjunto, incluiu-se 134 artigos. Com base na leitura do título e resumo de cada artigo, foram selecionados 89 para leitura do texto completo. Além disso, foram analisadas as bibliografias de 27 artigos de revisão, e foram lidos 8 artigos adicionais. Globalmente, 50 artigos de investigação foram considerados relevantes e incluídos na presente revisão.

Biomarcadores atuais/clássicos

Atualmente, os biomarcadores disponíveis utilizados nesta patologia são a AFP, a β-HCG e LDH.[20]

AFP

A AFP é uma glicoproteína de cadeia única, pesando cerca de 70 kDa, e com uma semivida de 5 a 7 dias.[26] Está presente em maior quantidade no sangue fetal, tendo funções semelhantes às da albumina no adulto. Numa fase inicial da gestação, a sua síntese ocorre a nível do saco vitelino. No final do 3.º trimestre de gestação, é sintetizada quase na sua totalidade pelos hepatócitos.[27] Após o nascimento, no ser humano os valores de AFP decrescem atingindo níveis indetetáveis em ensaios de radioimunidade, sendo os limites normais entre 1.0 IU/mL e 50 IU/mL.[28]

Além da neoplasia testicular, o aumento da sua quantidade sérica pode ser observado em diversas situações como no carcinoma hepatocelular, pulmonar e pancreático, no adenocarcinoma gástrico ou ainda noutras patologias não malignas como em indivíduos que sofram de doença hepática crónica (seja hepatites virais ou cirrose hepática), de ataxia-telangiectasia, de tirosinemia hereditária ou de forma iatrogénica, seja pela utilização de fármacos antiepiléticos e anestésicos ou aquando de procedimentos do trato gastrointestinal e/ou glândulas anexas. A pouca especificidade deve-se à sua função no processo de hematopoiese, realizado a nível hepático, sendo este um dos principais fatores limitantes da sua utilização como marcador. [7,20,27]

Na neoplasia testicular, a produção deste biomarcador é reservada ao subgrupo de TCGIS, com a particularidade de não ser produzido por seminomas. Este pormenor torna-se relevante na medida em que, se um homem se apresentar clinicamente com um seminoma mas apresentar elevação continuada de AFP, então, a estratégia terapêutica deve ser alterada, retificando o diagnóstico e procedendo ao tratamento como se de um TCGNS se trate.[29]

O diagnóstico inverídico pode justificar-se quando um seminoma sofre metaplasia num TCGNS. Esta teoria pode ser corroborada por um estudo que analisou seminomas histologicamente puros e que detetou, em 60% dos indivíduos, níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de AFP que não seriam detetados pelo método de imuno histoquímica.[26]

β-hCG

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma glicoproteína com cerca de 37,5 kDa de peso molecular e com uma semivida de 12 a 36 horas, sendo produzida primariamente por células sinsiciotrofoblásticas. Por este motivo, é detetável durante a gravidez. Contudo, além das células placentárias, os tumores trofoblásticos e não trofoblásticos também expressam estas moléculas. Nomeadamente, apresentam reatividade imunológica à subunidade β de hCG. Em indivíduos do sexo masculino com idade inferior a 60 anos, os valores de referência da concentração de hCG e β-hCG são 0,7 IU/L e 0,04 IU/L, respetivamente. Tendo em conta que, em indivíduos no seu estado normal, as concentrações plasmáticas de hCG ou β-hCG são baixas, torna-se assim um bom marcador, dada a sua elevada sensibilidade. A elevação de β-hCG em patologias tumorais e a sua associação com a agressividade neoplásica, deve-se a esta prevenir a apoptose das células tumorais e consequentemente permitir o seu crescimento.[7,30]

Em virtude da relação entre as células trofoblásticas e os níveis de β-hCG, há um aumento significativo deste marcador em determinados tumores, como o coriocarcinoma. Na neoplasia testicular, a elevação de hCG ocorre em 40 a 50% dos homens com TCGNS, sendo que nos seminomas puros, apenas 15 a 20% apresentam elevação deste biomarcador. Além da elevação deste biomarcador ser mais frequente, em indivíduos com TCGNS é também mais exuberante, comparativamente aos seminomas puros.[30]

Outras patologias que podem apresentar elevação de hCG são o hipogonadismo, adenomas gonadotróficos e as neoplasias da mama, renal, vesical, hepática, gástrica ou pulmonar, diminuindo assim a sua especificidade.[7,30] Embora outrora se pensasse que o consumo de canábis estivesse relacionado com o aumento da concentração de hCG, estudos recentes refutam esta hipótese.[31]

LDH

A LDH é uma enzima, de massa molecular de 134 kDa, que catalisa a oxidação do L-lactato em piruvato, sedo que é detetada e quantificada através da taxa de produção de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH).[32]

Existem cinco isoenzimas desta molécula. A isoforma LDH-1 é predominantemente expressa a nível cardíaco, pelos eritrócitos e pelo rim. As isoformas LDH-2, LDH-3, LDH-4 derivam de leucócitos, nódulos linfáticos, pulmões e baço. A isoforma LDH-5 é predominante a nível hepático e a nível músculo-esquelético.[32]

Na neoplasia testicular, a isoforma predominante é a LDH-1.[7,32] A elevação deste biomarcador ocorre em cerca de 40 a 60% dos homens com neoplasia testicular, quer seja em seminomas ou TCGNS, sendo que a sua deteção dependente do método laboratorial, o que afeta a sua sensibilidade como biomarcador.[29]

A LDH pode estar elevada em patologias como distúrbios musculoesqueléticos, embolismo pulmonar, leucemia, talassemia, hemólise ou mesmo num enfarte do miocárdio. A sua utilização é tão abrangente que até integra, por exemplo, os critérios de Light na distinção de líquido pleural exsudativo de transudativo.[29] Numa perspetiva no contexto da pandemia COVID-19, de salientar que o marcador LDH, dada a sua relação multiorgânica, foi utilizado como marcador de prognóstico no contexto de infeção grave.[33]

Esta baixa especificidade é uma desvantagem, na medida em que poderá estar elevada mesmo nos processos fisiológicos associados ao aumento do *turnover* celular.[7]

Todos estes fatores contribuem para que a sensibilidade e especificidade dos marcadores clássicos sejam reduzidas.

Outros marcadores

Outros biomarcadores já estudados são a fosfatase alcalina placentária (PLAP), o anticorpo do recetor das células T *locus* alfa-1-60 (TRA-1-60) e enolase específica neuronal (NSE), contudo, não são utilizados na clínica dada o seu baixo valor preditivo positivo (VPP), como é o caso da PLAP que habitualmente pode encontrar-se elevada em indivíduos fumadores.[7,34]

Desafios no diagnóstico da neoplasia testicular

A elevação de determinados marcadores é relativamente específica ao subtipo de TCG (ver Tabela I), contudo, relativamente pouco sensível. Nos TCGNS, ocorre um aumento de pelo menos um dos marcadores em cerca de 90% dos casos, ao passo que nos seminomas ocorre um aumento em apenas cerca de 30-40% dos casos.[29] No geral, aquando do diagnóstico, apenas é detetada elevação dos marcadores em 60% dos indivíduos o que representa a sua baixa sensibilidade.[7]

Assim, tal como em todas as doenças, a necessidade de um diagnóstico precoce é um ponto fundamental. A maioria dos indivíduos diagnosticados em fases mais avançadas da doença é tratada eficazmente (75-80%), porém sujeita a QT, radioterapia e/ou cirurgias mais agressivas. Consequentemente, tratamentos múltiplos e mais agressivos levarão inevitavelmente a elevada

morbilidade, seja pelos efeitos secundários das terapêuticas, seja por tumores secundários, patologias cardiovasculares, ou por afeção da fertilidade. Outros desafios diagnósticos são, por exemplo, o diagnóstico diferencial com epididimite, que pode atrasar o diagnóstico de neoplasia testicular em 2 a 3 meses.[19,22]

Deste modo, dadas as limitações quer a nível da apresentação clínica, quer do estudo de imagem, de modo a diminuir os cerca de 30% de casos que já se apresentam na forma metastizada, torna-se fundamental a investigação nesta área. Neste contexto, a eventual confirmação com exames complementares de diagnóstico, como a biópsia líquida, pode ser crucial.[19]

Dado o impacto significativo do cancro do testículo a nível psicossocial, incluindo planeamento familiar, o diagnóstico e prognóstico deverão ser o mais rigorosos possível. Desta forma, biomarcadores com boa sensibilidade e especificidade poderão ajudar a redefinir os tratamentos e realizá-los de forma mais ponderada.

Ao longo da vigilância, os biomarcadores clássicos também demonstram baixa sensibilidade. Em indivíduos com seminoma estadio clínico 1 (CS1) recidivante, apenas 3% apresentaram valores elevados dos marcadores clássicos, algo verificado em menor escala nos indivíduos com TCGNS recidivantes, que apresentaram elevação dos marcadores clássicos em 50% dos casos.[7]

Perante estas limitações, há uma necessidade de investigar, descobrir e definir novos marcadores que possibilitem um diagnóstico mais precoce e mais preciso, e seguimento mais fiável, permitindo também uma melhor decisão terapêutica.

Novos biomarcadores

Vários são os biomarcadores procurados para substituir os marcadores clássicos. Alguns, como é o caso do fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de inibidor de macrófago (MIF) e pleiotrofina (PTN), não demonstraram ter o valor diagnóstico esperado.[35]

Os marcadores estudados podem ser divididos em três distintas categorias: material genético livre (micro ácido ribonucleico (microRNAs) e *cell-free* DNA), células tumorais em circulação e vesículas extracelulares.

MicroRNAs

Por definição, microRNAs (miRNA) são um tipo de RNA de menores dimensões com cerca de 21 a 25 nucleótidos, que têm a capacidade de se ligar a RNA mensageiros, bloqueando assim a produção de proteínas.[36,37]

Existem diversos processos de comunicação celular autócrina, parácrina e endócrina. Os miRNA têm a capacidade de utilizar estes três processos de sinalização, permitindo alterar o metabolismo, proliferação, função e viabilidade celular.[37]

Os *clusters* de miRNA são definidos pelos primeiros 2 a 8 nucleótidos da extremidade 5' dos miRNA. Estes *clusters* são influenciados por diferentes fatores. A título de exemplo, a proteína tumoral 53 (TP53) promove a transcrição dos diferentes miRNA da família miR-34, e o gene MYC promove a transcrição do *cluster* miR-17–92. Os miRNA podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais, dependendo do tipo de tecidos alvo. Em geral, a sobrexpressão de miRNA atua como oncogene e a subexpressão como supressor tumoral.[38] Contudo, alguns miRNA podem atuar de diferente modo em diferentes tecidos; por exemplo, a sobrexpressão de miR-200 atua como oncogene no cancro da mama, e como supressor em tumores dos ovários, renais e pulmonares.[38]

Para deteção e avaliação de miRNA, é preferível a utilização de soro do indivíduo do que plasma sanguíneo, dado que este último está dependente de mais variáveis técnicas. Deste modo, a interpretação de quantificações retrospetivas de miRNA devem ser cautelosas.[39,40] A deteção deve ter por base a purificação à base de esferas magnéticas e *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR).[40]

A favor da utilização dos miRNA como marcadores é a sua concentração nos fluidos corporais, que, sendo aproximadamente estável, viabiliza a sua utilização como marcador de diagnóstico e de seguimento.[7,41] O sistema reprodutivo destaca-se neste contexto, já que os miRNA participam, nomeadamente, na regulação genética da espermatogénese.[37] Por este motivo, pressupôs-se que os diferentes miRNA têm um papel particularmente importante no processo de diferenciação celular, apoptose e desenvolvimento tumoral.

Na neoplasia testicular, de todos os miRNA estudados, foi o miR-371a-3p que demonstrou estar mais relacionado com a atividade da doença.[42,43] Além do miR-371a-3p, outros miRNA, nomeadamente miR-372 e miR-373 e miR-367, parecem estar associados a TCG.[41,44,45]

Os miRNA têm a capacidade de distinção de doença maligna de benigna[43,46], sendo esta particularidade fulcral na sua utilização como marcador diagnóstico.

Independentemente da idade dos indivíduos, a utilização de miRNA poderá ser útil, dada a elevada sensibilidade e especificidade em comparação aos marcadores clássicos.[47,48] No geral, a sensibilidade dos miRNA é superior a 90%. Contudo, como seria expectável, num estudo onde foram avaliados miR-371-3, miR-372, miR-373, miR-367, a utilização de uma sensibilidade de 95% resultou numa queda substancial a nível da especificidade. Assim, mantendo uma sensibilidade de 90%, possibilita uma especificidade entre 60 a 90%, para os miRNA analisados.[40]

Alguns autores defendem que a análise isolada de miR-371a-3p não tem valor inferior comparativamente à avaliação conjunta de miRNA. Todavia, uma análise conjunta de três miRNA (miR-371a-3p, miR-373-3p e miR-367-3p) revelou uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 91% com valores igualmente elevados de VPP e valor preditivo negativo (VPN) de 94% e 79%, respetivamente.[49,50] Congruentemente, a interpretação isolada de marcadores não é recomendada, devendo ser analisados diferentes miRNA, como o miR-371a-3p e o miR-367, ou então miRNA em conjunto com os biomarcadores clássicos, permitindo assim que os miRNA sirvam como uma ferramenta adicional no correto diagnóstico e classificação dos tumores.[40,42,51]

Os miRNA, além de valor de diagnóstico, poderão ter valor de prognóstico.[50,52] Por exemplo, a sobrexpressão de miR-371a-3p, no pré-operatório e pré-QT, parece correlacionar-se com pior prognóstico.[49,53]

Os miRNA são também úteis na vigilância de indivíduos com neoplasia testicular dada a sua relação com a carga tumoral.[49] Assim, quanto mais avançado o estadiamento, maior a expressão de miRNA, nomeadamente o miR-371a-3p.[41,42,54,55] Mesmo em indivíduos primariamente diagnosticados com TCGIS, a utilização de miR-371a-3p mostrou-se capaz de detetar doença residual, tendo um possível valor adicional na orientação destes indivíduos.[56,57]

Devido ao seu tempo de semivida consideravelmente curto –12 horas no caso de miR-371a-3p [58]– e à sua correlação com a atividade da doença, os miRNA podem ser eficazes na monitorização pré- *versus* pós-tratamento, seja cirúrgico ou por QT.[40,41,44–46,51,54,59–61]

Assim, findado o tempo de semivida dos miRNA, níveis consistentemente aumentados pós-tratamento poderão indicar recidiva[54,62], metastização ganglionar[59] ou à distância.[41,63] Por exemplo, foi descrita a utilidade dos miRNA no diagnóstico, prognóstico e orientação dos indivíduos com TCG e doença maligna intracraniana, com recurso a amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de soro.[48,64]

Apesar de miR-371a-3p se encontrar mais frequentemente elevado em TCGNS, a sua deteção em seminomas parece ter maior utilidade clínica.[42,43]

No diagnóstico de seminomas, o marcador clássico que mais se relaciona é a β-hCG, com sensibilidade de 30%. No entanto, estudos mais recentes parecem demonstrar maior utilidade na utilização de miRNA de forma combinada com os marcadores clássicos, ou mesmo, de forma isolada, apresentando sensibilidades de 75% e 71%, respetivamente.[42,43]

O miR-371a-3p, porém, não parece encontrar-se presentes noutros tumores, particularmente no caso de teratomas.[42,43,47,65,66] Dado haver expressão de miRNA diferentes em tumores diversos, a avaliação de *clusters*, parece ser promissora. Um miRNA que aparenta relacionar-se com a carga tumoral de teratomas é o miR-375. Através do doseamento conjunto de miR-375 e de miR-371, a elevação isolada de miR-375 demonstra uma eventual utilidade clínica na suspeita de teratomas. Porém, é necessário validar os resultados para um número mais alargado de casos.[61]

Outros miRNA que pareceram relacionar-se com teratomas são: miR-885-5p, miR-448 e miR-197-3p. Um estudo que avaliou a expressão concomitante de miR-885-5p e de miR-448 evidenciou uma sensibilidade de 93% e especificidade de 83%, com um VPP de 93% e VPN de 83% na deteção de teratomas. De notar que o miR-197-3p não mostrou expressão significativamente superior, quando comparado com indivíduos saudáveis. Apesar dos resultados promissores, a utilização de miR-885-5p e de miR-448 carece de validação. Tal advém, destes miRNA poderem encontra-se sobrexpressos em indivíduos que apresentem lesões com predomínio de fibrose e necrose.[60]

O miR-371a-3p pode não se encontrar expresso a nível sérico em teratomas. Contudo, dada a heterogeineidade celular que caracteriza esta entidade, foi possível evidenciar a expressão de miR-371a-3p no líquido de cistos de teratomas.[67]

A metodologia de colheita de amostra para pesquisa destes marcadores é crucial. Comparando a expressão de miR-371a-3p no sangue do plexo pampiniforme com veias periféricas, em indivíduos com cancro do testículo foi evidenciado que os valores a nível do sangue venoso testicular eram significativamente superiores, em comparação com indivíduos controlo.[41,55]

Um outro líquido no qual foi estudada a expressão de miRNA é o plasma seminal, tendo-se considerado que este não parece ser adequado para a avaliação de marcadores de TCG, comparando com as outras metodologias disponíveis.[68,69]

Atualmente, a capacidade de deteção de miRNA é discrepante em diferentes métodos. Para que, no futuro, esta técnica possa ser universalmente utilizada na prática clínica, é necessário protocolar a metodologia utilizada. Num estudo que comparou as diferentes metodologia, a que mostrou maior equilíbrio entre sensibilidade e especificidade – 90% e 75%, respetivamente – foi a utilizada pelos protocolos de TaqMan™ Advanced miRNA Assays.[42]

Este conjunto de marcadores poderá constituir então uma ferramenta importante no diagnóstico e vigilância de recidiva.[40]

Uma barreira na utilização destes marcadores é o seu preço. Em 2014, cada análise de miRNA tinha um custo associado, sem custo laboral, de 60 euros comparativamente com a AFP que tinha um custo de 10 euros.[41] Contrariamente ao esperado, em 2019, o preço de custo da análise de miRNA aumentou para cerca de 175 euros. O encargo financeiro do cancro testicular no sistema de saúde dos Estados Unidos é cerca de 1567 milhões de dólares/10 anos. Porém, mesmo com o aumento do preço do teste, a utilização consistente de miRNA no estudo dos indivíduos com TCG, prevê uma redução até 69 milhões de dólares ao ano.[70] Tal advém da redução do recurso a outros MCDT, como a TC, e a significativa redução dos indivíduos sobretratados, com consequente melhoria na gestão de recursos.[71]

As características dos estudos referidos encontram-se apresentadas na Tabela I e II.

Cell-Free DNA

Pela primeira vez descrito na literatura em 1948, por Mandel e Metais[72], e mais tarde, em, 1977, reportado em indivíduos com cancro[73], este fragmento de DNA é uma pressuposta ferramenta para a deteção e investigação de neoplasias. C*ell free* DNA (cfDNA) são fragmentos de dupla cadeia com cerca de 150 a 200 bases de comprimento. Pensa-se que são libertados na corrente sanguínea por apoptose/necrose de células tumorais, tendo uma semivida muito curta, até 1 hora, apresentando-se em concentrações muito variáveis, dependendo do estado fisiológico do indivíduo. As concentrações são superiores, na sua maioria, na presença de cancro.[74] Dado que, nos indivíduos com cancro, o cfDNA corresponde maioritariamente a *circulating tumor* DNA (ctDNA), são necessárias técnicas especificas para a sua correta deteção. São exemplos dessas técnicas diferentes métodos de fluorescência e *polymerase chain reaction* (PCR).[75] A quantificação só por si pode ter um valor limitado de diagnóstico, isto porque níveis aumentados de ácidos nucleicos podem encontra-se no plasma, soro ou qualquer fluido corporal, consequente a processos fisiológicos como estados inflamatórios ou trauma.[74,76,77] Contudo, o

acesso à informação genética tumoral permite a abertura de um outro campo de investigação, nomeadamente alterações genéticas e epigenéticas relacionadas com o tumor.[75]

No âmbito dos TCG, não existe variação aparentemente marcada, relativamente à elevação de cfDNA, quando comparados seminomas e TCGNS, permitindo a sua deteção no geral com uma sensibilidade de 87% e especificidade de 97%, apesar de não possibilitar uma distinção histológica. Mesmo em homens com biomarcadores clássicos em valores normais, evidenciou-se uma sensibilidade e especificidade de 84 e 97%, respetivamente.[77]

Foi também detetada elevação do DNA mitocondrial (mtDNA) livre em indivíduos com neoplasias. A elevação pronunciada de mtDNA provou correlacionar-se com mau prognóstico em outras neoplasias, como o cancro da prostata.[78] A nível da neoplasia testicular os melhores resultados surgiram do mtDNA-79, tendo apresentado uma sensibilidade de 60% e especificidade 94%. Além da baixa sensibilidade, o mtDNA-79 não demonstrou correlação com o estadiamento da doença nem com a classificação histológica. De notar que apresentou, para seminomas uma sensibilidade muito baixa de 49%, porém uma especificidade de 97%.[79]

Como referido, a análise de cfDNA pode permitir a análise genética. Por exemplo, a análise de LCR em indivíduos com TCG detetou, em 25% dos casos, mutações do KIT e/ou RAS.[80] Um outro exemplo, é o gene RASSF1A. Trata-se de um gene supressor tumoral que habitualmente está relacionado com diversas neoplasias, incluindo teratomas. O RASSF1A parece promover a transformação e regulação epigenética do DNA e correlaciona-se com diversas neoplasias quando hipermetilidado. Nesta perspetiva, é necessária mais investigação acerca dos padrões de metilação de DNA, analisando a correlação entre genes específicos e os tecidos envolvidos.[81] A capacidade de deteção de teratomas poderá ser assim particular, quando comparado com os miRNA.

Numa perspetiva futura, a análise conjunta de biomarcadores e pesquisa direta de determinadas mutações poderá vir a revolucionar o papel da biópsia líquida na neoplasia testicular. Na atualidade, a relativa baixa sensibilidade subjacente ainda não permite a sua utilização como marcador diagnóstico e de vigilância. Porém, no âmbito da medicina de precisão poderá ser uma mais valia na orientação de indivíduos com neoplasia testicular.

As características dos estudos referidos encontram-se apresentadas na Tabela III.

Células Tumorais Circulantes (CTC)

A disseminação de material tumoral caracteriza o processo de metastização. A hipótese da presença de células tumorais em circulação como necessária para a metastização foi descrita já

no século XIX por Thomas Ashworth.[82] A utilização destas células na prática clínica veio a tornar-se uma possibilidade com o desenvolvimento de técnicas como a citometria de fluxo com hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e PCR em tempo real (RT-PCR), e com a melhoria dos métodos de colheita de amostra sanguínea. Porém, a maioria dos métodos utilizados não possui sensibilidade suficiente em indivíduos com doença em estadios iniciais. Contudo, esta baixa sensibilidade poderá não dever-se ao baixo número de células, mas ao método utilizado.[83] Isto porque apenas uma ínfima percentagem de CTC têm capacidade de metastização.[84] Assim, a melhor opção para quantificação de CTC parece ser através do método utilizado pelo sistema CellSearch®. Este sistema permite a análise direta de CTC, possibilitando a sua caracterização fenotípica e genotípica, podendo ter valor prognóstico. Por certo, as CTC poderão auxiliar no estadiamento e orientação clínica dos indivíduos com cancro.[83]

A plasticidade celular, necessária ao correto funcionamento de todos os órgãos, é um processo necessário para ocorrer a metastização, pois permite às células tumorais adquirirem diferente expressão genética e possibilitando o eventual desenvolvimento de tumores à distância. Neste processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e transição mesenquima-epitelial (TME), foram identificados diversos marcadores (ver Tabela IV). [85]

A utilização de CTC como marcador sérico foi estudada em outras patologias como as neoplasias mamária, ovárica, prostática e pulmonar. Através da deteção de molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) e citoqueratina, a análise destes componentes e sua quantificação é facilitada. A expressão destes marcadores epiteliais é a mais sensível, sendo comum a mais de 80% das CTC nos indivíduos com carcinomas.[86,87]

De modo semelhante à análise dos miRNA, a sensibilidade da deteção de CTC é superior em amostras de sangue do plexo pampiniforme do que de sangue periférico. Tal como nos miRNA, a aplicação combinada de várias metodologias é preferida.[86]

Em certos casos, a presença de CTC relaciona-se com o estadio da doença. Os TCGNS são os que apresentam mais frequentemente CTC elevadas, podendo assim ser um bom marcador para este subtipo de neoplasia testicular, nomeadamente os teratomas.[86]

Nos indivíduos em avançado estado clínico, as CTC apresentam maior heterogeneidade, resultando em valores quantitativos de células EpCAM positivas baixos. Além disso, a utilização de CTC para avaliação da resposta ao tratamento poderá ser enviesada por células normais afetadas pelos fármacos citotóxicos que entram também em circulação. Para que seja possível a utilização de CTC como ferramenta de seguimento, é necessária a correta distinção de CTC.

Para tal, devem ser utilizados kits de deteção por FISH ou anticorpos específicos monoclonais.[86,87]

Existe uma relação entre a composição dos tumores e o seu prognóstico. Por exemplo, uma componente preponderante de carcinoma embrionário, é indicadora de pior prognóstico. Deste modo, as CTC poderão ser um bom marcador prognóstico, tendo em conta que foi detetada uma associação entre as CTC e o carcinoma embrionário.[88]

Na prática clínica, a utilização de CTC não parece ser viável, quer pela heterogeneidade de células tumorais e sua plasticidade celular, quer pelos custos associados e pela necessidade de utilização de volumes de amostras superiores. Contudo, de notar que a análise de uma célula tumoral em circulação poderá fornecer informações mais precisas quanto às características tumorais.[7]

As características dos estudos referidos encontram-se apresentadas na Tabela V.

Futuro em investigação

Para a evolução no descobrimento de biomarcadores, o desenvolvimento nas técnicas de identificação é um ramo importante. A nível sérico, a utilização de uma abordagem proteómica na identificação de biomarcadores na neoplasia testicular já identificou um possível *cluster*, através da identificação de cinco picos por eletroforese – CM10 ProteinChip R © (6.48, 6.84, 8.15, 8.17, 8.92 kDa) – com uma sensibilidade e especificidade de 89% e 92%, respetivamente. Dado ter-se demonstrado uma ferramenta promissora na identificação proteómica de marcadores a nível sérico, o mesmo estudo poderá ser realizado a nível do sémen.[89] Este poderá ser um produto de amostra alternativo à utilização de sangue venoso do plexo pampiniforme, cuja técnica de colheita é mais complexa e invasiva.

A nível do diagnóstico, avanços nas técnicas de isolamento de vesículas extracelulares poderão ser um passo essencial à investigação nestes indivíduos. As vesículas extracelulares podem conter material genético e estão envolvidas na comunicação célula a célula, podendo relacionar-se com a disseminação tumoral.[90]

Outro tipo de marcadores, com provável valor de diagnóstico e prognóstico, são os N-glicanos. Há alterações, que ocorrem em proteínas através do processo de glicosilação, que são patognomónicas de neoplasia, independentemente da histologia, mostrando ter valor diagnóstico, mesmo em indivíduos com marcadores clássicos negativos. Contudo, para a prática clínica, a utilização de N-glicanos carece de mais investigação.[9,91]

A elevação dos valores pré-operatórios de miR-371a-3p, em indivíduos com TCGNS com CS1, sugere a presença de invasão linfovascular, bem como possível carcinoma embrionário.[53] A associação entre valores elevados pré-operatórios de miR-371a-3p e carcinoma embrionário pode justificar-se por tal valor aumentado poder indiciar micro metástases e estar correlacionado com um carácter mais agressivo do carcinoma embrionário. Torna-se assim oportuno investigar a relação entre miR-371a-3p e o carcinoma embrionário, podendo este marcador auxiliar, no futuro, no correto diagnóstico e/ou estadiamento.

A vários níveis, a biópsia líquida pode ser o caminho futuro. O desenvolvimento desta ferramenta não invasiva, em detrimento de métodos menos económicos e mais lesivos, por exemplo a TC, poderá permitir a utilização de biomarcadores noutras áreas, nomeadamente no tratamento.[70] A capacidade dos miRNA poderem atuar como oncogenes ou supressores tumorais dependentes do tipo de tecidos alvo pode ser uma importante chave terapêutica. Atualmente existem várias estratégias terapêuticas baseadas na utilização de miRNA; são exemplos: "*sandwich RNA interference inhibition strategy", "Multiplex RNAi Inhibition Strategy", "miRNA Inhibition Therapy", "miRNA Mimetic Agents", "SMIRs — Small Molecules Inhibitors of miRNAs.* Algumas já provaram eficácia, não só *in vitro*, mas também, *in vivo*[38], existindo agora necessidade de investigação sobre a aplicabilidade destas estratégias no cancro testicular.

Limitações

A principal limitação que impede a comparação clara entre os estudos é a não universalidade dos protocolos de deteção e quantificação dos marcadores, dado não existir uma regulamentação universal. Igualmente, a disparidade entre estudos com populações pequenas e de diferentes países e a falta de estudos multicêntricos dificulta a validação universal dos biomarcadores.

Conclusão

A utilização de novos biomarcadores como ferramenta de previsão de padrões de doenças, possibilitando assim a sua utilização em etapas-chave na orientação de indivíduos com cancro, tem vindo cada vez mais a ser procurada. Com o objetivo de praticar uma medicina de precisão, cada vez menos invasiva, este método complementar de diagnóstico reveste-se de um valor especial. A biópsia líquida, contrariamente à biópsia tecidular clássica, poderá obter uma maior representatividade da heterogeneidade tumoral. Desta forma, possibilitará uma melhor orientação dos indivíduos ao longo das diferentes fases da doença, com uma colheita de sangue.

A utilização de amostras de sangue do plexo venoso testicular deve ser preferida em relação à utilização de amostras de sangue periférico.

Na prática clínica, são já utilizados marcadores séricos tumorais com valor diagnóstico, prognóstico e de vigilância. Os biomarcadores utilizados atualmente, apesar de sensíveis, carecem de especificidade. Enquanto numa avaliação inicial podem ser úteis, é importante recorrer a outros marcadores em diferentes situações, de modo a diminuir os falsos positivos, evitando o tratamento excessivo, e os falsos negativos, evitando recidivas inconspícuas. Para além disso, a elevação dos marcadores clássicos não apresenta padrões característicos das diferentes histologias tumorais, à exceção de que a AFP não é detetada nos seminomas puros.

Dos novos marcadores, os miRNA foram os que se demonstraram mais promissores. O miR-371a-3p é o miRNA que tem provado estar mais relacionado com os TCG, parecendo ser eficaz no diagnóstico, vigilância de recidiva e orientação de indivíduos com seminomas e TGCNS, excecionando teratomas. Apesar do miR-371a-3p se encontrar sobrexpresso nestes diferentes subtipos histológicos, dada a carência de especificidade na deteção de seminomas através de marcadores clássicos, é no diagnóstico de seminomas que o miR-371a-3p revela maior benefício. No diagnóstico de teratomas, os miRNA que poderão ser úteis são o miR-375, o miR-885-5p e o miR-448. Contudo, estes marcadores carecem de validação através de estudos mais alargados. A interpretação da expressão de miRNA não deve ser isolada, devendo-se recorrer ainda aos marcadores clássicos. No futuro, os miRNA poderão ter um papel importante também no tratamento. Atualmente existem diversas técnicas terapêuticas baseadas neste marcador, sendo aguardada a aplicabilidade no cancro testicular.

Na prática clínica, a utilização de cfDNA e CTC como substitutos dos existentes marcadores e dos miRNA não parece ser viável. Podem sim, em caso de dúvida, ser utilizadas para análise direta das características tumorais e no caso de indivíduos com teratomas.

Assim, as dúvidas relativamente à viabilidade da utilização na prática clínica destes marcadores mantêm-se, justificando-se por isso um estudo alargado, de maneira a compreender se a sobrevida e a qualidade de vida dos homens com neoplasia testicular melhoram com a utilização dos novos marcadores.

Anexos

Tabela I: Subtipos histológicos e biomarcadores correspondentes

	Seminoma	*Tumor do Saco Vitelino*	*Coriocarcinoma*	*Carcinoma embrionário*	*Teratoma*
AFP [92]	-	+++	-	+	-
B-hCG[92]	+	+	+++	+	-
LDH[92]	++	+	+	++	-
miR-371a-3p [42]	+	++	++	++	-
miR-367[60]	+	+	+	+	-
miR-375[60]	+	+	+	+	+
miR-885-5p[60]	N/A	N/A	N/A	N/A	+
miR-448[60]	N/A	N/A	N/A	N/A	+

Adaptado Dieckmann KP, Simonsen-Richter H, Kulejewski M, 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;2019:5030349.; Mørup N, Rajpert-De Meyts E, Juul A, Daugaard G, Almstrup K. Evaluation of Circulating miRNA Biomarkers of Testicular Germ Cell Tumors during Therapy and Follow-up-A Copenhagen Experience. Cancers (Basel). 2020;12(3):E759. e Lobo J, Gillis AJM, van den Berg A, et al. Identification and Validation Model for Informative Liquid Biopsy-Based microRNA Biomarkers: Insights from Germ Cell Tumor In Vitro, In Vivo and Patient-Derived Data. Cells. 2019;8(12):E1637.; + – Poderá ou não ser detetado; ++ – Frequentemente detetado, com expressão proporcional ao volume tumoral; +++ – Detetado em quase todos os casos em com elevada expressão proporcional ao volume tumoral; - – Nunca ou raramente associado; N/A – Não aplicável por falta de evidência.

Tabela II: Características dos estudos relativos a miRNA

Estudo	População	Biomarcador utilizado	Conclusões
Gillis et al., 2013 ([40])	80 TCG 47 Crtl 12 não TCG	miR-371-372-373 miR-302a,b,c miR-367 miR-200c	miR-371-3/367 – S 98.0% e E 48.3% Evidenciada relação entre estadiamento e expressão de marcadores. miR-371-3/367 demonstrou também relação com carga tumoral pré- e pós-cirurgia. A utilização de miR-371-3/367 em conjunto com AFP e hCG permitiu a correta classificação tumoral.
Syring et al., 2015 ([46])	59 TCG 84 Crtl 17 não TCG	miR-367-3p miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p cel-miR-39	miR-371a-3p – S 84.7% e E 99.0% miR-371a-3p parece demonstrar capacidade de distinção de doença maligna de benigna. A sua elevada S e E podem ajudar na orientação de indivíduos com TCG, especialmente na vigilância.
Dieckmann et al., 2016 ([54])	166 TCG 12 TCL Crtl: 12 saudáveis e 94 com patologia benigna escrotal	miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p miR-367-3p	miR-371a-3p – S 88.7% e E 93.4% miR-371a-3p é um marcador sensível e específico na abordagem de TCG. níveis elevados de expressão de miRNA pós-QT adjuvante podem ser indicadores de futura recidiva. miR-371a-3p parece ter capacidade de deteção de doença residual.
van Agthoven et al., 2017 ([50])	250 TCG 104 Crtl 60 não TCG	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	miR-371a-3p – S 90.0% e E 86.0%, VPP 94%, VPN 79% A análise combinada dos 3 marcadores revelou S de 90% e E de 91%. A análise de miRNA tem valor diagnóstico e prognóstico em TCG
Dieckmann et al., 2019 ([47])	616 TCG (359 seminoma e 257 TCGNS) 258 Crtl	miR-371a-3p	miR-371a-3p – S 90.1%, E 94.0%, VPP 97.2% miR-371a-3p tem uma S e E superiores aos marcadores clássicos. Mostrou expressão em todos os subtipos histológicos de TCG, exceto em teratomas. Apresentou na vigilância e deteção de recidivas sensibilidade de 82,6%.
Badia et al., 2021 ([51])	58 TCG 11 Crtl	miR-371a-3p	miR-371a-3p – S 93.0% e E 100% A análise combinada de miR-371a-3p e biomarcadores clássicos é preferida. miR-371a-3p tem valor diagnóstico e vigilância, auxiliando a orientação terapêutica.
van Agthoven et al., 2017 ([63])	6 TCG recidivante	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	A utilização de miRNA é mais sensível no diagnóstico primário e na deteção de recidivas e doença residual do que com marcadores clássicos. Os níveis de miR-371a-3p parecem correlacionar-se com o estadiamento de TCG. Nenhum marcador provou-se específico na deteção de teratoma maduro residual.
Terbuch et al., 2018 ([62])	52 amostras de 10 TCG	miR-371a-3p miR-367	O miR-371a-3p parece útil na deteção de recidiva, contrariamente ao miR-367. Não foi descrita expressão de miRNA em teratomas.

	(4 seminomas e 6 TCGNS)		Dos marcadores clássicos apenas β-hCG demonstrou eficácia na deteção de recidiva.
Rosas Plaza et al., 2019 ([52])	109 TCG; 104 Crtl	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	miR-371a-3p – S 57% na deteção de recidiva miR-371a-3p, miR-373-3p, e miR-367-3p parecem ser úteis na vigilância de TCG metastizado, demonstrando valor prognóstico.
Mego et al., 2019 ([49])	281 amostras de 180 TCG; 50 Crtl	miR-371a-3p	miR-371a-3p: S 89%, E 90%; miRNA combinados: S 92%, E 91% Os valores pré-QT de miR-371a-3p têm valor prognóstico, contrariamente a antes do 2º ciclo de QT. Estudos mais recentes indicam que a análise combinada de miRNA não provou ser superior à análise isolada de miR-371a-3p. miR-371a-3p parece correlacionar-se com a carga tumoral.
Nappi et al.,2019 ([56])	132 amostras de 111 TCG	miR-371a-3p	miR-371a-3p: S 96%, E 100%, VPP 100% e VPN 98% Foi evidenciada a capacidade de miR-371a-3p detetar quantidade residual de doença, sugerindo assim a sua utilidade como marcador de vigilância.
Mørup et al., 2020 ([42])	52 TCG 22 Crtl	miR-367-3p miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p	Comparadas 3 metodologias de purificação e quantificação de miRNA, o método LifeTech® mostrou os melhores resultados (S 90% e E 75%). Um indivíduo com seminoma não apresentou elevação de nenhum miRNA. Nenhum miRNA apresentou sobrexpressão em indivíduos com teratoma puro. Verificou-se maior estabilidade a nível sérico de miR-20a. Há evidência de relação direta entre carga tumoral e miR-371a-3p. Dos marcadores clássicos β-hCG é mais sensível. A análise combinada de miRNA e marcadores clássicos parece mostrar maior capacidade de deteção de doença (S 85%). O maior benefício da utilização de miRNA é nos indivíduos com seminomas. A discrepância na capacidade de deteção de miRNA por diversos métodos é problema na comparação de estudos.
Bagrodia et al., 2020 ([66])	TCGNS em estadio Ia e Ib	miR-371a-3p	miR-371a-3p – S e E >90% na deteção de doença residual Os miRNA auxiliam na orientação de indivíduos com TCG. Os miRNA mostram também ser custo eficiente, permitindo assim uma gestão de recursos mais adequada, com redução dos custos associados na abordagem a um indivíduo com cancro testicular. Não mostrou eficácia na deteção de teratoma puro.

Lobo et al., 2021 ([71])	151 TCG CS1 (101 seminomas e 50 TCGNS)	miR-371a-3p	A análise de miR-371a-3p pós-orquidectomia não parece ser útil. Contudo, pode ser usado como marcador auxiliar de deteção precoce recidiva e na vigilância, possibilitando a diminuição do recurso à TC. O doseamento de miR-371a-3p não parece fornecer informações precoces de possível recidiva, contudo há evidência de possível relação com o estadiamento.
Leão et al., 2018 ([59])	82 TCG 11 Crtl	miR-371a-3p miR-373-3p miR-367-3p	Quer isoladamente, quer combinado com miR-373-3p, o miR-371a-3p parece detetar doença residual em indivíduos com biomarcadores clássicos negativos.
Lobo et al., 2019 ([60])	12 TCG CS1 5 Crtl	miR-885-5p miR-448 miR-197-3p	Análise combinada de miR-885-5p/miR-448: S 93.3%, E 83.3%, VPP 93.3%, e VPN 83,3% na deteção de teratomas. miR-197-3p não parece relacionar-se com a atividade tumoral de teratomas.
	36 TCGNS sob QT 12 Crtl	miR-375 miR-371	miR-371a-3p parece demonstrar benefício na vigilância em indivíduos submetidos a QT. O miR-375 não parece possuir valor no diagnóstico de teratoma.
Lafin et al., 2020 ([43])	22 TCG CS1 (4 seminomas 18 TCGNS) 2 TCG CS2	miR-371a-3p	miR-371a-3p: S 100% e E 92% na deteção de doença maligna *versus* benigna e teratoma em doentes não submetidos a QT prévia.
Nappi et al., 2020 ([61])	41 Teratoma 48 TCG 11 pós QT	miR-375 miR-371	miR-371a-3p parece demonstrar valor na deteção de doença residual em indivíduos com TCG. A interpretação combinada miR-375/miR-371 sugere presença de teratoma.
Spiekermann et al., 2015 ([41])	25 TCG 6 TCGIS; Crtl: 20 saudáveis e 24 NNT	miR-371a-3p	miR-371a-3p parece relacionar-se com o estadiamento e atividade tumoral de TCG. Detetado expressão de miR-371a-3p a nível do plasma seminal, líquido pleural, sem deteção a nível da urina.
Dieckmann et al., 2016 ([55])	64 TCG (51 CS1, 13 CS2-3), 9 dos quais com hidrocelo	miR-371a-3p	Parece ser preferível a utilização de amostras de sangue venoso testicular. A expressão de miR-371a-3p no sangue venoso testicular e em fluido de hidrocelo parece correlacionar-se com estadiamento, e vigilância.
Murray et al., 2016 ([48])	45 amostras de soro e LCR de 25 indivíduos em idade pediátrica	miR-371a-3p miR-372-3p miR-373-3p miR-367-3p	Os miRNA parecem ser altamente sensíveis e específicos para diagnóstico em idade pediátrica de TCG, deteção precoce de recidivas e distinção de doença intracraniana maligna TCG VS não TCG, utilizando amostras de LCR e de soro.
Anheuser et al., 2017 ([93])	5 seminomas	miR-371a-3p	miR-371a-3p mostrou ter valor na orientação de doentes com seminomas, apresentando

			valores claramente superiores aos de referência.
Pelloni et al., 2017 ([68])	28 TCG 28 Crtl saudáveis	miR-302a‑d miR-371 miR-372 miR-373 miR-142-3p miR-34b miR-27a miR-590-5p miR-374	A expressão de miR-371 e miR-272 parece correlacionar-se com TCG. O miR-272 não parece ser bom marcador a nível do líquido seminal. A utilização do líquido seminal necessita de investigação adicional. Expressão de miR-34b parece possuir uma função supressora tumoral.
Radtke et al., 2017 ([57])	27 TCG (11 seminomas, 16 TCGIS)	miR-371a-3p miR.367-3p	miR-371a-3p demonstra possível utilidade como biomarcador de vigilância e na orientação de indivíduos TCGIS
Radtke et al., 2018 ([58])	24 TCG CS1 (20 seminomas e 4 TCGNS)	miR-371a-3p	Níveis de expressão de miR-371a-3p apresenta um tempo de semivida inferior a 12h. Aparente valor adicional na avaliação de doentes com TCG.
Radtke et al., 2019 ([69])	Amostras líquido seminal: 20 TCG e 30 Crtl; 12 saudáveis 38 amostras de sémen	miR-371a-3p	Detetada expressão de miR-371a-3p no líquido seminal. Aparente relação entre expressão de miR-371a-3p e concentração de espermatozoides.
Spiller and Lobo et al., 2020 ([94])	15 seminomas 134 TCGNS 5 TCGIS 30 Crtl	CRIPTO miR-371a-3p	Evidenciada relação entre concentração de CRIPTO e estadiamento de indivíduos com TCG, evidenciando maior relação com TCGNS. miR-371a-3p parece ser o melhor biomarcador na avaliação de TCG.
Dieckmann et al., 2020 ([67])	4 TCG CS2–3	miR-371a-3p	miR-371a-3p pode ser expresso no líquido de cistos de teratomas. Pode justificar-se pela heterogeneidade celular, o que possibilita a presença de células germinativas ativas.
Murray et al., 2020 ([64])	3 TCG e 1 histiocitose células de Langerhans	miR-371a-3p	Doseamento de miR-371a-3p no LCR parece ser útil para o diagnóstico, prognóstico e orientação de indivíduos com TCG e doença maligna intracraniana.
Belge et al., 2021 ([65])	99 não TCG; Crtl: 20 TCG e 37 saudáveis	miR-371a-3p	miR-371a-3p não parece encontrar-se expresso em neoplasias não TCG, sugerindo E para TCG.

Crtl – Controlo(s); S – Sensibilidade; E – Especificidade; TCL – Tumores das células de Leydig; NNT – Neoplasia não testicular; (verde: diagnóstico; vermelho: vigilância; azul: identificação de metástases; branco: outros)

Tabela III: Características dos estudos relativos a cfDNA

Estudo	População	Conclusões
Ellinger et al. 2009 ([79])	74 TCG (39 seminomas e 35 TCGNS) 35 Crtl saudáveis	mtDNA-79: S 59,5% e E 94.3% na distinção de TCG de indivíduos saudáveis mtDNA-79: S 64.5% e E 91.4% na distinção de TCG com marcadores clássicos normais e indivíduos saudáveis. Os níveis de mtDNA não parecem correlacionar-se com o estadiamento, nem com a classificação histológica de TCG.
Ellinger et al. 2009 ([77])	74 TCG (39 seminomas e 35 TCGNS) 35 Crtl saudáveis	S 87% e E 97% na distinção de TCG de indivíduos saudáveis Mesmo em doentes com biomarcadores clássicos normais, permitiu com uma S de 84% e uma E de 97% o seu diagnóstico. Os níveis de cfDNA estavam mais frequentemente aumentados em CS3
Takayasu et al, 2020 ([80])	12 TCG com doença no SNC (8 seminomas e 4 TCGNS)	Em 25% dos doentes foram detetadas mutações do KIT e/ou RAS. Ainda mutações como MAP2K1 são descritas.

Crtl- Controlo(s); S – Sensibilidade; E – Especificidade

Tabela IV: Marcadores identificados no processo de transição epitélio-mesenquimal e transição mesênquima-epitelial

<table>
<tr><td rowspan="2">Marcadores Epiteliais
Caderina epitelial
Claudinas
Ocludinas
Desmoplaquina
Citoqueratina-8, -9, e -18
Mucina-1</td><td>Efetores TEM→
Fatores de crescimento
Citocinas
Matriz Extracelular</td><td rowspan="2">Marcadores Mesenquimais
Fibronectina
Vitronectina
FSP1
Vimentina
Actina do músculo liso
FGFR2 IIIb e IIIc</td></tr>
<tr><td>←Efetores TME
Adesão
MFs de actina do córtex</td></tr>
</table>

Adaptado de Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(2), 131–142. Transição epitélio-mesenquimal (TEM); Transição mesênquima-epitelial (TME); Microfilamentos (MFs); Proteína fibroblástica específica 1 (FSP1); Recetor 2 do fator de crescimento fibroblástico (FGFR2).

Tabela V: Características dos estudos relativos a CTC

Estudo	População	Conclusões
Nastaly, et al. 2021 ([86])	74 TCG (39 seminomas e 35 TCGNS) 35 Crtl saudáveis	A utilização combinada de diferentes metodologias para deteção de CTC parece ser superior à sua utilização singular (17.5%). A utilização de sangue do plexo venoso testicular é preferida, comparativamente à utilização de sangue periférico. A prevalência de CTC em doentes que apresentam doença metastizada é de 41%, sendo de 100% nos doentes que apresentam doença refratária à QT.
Nastaly, et al. 2014 ([88])	143 amostras de sangue periférico e 19 amostras intraoperatória)	Em amostras de sangue periférico apenas 18% dos indivíduos diagnosticados com TCG é que foram detetadas CTC, existindo uma correlação entre a sua presença e o estadiamento da doença.

Crtl- Controlo(s);

Bibliografia

1. Definition of biomarker - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Published February 2, 2011. Accessed December 26, 2021. https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker
2. Definition of biopsy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Published February 2, 2011. Accessed December 26, 2021. https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biopsy
3. Definition of liquid biopsy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Published February 2, 2011. Accessed December 26, 2021. https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy
4. Cheung AHK, Chow C, To KF. Latest development of liquid biopsy. *J Thorac Dis*. 2018;10(Suppl 14):S1645-S1651.
5. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *International Journal of Cancer*. 2021;148(3):528-545.
6. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(4):219-232.
7. 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):2654.
8. Park JS, Kim J, Elghiaty A, Ham WS. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(37):e12390.
9. Leão R, Ahmad AE, Hamilton RJ. Testicular Cancer Biomarkers: A Role for Precision Medicine in Testicular Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(1):e176-e183.
10. U.S. Cancer Statistics: Male Urologic Cancers | CDC. Published November 4, 2021. Accessed December 27, 2021. https://www.cdc.gov/cancer/uscs/about/data-briefs/no21-male-urologic-cancers.htm
11. Cancer Over Time: Age-standardized rate (World) per 100 000, incidence, males - UK, England and Wales. Accessed May 16, 2022. https://gco.iarc.fr/overtime
12. Cancer Over Time: Age-standardized rate (World) per 100 000, incidence, males - Sweden. Accessed May 16, 2022. https://gco.iarc.fr/overtime
13. Znaor A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, et al. Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. *Int J Cancer*. 2020;147(3):820-828.
14. Baird DC, Meyers GJ, Hu JS. Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2018;97(4):261-268.
15. Walschaerts M, Muller A, Auger J, et al. Environmental, occupational and familial risks for testicular cancer: a hospital-based case-control study. *Int J Androl*. 2007;30(4):222-229.
16. Lerro CC, McGlynn KA, Cook MB. A systematic review and meta-analysis of the relationship between body size and testicular cancer. *Br J Cancer*. 2010;103(9):1467-1474.
17. Dieckmann KP, Pichlmeier U. Is risk of testicular cancer related to body size? *Eur Urol*. 2002;42(6):564-569.
18. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*. 2016;70(1):93-105.
19. Lobo J, Gillis AJM, Jerónimo C, Henrique R, Looijenga LHJ. Human Germ Cell Tumors are Developmental Cancers: Impact of Epigenetics on Pathobiology and Clinic. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):E258.
20. Milose JC, Filson CP, Weizer AZ, Hafez KS, Montgomery JS. Role of biochemical markers in testicular cancer: diagnosis, staging, and surveillance. *Open Access J Urol*. 2011;4:1-8.
21. Rupp TJ, Leslie SW. Epididymitis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2021. Accessed December 27, 2021. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430814/
22. Moul JW. Timely Diagnosis of Testicular Cancer. *Urologic Clinics of North America*. 2007;34(2):109-117.

23. Gilligan T, Lin DW, Aggarwal R, et al. Testicular Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(12):1529-1554.
24. Esen B, Yaman MÖ, Baltacı S. Should we rely on Doppler ultrasound for evaluation of testicular solid lesions? *World J Urol*. 2018;36(8):1263-1266.
25. Honecker F, Aparicio J, Berney D, et al. ESMO Consensus Conference on testicular germ cell cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29(8):1658-1686.
26. Yuasa T, Yoshiki T, Ogawa O, et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA in seminoma. *J Androl*. 1999;20(3):336-340.
27. Crandall BF. Alpha-fetoprotein: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1981;15(2):127-185.
28. Ball D, Rose E, Alpert E. Alpha-fetoprotein levels in normal adults. *Am J Med Sci*. 1992;303(3):157-159.
29. Gilligan TD, Seidenfeld J, Basch EM, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline on uses of serum tumor markers in adult males with germ cell tumors. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3388-3404.
30. Stenman UH, Alfthan H, Hotakainen K. Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clin Biochem*. 2004;37(7):549-561.
31. Braunstein GD, Thompson R, Gross S, Soares JR. Marijuana use does not spuriously elevate serum human chorionic gonadotropin levels. *Urology*. 1985;25(6):605-606.
32. Jialal I, Sokoll LJ. Clinical utility of lactate dehydrogenase: a historical perspective. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):158-159.
33. Li G, Xu F, Yin X, et al. Lactic dehydrogenase-lymphocyte ratio for predicting prognosis of severe COVID-19. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(4):e24441.
34. Mir MC, Pavan N, Gonzalgo ML. Current Clinical Applications of Testicular Cancer Biomarkers. *Urol Clin North Am*. 2016;43(1):119-125.
35. Hauser S, Kaminski A, Syring I, et al. Evaluation of Serum Biomarkers (FGF-2, HGF, MIF and PTN) in Patients With Testicular Germ Cell Cancer. *In Vivo*. 2019;33(6):1935-1940.
36. Definition of microRNA - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Published February 2, 2011. Accessed March 2, 2022. https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/microrna
37. Gross N, Kropp J, Khatib H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)*. 2017;6(3):E34.
38. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine*. 2016;12:34-42.
39. Murray MJ, Watson HL, Ward D, et al. "Future-Proofing" Blood Processing for Measurement of Circulating miRNAs in Samples from Biobanks and Prospective Clinical Trials. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2018;27(2):208-218.
40. Gillis AJM, Rijlaarsdam MA, Eini R, 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):1083-1092.
41. Spiekermann M, Belge G, Winter N, 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.
42. Mørup N, Rajpert-De Meyts E, Juul A, Daugaard G, Almstrup K. Evaluation of Circulating miRNA Biomarkers of Testicular Germ Cell Tumors during Therapy and Follow-up-A Copenhagen Experience. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):E759.
43. Lafin JT, Singla N, Woldu SL, et al. Serum MicroRNA-371a-3p Levels Predict Viable Germ Cell Tumor in Chemotherapy-naïve Patients Undergoing Retroperitoneal Lymph Node Dissection. *Eur Urol*. 2020;77(2):290-292.
44. Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, 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):1754-1760.

45. 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):1068-1069.
46. 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. *J Urol*. 2015;193(1):331-337.
47. Dieckmann KP, Radtke A, Geczi L, 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. *J Clin Oncol*. 2019;37(16):1412-1423.
48. Murray MJ, Bell E, Raby KL, et al. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. *Br J Cancer*. 2016;114(2):151-162.
49. Mego M, van Agthoven T, Gronesova P, et al. Clinical utility of plasma miR-371a-3p in germ cell tumors. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1128-1136.
50. van Agthoven T, Looijenga LHJ. Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum based microRNA detection (ampTSmiR test). *Oncotarget*. 2017;8(35):58037-58049.
51. Badia RR, Abe D, Wong D, et al. Real-World Application of Pre-Orchiectomy miR-371a-3p Test in Testicular Germ Cell Tumor Management. *J Urol*. 2021;205(1):137-144.
52. Rosas Plaza X, van Agthoven T, Meijer C, 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):E1221.
53. Dieckmann KP, Dumlupinar C, Radtke A, et al. Associations of serum levels of microRNA-371a-3p (M371) with risk factors for progression in nonseminomatous testicular germ cell tumours clinical stage 1. *World J Urol*. Published online November 14, 2021. Accessed March 2, 2022. https://doi.org/10.1007/s00345-021-03876-2
54. Dieckmann KP, Radtke A, Spiekermann M, et al. Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. *Eur Urol*. 2016;71(2):213-220.
55. Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, et al. MicroRNA miR-371a-3p - A Novel Serum Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Evidence for Specificity from Measurements in Testicular Vein Blood and in Neoplastic Hydrocele Fluid. *Urol Int*. 2016;97(1):76-83.
56. Nappi L, Thi M, Lum A, et al. Developing a Highly Specific Biomarker for Germ Cell Malignancies: Plasma miR371 Expression Across the Germ Cell Malignancy Spectrum. *J Clin Oncol*. 2019;37(33):3090-3098.
57. Radtke A, Cremers JF, Kliesch S, 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):2383-2392.
58. Radtke A, Hennig F, Ikogho R, et al. The Novel Biomarker of Germ Cell Tumours, Micro-RNA-371a-3p, Has a Very Rapid Decay in Patients with Clinical Stage 1. *Urol Int*. 2018;100(4):470-475.
59. Leão R, van Agthoven T, Figueiredo A, et al. Serum miRNA Predicts Viable Disease after Chemotherapy in Patients with Testicular Nonseminoma Germ Cell Tumor. *J Urol*. 2018;200(1):126-135.
60. Lobo J, Gillis AJM, van den Berg A, et al. Identification and Validation Model for Informative Liquid Biopsy-Based microRNA Biomarkers: Insights from Germ Cell Tumor In Vitro, In Vivo and Patient-Derived Data. *Cells*. 2019;8(12):E1637.
61. Nappi L, Thi M, Adra N, 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):16-19.
62. Terbuch A, Adiprasito JB, Stiegelbauer V, et al. MiR-371a-3p Serum Levels Are Increased in Recurrence of Testicular Germ Cell Tumor Patients. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):E3130.

63. van Agthoven T, Eijkenboom WMH, Looijenga LHJ. microRNA-371a-3p as informative biomarker for the follow-up of testicular germ cell cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017;40(4):379-388.
64. Murray MJ, Ajithkumar T, Harris F, et al. Clinical utility of circulating miR-371a-3p for the management of patients with intracranial malignant germ cell tumors. *Neurooncol Adv*. 2020;2(1):vdaa048.
65. Belge G, Grobelny F, Radtke A, 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):435-443.
66. Bagrodia A, Savelyeva A, Lafin JT, 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.
67. Dieckmann KP, Hennig F, Anheuser P, et al. High Expression of microRNA-371a-3p in Cystic Fluid of Post-Chemotherapy Teratoma with Concurrent Normal Serum Levels in Patients with Non-Seminomatous Testicular Germ Cell Tumours. *Urol Int*. 2020;105(1-2):21-26.
68. Pelloni M, Coltrinari G, Paoli D, et al. Differential expression of miRNAs in the seminal plasma and serum of testicular cancer patients. *Endocrine*. 2017;57(3):518-527.
69. Radtke A, Dieckmann KP, Grobelny F, et al. Expression of miRNA-371a-3p in seminal plasma and ejaculate is associated with sperm concentration. *Andrology*. 2019;7(4):469-474.
70. Charytonowicz D, Aubrey H, Bell C, et al. Cost Analysis of Noninvasive Blood-Based MicroRNA Testing Versus CT Scans for Follow-up in Patients With Testicular Germ-Cell Tumors. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(4):e733-e744.
71. Lobo J, Leão R, Gillis AJM, 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):483-491.
72. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-243.
73. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-650.
74. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181-232.
75. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-437.
76. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1754-1765.
77. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol*. 2009;181(1):363-371.
78. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):421-426.
79. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int*. 2009;104(1):48-52.
80. Takayasu T, Shah M, Dono A, et al. Cerebrospinal fluid ctDNA and metabolites are informative biomarkers for the evaluation of CNS germ cell tumors. *Sci Rep*. 2020;10(1):14326.
81. Malpeli G, Innamorati G, Decimo I, et al. Methylation Dynamics of RASSF1A and Its Impact on Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):E959.
82. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australasian Medical Journal*. 1869:vol. 14, pp. 146-147.
83. 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):351-365.

84. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2' -deoxyuridine23. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1970;45(4):773-782.
85. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):131-142.
86. Nastały P, Honecker F, Pantel K, Riethdorf S. Detection of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Patients with Testicular Germ Cell Tumors. *Methods Mol Biol*. 2021;2195:245-261.
87. Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummar S, Evrard YA, Kinders RJ. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Semin Oncol*. 2016;43(4):464-475.
88. Nastały P, Ruf C, Becker P, et al. Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2014;20(14):3830-3841.
89. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Pierconti F, Pontecorvi A. Proteomics for the Identification of Biomarkers in Testicular Cancer-Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:462.
90. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7):E727.
91. Narita T, Hatakeyama S, Yoneyama T, et al. Clinical implications of serum N-glycan profiling as a diagnostic and prognostic biomarker in germ-cell tumors. *Cancer Med*. 2017;6(4):739-748.
92. Dieckmann KP, Simonsen-Richter H, Kulejewski M, 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;2019:5030349.
93. 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.
94. Spiller CM, Lobo J, Boellaard WPA, Gillis AJM, Bowles J, Looijenga LHJ. CRIPTO and miR-371a-3p Are Serum Biomarkers of Testicular Germ Cell Tumors and Are Detected in Seminal Plasma from Azoospermic Males. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):E760.

INSTITUTO DE **CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR**

