

Flavio Mavignier Cárcano

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES E GENÉTICAS NOS TUMORES DE CÉLULAS
GERMINATIVAS DO TESTÍCULO E SUAS ASSOCIAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes
Co-Orientador: Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto.

Barretos, SP
2016

Flavio Mavignier Cárcano

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES E GENÉTICAS NOS TUMORES DE CÉLULAS
GERMINATIVAS DO TESTÍCULO E SUAS ASSOCIAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes
Co-Orientador: Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto.

Barretos, SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

C265e Cárcano, Flávio Mavignier.

Estudo de alterações moleculares e genéticas nos tumores de células germinativas do testículo e suas associações clínico-patológicas / Flávio Mavignier Cárcano. - Barretos, SP 2016.

98 f. : il.

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes.

Co-orientador: Dr. Cristovam Scapulatempo Neto.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2016.

1. Instabilidade de Microssatélites. 2. Oncogenes. 3. Telomerase. 4. Mutação. 5. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 6. Proteínas ADAM. 7. Neoplasias Embrionárias de Células Germinativas. 8. Neoplasias testiculares. I. Autor. II. Lopes, Luiz Fernando. III. Scapulatempo Neto, Cristovam. IV. Título

CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávio Mavignier Cárcano

Estudo de alterações moleculares e genéticas nos tumores de células germinativas do testículo e suas associações clínico-patológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 06/05/2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emmanuel Dias Neto

Instituição: Centro de Pesquisas do Hospital AC Camargo – Fundação Antonio Prudente

Prof. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima

Instituição: Hospital do Câncer AC Camargo – Fundação Antonio Prudente

Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Orientador

Prof.^a Dra. Céline Marques Pinheiro

Presidente da Banca

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico este trabalho ao meu filho Lorenzo e à minha esposa Cristiane, pela oportunidade do amor partilhado em família, que me fortalece e me traz a certeza de estar caminhando na direção correta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes pela confiança depositada, pela orientação desta tese, pelos ensinamentos, por todo incentivo e pela parceria profissional que já nos rende bons frutos.

Ao Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto pela amizade, orientação, apoio e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Rui Manoel Vieira Reis pelo incansável apoio, incentivo e orientação, fomentando a todo momento o meu interesse pela pesquisa.

Ao Prof. Dr. Daniel Onofre Vidal pela amizade, pela constante troca de ideias, pelos ensinamentos e pelo altruísmo.

A todos os membros do grupo de estudos dos tumores de células germinativas do Hospital de Câncer de Barretos.

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos.

Aos colegas da equipe de Uro-oncologia clínica do Hospital de Câncer de Barretos, pela parceria e compreensão nos momentos de ausência, durante o desenvolvimento desta tese.

À minha família, em especial aos meus pais Carlos e Reingivânia, que jamais hesitaram em iluminar o meu caminho para que eu encontrasse a luz do conhecimento, que tanto sustenta a minha busca pelo significado da vida.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos epidemiológicos dos tumores de testículo.....	1
1.2	Etiopatogenia dos tumores de testículo.....	2
1.3	Aspectos clínico-patológicos e estratificação do risco dos TCGT.....	5
1.4	Aspectos terapêuticos dos TCGT	8
1.5	Biologia molecular dos TCGT	9
1.6	Instabilidade de microssatélites do DNA e mutações do <i>BRAF</i>	11
1.7	Mutações do gene da transcriptase reversa telomerase (<i>TERT</i>)	13
1.8	Metaloproteinase ADAMTS-1	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	Gerais.....	19
3.2	Específicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Delineamento e população estudada.....	21
4.2	Linhagens celulares dos TCGT.....	21
4.3	Isolamento do DNA dos tecidos FFPE	22
4.4	Análise da instabilidade de microssatélites de DNA	22
4.5	Análise da mutação do <i>BRAF</i>	23
4.6	Análise das mutações e do SNP do <i>TERT</i>	24
4.7	Análise imunohistoquímica.....	24
4.8	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	27

5.1	Análise da MSI e da mutação do <i>BRAF</i>	28
5.2	Análise da mutação do <i>TERT</i> e do SNP rs2853669	29
5.3	Análise da expressão da ADAMTS-1 e da MDV.....	33
6	DISCUSSÃO	38
6.1	MSI e mutação do <i>BRAF</i> nos TCGT.....	38
6.2	Mutação do <i>TERT</i> e presença do SNP rs2853669 nos TCGT	41
6.3	Expressão da ADAMTS-1 e microdensidade vascular nos TCGT	43
6.4	Limitações do estudo	45
7	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	59
	Anexo A – Estádio do tumor de testículo conforme o AJCC.	59
	Anexo B – Alterações genéticas e epigenéticas nos TCGT.	61
	Anexo C – Cartas do Comitê de Ética em Pesquisa de aprovação do estudo e da emenda	62
	Anexo D – Publicação referente ao estudo de mutação do <i>TERT</i>	70
	Anexo E – Artigo “em correção gráfica” referente ao estudo de MSI e da mutação do <i>BRAF</i>	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenvolvimento embrionário normal e a origem das linhagens de células germinativas.	03
Figura 2 -	Estrutura do gene <i>TERT</i> na sua forma selvagem e eletroferogramas com sequências representativas do DNA genômico da região promotora do <i>TERT</i> .	14
Figura 3 -	Diagrama esquemático da ADAMTS e seus efeitos anti-angiogênicos.	16
Figura 4 -	Expressão de ADAMTS-1 nos TCGT.	17
Figura 5 -	Sobrevida global dos casos de TCGT responsivos e refratários ao tratamento.	29
Figura 6 -	Sequenciamento e histologia em coloração em H&E, dos casos 3 (A e B) e 4 (C e D) mostrados na tabela 3.	30
Figura 7 -	Fotomicrografias com diferentes níveis de expressão da ADAMTS-1 (magnificação de 400x).	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Os três tipos de tumores de células germinativas do testículo e suas características de acordo com o sítio anatômico de origem.	04
Tabela 2 -	Características clínico-patológicas dos TCGT conforme objetivo de estudo.	27
Tabela 3 -	Características clínico-patológicas dos casos com mutação da região promotora do TERT.	30
Tabela 4 -	Mutação da região promotora do TERT de acordo com as variáveis estudadas nos TCGT.	31
Tabela 5 -	Polimorfismo do TERT e suas associações com as variáveis estudadas nos TCGT.	32
Tabela 6 -	Expressão da ADAMTS-1 e variáveis clinopatológicas dos TCGT.	34
Tabela 7 -	Sobrevida global e livre de eventos dos TCGT conforme as variáveis estudadas.	36
Tabela 8 -	Resumo dos estudos que avaliaram MSI em TCGT.	38
Tabela 9 -	Resumo dos estudos que avaliaram mutação do BRAF em TCGT.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMTS-1	Metaloproteinase ADAMTS-1
AFP	Alfa-fetoproteína
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATL	Alongamento alternativo dos telômeros
BEP	Bleomicina, Etoposide e Cisplatina
<i>BRAF</i>	Oncogene B-Raf
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EP	Etoposide e Cisplatina
FFPE	Tecidos fixados em parafina
GCNIS	Neoplasias de células germinativas <i>in situ</i>
GWAS	Estudo de associação em larga escala ao genoma
H&E	Hematoxilina & eosina
HCG	Gonadotrofina coriônica
HNPCC	Síndrome do câncer coloretal não-polipose hereditário
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i>
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDV	Microdensidade vascular
MEC	Matriz extracelular
MMR	<i>Mismatch repair</i> do DNA
MSI	Instabilidade de microssatélites
MSI-H	Alta Instabilidade de microssatélites
MSI-L	Baixa Instabilidade de microssatélites
MSS	Ausência de Instabilidade de microssatélites

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC	Células germinativas primordiais
QMVR	Alcance de variação quasi-monomórfica
RC	Resposta completa
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
STR	<i>Short tandem repeats</i>
TCG	Tumor de células germinativas
TCGT	Tumores de células germinativas do testículo
<i>TERT</i>	Gene da telomerase transcriptase reversa
TS	Trombospondina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
®	Marca registrada
°C	Graus celsius
'	Linha
>	Maior
<	Menor
=	Igual
+	Mais
-	Menos

RESUMO

Cárcano FM. Estudo de alterações moleculares e genéticas nos tumores de células germinativas do testículo e suas associações clínico-patológicas. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2016.

JUSTIFICATIVA: Os tumores de células germinativas do testículo (TCGT) são a neoplasia maligna mais comum no homem jovem. A deficiência do *Mismatch repair (MMR)* do DNA pode levar a instabilidade de microssatélites (MSI), um importante mecanismo de instabilidade genética. A mutação do gene *BRAF* tem sido implicada na patogênese de vários tumores sólidos e tem se tornado recentemente um importante alvo terapêutico. O papel da MSI e da mutação do gene *BRAF* nos TCGT, particularmente na doença refratária, é pobremente entendido e os achados relatados até então, são controversos. A ativação anormal da telomerase, codificada pelo gene da telomerase transcriptase reversa (*TERT*), está relacionada a um dos marcos fundamentais do câncer. Mutações somáticas *hotspots* na região promotora do *TERT*, especificamente a c.-124:C>T e a c.-146:C>T, foram recentemente identificadas em um grande espectro de cânceres humanos e tem sido associadas com um comportamento mais agressivo, mas não tem sido ainda avaliadas nos TCGT. Neo-angiogênese é um importante evento para a invasividade dos TCGT. *ADAMTS-1* é uma metaloproteinase complexa e possui propriedades anti-angiogênicas no microambiente tumoral. A sub-regulação da *ADAMTS-1* tem sido também associada com a agressividade em outros tipos tumorais, mas não tem sido avaliada em TCGT. **OBJETIVO:** Nesta tese, nós desejamos determinar a frequência e o impacto clínico do *status* da MSI e da mutação do *BRAF* nos TCGT e, pela primeira vez, avaliar a presença de mutações somáticas *hotspots* na região promotora do *TERT* nestes tumores. Nós desejamos também avaliar a expressão da *ADAMTS-1* e seu impacto clínico nos TCGT. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O DNA foi isolado de tecidos fixados em parafina de 150 casos de TCGT e de quatro linhagens celulares de tumores de células germinativas. O fenótipo da MSI foi avaliado usando PCR multiplex para cinco marcadores de repetições de mononucleotídeos quasi-monomórfico. O exon 15 do oncogene *BRAF (V600E)* e a região promotora do *TERT* foram analisadas por PCR, seguidas por sequenciamento direto. Além disso,

nós genotipamos o polimorfismo de nucleotídeo único rs2853669 (T>C), localizado na posição -245 da região promotora do TERT. Noventa e seis pacientes com TCGT tratados com quimioterapia foram avaliados para a expressão da ADAMTS-1 através de imunohistoquímica e a microdensidade vascular foi também avaliada. **RESULTADOS:** Dezesesseis por cento dos casos foram considerados como doença refratária no contexto da análise da MSI e mutação do BRAF. Em um pequeno subgrupo de casos (17 para MSI e 18 para *BRAF*), a quantidade e qualidade da recuperação do DNA foi pobre e dessa forma, não puderam ser analisados. Os 133 casos restantes de TCGT mostraram uma completa ausência da MSI. Dos 132 casos que tiveram êxito na avaliação para mutação do BRAF, todos eram *V600E* selvagem. Mutações na região promotora do TERT foram observadas em quatro pacientes, um exibiu a c.-124:C>T e três a c.-146:C>T. Nenhuma associação entre o *status* de mutação do TERT e as características clínico-patológicas puderam ser identificadas. A análise do rs2853669 mostrou que a variante C estava presente em 22,8 % dos casos. Nós observamos uma alta expressão da ADAMTS-1 em 63% dos casos de TCGT e uma forte associação foi vista entre a expressão da ADAMTS-1 no tumor e no estroma circunjacente ao tumor. **CONCLUSÃO:** Apesar de respostas distintas dos TCGT a terapia sistêmica, instabilidade de microsatélites e mutação do *BRAF V600E*, estão ausentes em todos os TCGT testados nesta tese. Aqui, nós mostramos pela primeira vez que mutações na região promotora do TERT ocorrem em um pequeno subgrupo (~3 %) de TCGT. Alinhado com os achados em outros tumores, o estroma testicular parece ter um papel na regulação do microambiente dos TCGT, mediado pela expressão da ADAMTS-1.

PALAVRAS-CHAVE: Instabilidade de Microsatélites; Oncogenes; Telomerase; Mutação; Polimorfismo de Nucleotídeo Único; Proteínas ADAM; Neoplasias Embrionárias de Células Germinativas; Neoplasias testiculares.

ABSTRACT

Cárcano FM. Study of clinicopathological associations with molecular and genetic alterations in testicular germ cell tumors. **Thesis (Doctorate's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2016.

BACKGROUND: Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most common malignant neoplasm in young men. DNA mismatch repair deficiency can lead to microsatellite instability (MSI), an important mechanism of genetic instability. A mutation of the *BRAF* gene has been implicated in the pathogenesis of several solid tumors and has recently become an important therapeutic target. The role of MSI and *BRAF* gene mutation in TGCT, particularly in refractory disease, is poorly understood and reported findings are controversial. The abnormal activation of telomerase, codified by the telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene, is related to one of cancer hallmarks. Hotspot somatic mutations in the promoter region of *TERT*, specifically the c.-124:C>T and c.-146:C>T, were recently identified in a range of human cancers and have been associated with a more aggressive behavior, but have not yet been evaluated in TGCT. Neo-angiogenesis is an important event for the invasiveness of TGCT. ADAMTS-1 is a complex metalloprotease and have anti-angiogenic properties in the tumor microenvironment. The downregulation of ADAMTS-1 has been associated with tumor aggressiveness in other types of tumor, but it has also not been evaluated in TGCT yet. **AIMS:** In this study, we aimed to determine the frequency and clinical impact of MSI *status* and *BRAF* mutations in TGCT and, for the first time, evaluating the presence of the hotspot telomerase reverse transcriptase gene promoter mutations in TGCT. We aimed also to assess the expression of ADAMTS-1 and its clinical impact in TGCT. **MATERIALS E METHODS:** DNA was isolated from formalin-fixed paraffin embedded tissue from 150 TGCT cases and from four germ cell tumor cell lines. The MSI phenotype was evaluated using multiplex PCR for five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers. Exon 15 of the *BRAF* oncogene (*V600E*) and the promoter region of *TERT* was analyzed by PCR, followed by direct sequencing. Additionally, we genotyped the telomerase reverse transcriptase gene

promoter single nucleotide polymorphism rs2853669 (T>C) located at -245 position. Ninety-six patients treated with chemotherapy were evaluated for ADAMTS-1 expression by immunohistochemistry and the vascular micro-density was assessed. **RESULTS:** Sixteen percent of cases were considered to have refractory disease on the MSI and *BRAF* mutation setting. In a small subset of cases (17 for MSI and 18 for *BRAF*), the quantity and quality of DNA recovery was poor and therefore, inadequate to be analyzed. The remaining 133 TGCT cases showed a complete absence of MSI. Of the 132 cases successfully evaluated for *BRAF* mutations, all were *V600E* wild-type. *TERT* promoter mutation was observed in four patients, one exhibited the c.-124:C>T and three the c.-146:C>T. No association between *TERT* mutation *status* and clinicopathological features could be identified. The analysis of the rs2853669 showed that variant C was present in 22.8 % of cases. We observed a high expression of ADAMTS-1 in 63% of cases of TGCT and a strong association with the expression of ADAMTS-1 in the stroma of tumor neighborhood was observed. **CONCLUSIONS:** despite a distinct response of testicular germ cell tumors to therapy, microsatellite instability, and the *BRAF V600E* mutation were absent in all testicular germ cell tumors tested in this study. Herein, we showed for the first time that *TERT* promoter mutations occur in a small subset (~3%) of testicular germ cell tumors. In line with other tumors, the stroma seems to be a player in the TGCT microenvironment regulation, mediated by ADAMTS-1 expression.

KEYWORDS: Microsatellite instability; Oncogenes; Telomerase; Mutation; Polymorphism, single nucleotide; ADAM protein; Neoplasms, germ cell and embryonal; testicular neoplasms.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos dos tumores de testículo

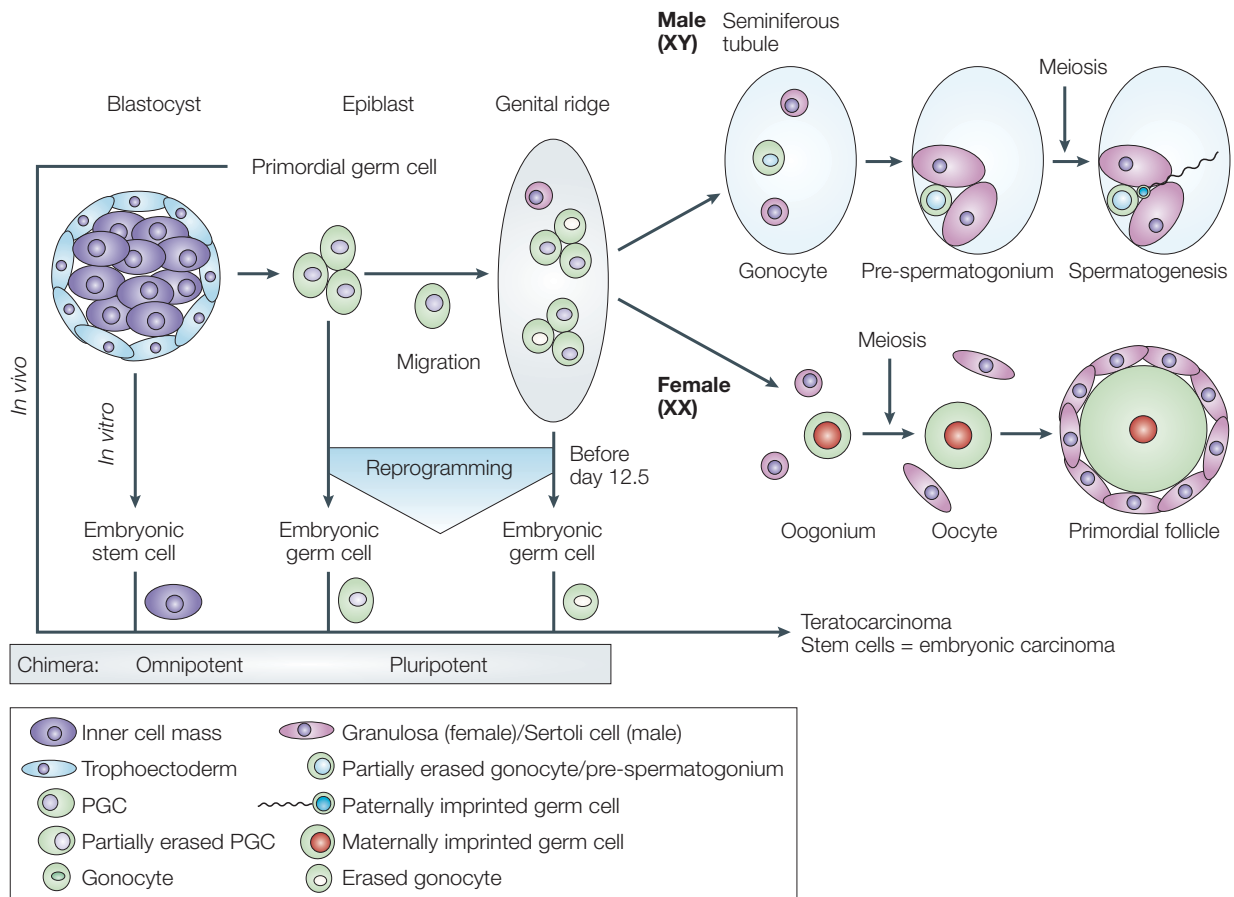
O câncer é a segunda causa de morte por doenças não comunicáveis em todo o mundo e estas são responsáveis por 68% de todas as mortes mundiais.¹ Os últimos dados divulgados pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*IARC*) apontam para mais de 32,5 milhões de pessoas vivendo com câncer em todo o mundo e, quase 60% dos novos casos e 65% das mortes por câncer, ocorreram em regiões menos desenvolvidas como o Brasil.² O câncer do testículo contribui com apenas 0,7% dos casos e representa mais de 55.200 casos novos deste tipo de câncer no mundo, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.² Os dados referentes ao Brasil sobre os tumores do testículo não foram divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer³, mas os dados do *IARC* evidenciam 0,8% de todos os casos novos de câncer naquele país, também excetuando-se o câncer de pele não-melanoma.² Há registros de aumento da incidência dos tumores de testículo nos último 30 anos⁴ e as maiores incidências são encontradas em países europeus como Eslovênia, Hungria, Dinamarca, Suíça e Noruega, onde estas são mais de seis vezes maiores que no Brasil. Entretanto, todos têm em comum, taxas de mortalidade menor que 1 por 100.000 habitantes anualmente.² Todavia, este é o tumor sólido mais comum em homens jovens entre 15 e 39 anos de idade^{2,5} e aquele com a maior perda de anos potenciais de vida e produtividade dentre os cânceres urogenitais.^{6,7}

O câncer do testículo tem sido uma doença muito importante dentro da oncologia, por servir de modelo de sucesso com o uso da quimioterapia. Havia uma condição *sine qua non* em oncologia que, para atingir todo o potencial de sobrevivência a longo prazo e curar, era preciso primeiro conseguir uma remissão completa da doença. Esse preceito foi quebrado através do manejo, então proposto para o câncer testicular, o qual poder-se-ia curar com remissão parcial pela quimioterapia, seguido da ressecção cirúrgica da doença residual persistente.^{8,9} Este tipo de tumor tem alcançado taxas de cura de 95% com o tratamento contemporâneo.¹⁰ O maior número de casos é composto por doença restrita ao testículo nos quais se observa uma sobrevida em cinco anos maior que 99%, mas para os casos avançados, esta diminui para em torno de 73%.^{5,10} Na doença avançada, quase a totalidade dos eventos clínicos ocorrem nos primeiros dois anos do

diagnóstico, já que aqueles que sobrevivem e estão livre de doença após este período, alcançam uma sobrevida global e livre de doença de 98% a longo prazo, a despeito do estrato de risco ao qual pertencem.¹¹ No Hospital de Câncer de Barretos, cenário deste estudo, a sobrevida global em cinco anos dos pacientes com tumores de testículo é estimada em 85%, segundo dados do registro hospitalar de câncer.

1.2 Etiopatogenia dos tumores de testículo

O câncer de testículo tem sido sinônimo de tumor de células germinativas (TCG), já que este compõe mais de 95% dos casos deste tipo de câncer.¹² Dessa forma, para efeito desta tese, câncer de testículo e TCG serão utilizados de forma intercambiável. Os TCG's se originam pela transformação maligna de uma célula germinativa primordial, que no seu desenvolvimento normal se diferenciaria em espermatogônia no epitélio seminífero testicular.¹³ Em acordo com a descrição de Boublikova et al.¹⁴, as células germinativas primordiais originam-se precocemente na embriogênese entre a quinta e sexta semana, provenientes do epiblasto, a camada externa do disco embrionário na blástula. Elas então recebem a sinalização via KIT e CXCL12-CXCR4 para migrar para a crista genital e ganham o *status* de gonócitos no então futuro testículo. Ao encontrar o microambiente das células de Sertoli, dirigidas pela expressão de SRY e SOX9 resultantes da constituição cromossômica XY, os gonócitos se diferenciam em pré-espermatogônia. Neste momento ocorre a parada mitótica e a perda dos antígenos embrionários. Após o nascimento do indivíduo, a pré-espermatogônia transforma-se em espermatogônia do tipo A. Já na puberdade do indivíduo, o processo regular da espermatogênese inicia-se e a espermatogônia sofre maturação e entra em meiose para produzir o espermatozoa. A Figura 1 abaixo representa o processo descrito acima.



Fonte: Adaptado de Oosterhuis & Looijenga.¹⁵

Figura 1 – Desenvolvimento embrionário normal e a origem das linhagens de células germinativas; PGC: *primordial germ cell*.

Considerando os diversos sítios de surgimento dos TCG's e suas características epidemiológicas, clínicas e patológicas, é possível identificar três de cinco entidades de TCG's que acometem o testículo, reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e resumidas na Tabela 1 abaixo.¹⁶ Os TCG's tipo II são aqueles mais extensivamente estudados e serão o foco desta tese. Este tipo de TCG tem a sua origem nas neoplasias de células germinativas *in situ* (GCNIS) aninhadas entre as espermatogônias, que se encontram na membrana basal dos túbulos seminíferos do testículo do adulto e sob a vigilância das células de Sertoli, conhecidas como as "cuidadoras" da espermatogênese.¹⁵ Dados indicam que as GCNIS são a contraparte neoplásica das PGC¹⁷, e estas compartilham o mesmo padrão de *imprinting* genômico, atividade de

telomerase e expressão gênica.¹⁵ Postula-se que haja interrupção da diferenciação das células germinativas fetais no estágio de gonócito, ainda na vida intrauterina, quando este tem o *imprinting* genômico completamente apagado o que o torna mais susceptível a mutações, levando em última análise às GCNIS.¹⁸ Durante a puberdade as GCNIS progridem para o câncer invasivo e dão origem a todos os subtipos histológicos de TCGT¹⁴, que comumente são subdivididos em dois grandes grupos, os seminomas e os não-seminomas. Os primeiros são muito parecidos com os GCNIS e os não-seminomas podem dar origem a diferentes elementos histológicos. Supõem-se que ambos necessitem do fenômeno de reprogramação para a aquisição de pluripotência, que pode ser alcançada a partir de GCNIS ou do seminoma.^{14, 15} Antes de se tornar uma neoplasia invasiva, ambos os grupos histológicos passam por uma proliferação no lúmen dos túbulos seminíferos, quando gradualmente vão se tornando independentes do microambiente antes de invadirem a membrana tubular e se disseminarem.^{19, 20}

Tabela 1 - Os três tipos de tumores de células germinativas e suas características de acordo com o sítio anatômico de origem

Tipo	Relacionado a GCNIS?	Idade do paciente	Outros sítios anatômicos	Fenótipo	Célula de origem (<i>imprinting</i> genômico)	Genótipo	Modelo animal
I	Não Nenhum precursor identificado	Normalmente < 6 anos Raro no testículo pós-puberal	Ovário, região sacral, retroperitônio, mediastino, pescoço, cérebro médio e outros sítios raros	(Imaturo) teratoma e/ou tumor do seio endodérmico	Células tronco embrionária / célula germinativa primordial / gonócito (pré- / parcialmente apagado)	Diploide (teratoma); aneuploide (tumor do seio endodérmico); Ganho de 1q, 12(p13) e 20q Perda de 1p, 4 e 6q	Teratoma / tumor do seio endodérmico do camundongo
II	Sim	Pós-puberal Idade mediana para o seminoma: 35 anos; e para o não-seminoma: 25 anos	Ovário, gônada disgenética, mediastino anterior (timo) e cérebro médio (pineal e hipotálamo)	GCNIS / não-seminoma	Célula germinativa primordial / gonócito ([parcialmente] apagado)	Aneuploide (± triploide): Ganho de X, 7, 8, 12p e 21 Perda de Y, 1p, 11, 13 e 18 Mutações infrequentes que podem afetar <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> e <i>TP53</i>	Indisponível
III	Não Tumor espermatocítico intratubular é provavelmente o precursor	Normalmente > 50 anos	Nenhum	Tumor espermatocítico	Espermatogônia / espermatócito (apagado, parcialmente paternal)	Aneuploide: Ganho do 9 Mutações infrequentes no <i>HRAS</i> e <i>FGFR3</i>	Conhecido como seminoma de cachorro outros animais

Fonte: Adaptado de *World Health Organization*.¹⁶

GCNIS: germ cell neoplasia in situ.

1.3 Aspectos clínico-patológicos e estratificação do risco dos TCGT

Os TCGT se apresentam comumente como nódulos testiculares indolores, percebidos muitas vezes à manipulação ocasional do escroto, mas podem gerar edema testicular, sensação de peso e desconforto na gônada afetada e, na doença metastática, a dor dorsal é a queixa mais frequente, principalmente devido a metástases no retroperitoneo.²¹ Ginecomastia pode ocorrer em 5% dos casos, principalmente associado a altos níveis de gonadotrofina coriônica (HCG), e a perda ponderal é incomum, mas quando ocorre comumente é decorrente de um não-seminoma.²² Embora menos frequente, pacientes com coriocarcinoma e níveis elevados de HCG podem desenvolver uma síndrome caracterizada por rápida disseminação da doença e alto volume de doença com consequente dispneia, hemoptise, ginecomastia, cefaleia e metástase pulmonar, hepática e cerebral.²³

O TCGT se dissemina por via linfática e hematológica e segue um padrão bem definido, comprometendo estruturas da linha média de uma forma ascendente e sequencial e, dificilmente, observa-se comprometimento supradiafragmático sem que haja comprometimento retroperitoneal estabelecido. O sistema mais utilizado para estadiamento é o TNM segundo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.²⁴ Além dos classicamente avaliados “T” (avalia o tumor primário), “N” (avalia os linfonodos regionais) e “M” (avalia a presença de metástase), para os TCGT também há a avaliação do componente “S”, que corresponde aos níveis séricos de HCG, alfa-fetoproteína (AFP) e da Lactato Desidrogenase (LDH). Diferente dos outros tumores classificados pelo sistema TNM, o TCGT não apresenta o estágio IV e caracteristicamente possui o estágio IS, onde os tumores macroscopicamente restritos ao testículo falham em normalizar os marcadores séricos após a orquiectomia (Anexo A). Conforme dados do *National Cancer Institute* norte-americano, 68% dos casos se apresentam em estágio I, 18% em estágio II e 12% em estágio III e, as sobrevidas relativas em 5 anos, caem de acordo com a extensão da doença, observando para os estádios I, II e III, respectivamente, 99,2%, 96,3% e 73,8% de sobrevida.²⁵

Os TCGT invasivos podem ser reconhecidos na sua forma pura ou combinados em mais de um tipo histológico, conhecidos como tumores de células germinativas misto.¹⁶ Seminomas e não-seminomas contam, cada um, com metade de todos os casos.²⁶ O seminoma acomete pacientes na quarta década de vida, não ocorre na criança pré-puberal com desenvolvimento

sexual normal e é raro em homens acima dos 70 anos. O tecido neoplásico do seminoma é composto por um arranjo difuso de células pálidas com abundante citoplasma, que é interrompido por septos fibrovasculares contendo linfócitos e um ou mais nucléolos grandes localizados no centro e, macroscopicamente, são nódulos sólidos homogêneos com textura frouxa.¹⁶ É muito frequente o encontro de GCNIS nos túbulos seminíferos residuais de onde surge o seminoma, o que corrobora a sua etiopatogenia.¹⁹ Os seminomas podem ser encontrados misturados a outras histologias (tumor misto) e neste caso, eles devem ser classificados e conduzidos clinicamente como um não-seminoma. Os TCGT possuem marcadores séricos típicos como a AFP e a HCG que auxiliam no prognóstico e manejo clínico. Os seminomas tipicamente não produzem AFP e sempre que um paciente se apresenta com elevações deste marcador ele deve ser manejado como um não-seminoma.¹² De forma geral, os não-seminomas ocorrem mais cedo que os seminomas, acometendo adultos jovens na terceira década de vida.²⁷ Este grupo é composto por diversas histologias, que em ordem decrescente de frequência dentre os TCGT, são representados pelo tumor misto (69% dos casos), carcinoma embrionário (40% dos casos puros e mistos de TCGT e, 87% de todos os não-seminomas), tumor do seio endodérmico (ou do saco vitelínico; raramente puro), coriocarcinoma (raramente puro) e teratomas (7% dos casos de TCGT; maduros, imaturos ou com malignidade do tipo somática).¹⁶ A proporção de pacientes em estágio I entre os não-seminomas é maior quando um dos componentes é um tumor do seio endodérmico²⁸ e, caracteristicamente, esta histologia produz níveis elevados de AFP em quase todos os casos.²⁹ Em contrapartida, o coriocarcinoma do testículo representa a variante mais agressiva dos TCGT, caracteristicamente com disseminação hematológica precoce e grande volume de metástases viscerais, que podem ser observadas na apresentação com uma lesão primária oculta.²¹ Além disso, esta é a histologia com os maiores níveis de HCG à apresentação.³⁰ Macroscopicamente, os não-seminomas são diversos, mas é característico encontrar o aumento do volume testicular com o carcinoma embrionário, hemorragia tumoral com o coriocarcinoma e áreas nodulares e firmes com diversos tecidos diferenciados nos teratomas. A caracterização histopatológica dos diversos tipos de não-seminoma foge ao escopo desta tese, mas algumas características típicas de cada histologia, auxiliam na sua discriminação como o pleomorfismo dos carcinomas embrionários, a presença de glóbulos hialinos eosinofílicos dos tumores de seio

endodérmico e trofoblastos mononucleados com sinciciotrofoblastos multinucleados dos coriocarcinomas.¹⁶

Conforme visto anteriormente, a doença loco-regional tem excelente prognóstico, mas na doença avançada, a caracterização do risco faz-se necessária, já que uma proporção de pacientes pode não alcançar a cura com o tratamento convencional. O *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (IGCCCG)³¹ avaliou mais de 5000 pacientes com TCGT não-seminoma e 660 pacientes com seminoma com tempo de seguimento mediano de cinco anos. Para os TCGT não-seminoma os seguintes fatores adversos independentes foram identificados: sítio primário no mediastino e presença de metástases viscerais não pulmonar, além do grau de elevação de AFP, HCG e LDH. Para os seminomas, a característica adversa predominante foi a presença de metástases viscerais não pulmonar. A integração destes fatores produziu os seguintes agrupamentos: bom prognóstico, compreendendo 60% dos TCG com 91% de taxa de sobrevida em cinco anos; prognóstico intermediário, compreendendo 26% dos TCG com 79% de taxa de sobrevida em cinco anos, e o mau prognóstico, representando 14% dos TCG (todos com TCGT não-seminoma) com 48% de taxa de sobrevida em cinco anos. Estes estratos de risco fazem parte atualmente da tomada de decisão no tratamento de todos os TCG do testículo e são imprescindíveis no adequado manejo desta doença. Dentre os pacientes com mau prognóstico é ainda possível estabelecer um outro estrato de risco descrito por Fizazi et al.³² Estes autores estabeleceram um cálculo logarítmico que teoricamente prediz o tempo necessário para a normalização dos marcadores séricos após início do tratamento sistêmico. Espera-se que após dois e três ciclos de tratamento sistêmico convencional, respectivamente haja normalização do HCG e da AFP. Assim foi possível separar os não-seminomas de alto risco segundo IGCCCG em grupos favorável e desfavorável. Os favoráveis alcançam sobrevida de 83% em cinco anos versus 58% para os desfavoráveis e, estes estratos de risco, podem ser separados através dos valores dos marcadores séricos logo após três semanas do primeiro ciclo de tratamento sistêmico.

Vinte a 30% dos pacientes com TCG avançado sofrem recidiva ou falham em alcançar uma resposta completa (RC) após a quimioterapia primária e compreendem um grupo heterogêneo com taxas de cura alcançando de 0% a 70%.²⁷ Nessa população heterogênea, é possível ainda observar outros estratos de risco que podem auxiliar no manejo clínico. Um estudo realizado por

*Lorch et al.*³³ analisou 1984 pacientes que foram submetidos a quimioterapia convencional ou em altas doses e falharam ao tratamento primário. Assim, foi possível estabelecer fatores prognósticos para esta população. Os níveis dos marcadores biológicos conhecidos, a histologia, localização primária do tumor, resposta ao tratamento inicial, presença de metástases cerebral, hepática ou óssea e o intervalo livre de progressão da doença após tratamento primário foram identificadas como variáveis prognósticas independentes. Ainda que um grupo de “muito baixo risco” e “baixo risco” tenham sido identificados, 25% e 49%, respectivamente, naqueles grupos, apresentaram progressão da doença dentro de dois anos. Em contrapartida, nos grupos de “alto risco” e “muito alto risco”, 26% e 6%, respectivamente, apresentavam-se livres de progressão da doença em dois anos.

1.4 Aspectos terapêuticos dos TCGT

Os pacientes com suspeita clínica ao exame físico, marcadores típicos elevados e exame ultrassonográfico sugestivo, têm como tratamento primário do tumor de testículo a orquiectomia inguinal radical unilateral, com ligadura alta do cordão espermático. Alguns pacientes com não-seminoma avançado e muito sintomáticos, podem necessitar do início precoce de tratamento sistêmico e a orquiectomia feita ao término deste tratamento, não compromete os resultados clínicos.³⁴

Na década de 60 e na primeira metade da década de 70, a quimioterapia padrão resultava numa taxa de resposta objetiva de 50% e RC de 10% a 20% no tratamento dos TCGT. Além disso, a taxa de cura era de apenas 5 a 10%.⁸ A revolução veio com o estudo de *Higby et al.*³⁵ que utilizaram um composto de platina para tratar pacientes com TCGT refratários e alcançou três RC e três remissões parciais em onze pacientes estudados. Apesar de muitas combinações de poliquimioterapia terem sido estudadas a partir da segunda metade da década de 70, ficou cada vez mais clara a percepção de que a base destas combinações deveria ser a platina. A busca pela efetividade do tratamento levou ao desenvolvimento da combinação “BEP” (Bleomicina, Etoposide e Cisplatina), que quando comparado à uma combinação parecida que substitui o Etoposide pela Vinblastina, mostrou menores parafefeitos e superioridade em sobrevida.³⁶ BEP tem sido então a combinação padrão para o tratamento dos TCGT desde 1984.

Pacientes com estágio I e seminomas, possuem como opção terapêutica o seguimento, a radioterapia ou a quimioterapia com a Carboplatina, a depender do risco de recidiva e da decisão compartilhada com o paciente.²⁶ Este risco é determinado pelo tamanho da lesão primária e a invasão da *rete testis*.³⁷ Nos pacientes com não-seminomas estágio I, o seguimento clínico ou a quimioterapia adjuvante com PEB pode ser indicada²⁶, a depender do risco de recidiva determinado pela invasão vascular ou pelo predomínio de carcinoma embrionário no tumor.³⁸ Independente do plano terapêutico utilizado, a sobrevida do estágio I está próxima de 100%.

Pacientes com doença metastática regional ou à distância (estádios II e III), receberão quimioterapia sistêmica com BEP ou EP (BEP sem o uso da Bleomicina) e, a escolha entre as duas e o número de ciclos, dependerão do risco IGCCCG e do grupo histológico tratado.³⁹ Ainda que haja doença residual após o tratamento com quimioterapia, a intervenção cirúrgica destas lesões, quando indicada, deve fazer parte do manejo dos TCGT, já que a presença de células viáveis de TCGT não-seminoma nestes espécimes traz um alto risco de recaída e diminuição da sobrevida livre de doença.⁴⁰ Entretanto, até 25% dos casos são refratários ao tratamento⁴¹ e novas estratégias têm sido propostas para tentar curar estes casos. Estas vão desde novas combinações de drogas com base em Platinas até a utilização de poliquimioterapia em altas doses seguida de transplante autólogo de células-tronco.⁴² Contudo, a superioridade de uma estratégia sobre a outra não tem sido demonstrada.⁴³ Além disso, a poliquimioterapia em altas doses tem um perfil de toxicidade maior e necessita de um manejo mais especializado, fator que oferece limitações de acesso entre os diversos centros de tratamento.

1.5 Biologia molecular dos TCGT

A constituição genética dos TCGT reflete a característica embrionária das células deste tipo de tumor, onde geralmente podemos observar uma baixa incidência de mutações, frequentes dissomias uniparentais, perda do padrão parental do *imprinting* genômico (comumente apagado) e distintos perfis de metilação do DNA, motivo pelo qual eles diferem de outros tumores derivados de tecidos somáticos.¹⁴ Os TCGT possuem algum grau de instabilidade genômica, onde observamos comumente os não-seminomas hipotriploides e os seminomas hipertriploides.⁴⁴ Uma alteração cromossômica típica nos TCGT é o ganho do braço curto do cromossomo 12, que

está presente em todos os TCGT e em cerca de 80% dos casos se apresenta na forma de um isocromossomo i(12p).⁴⁵ Tem-se sugerido que o ganho do 12p é uma mudança funcional relevante que leva a ativação da proliferação e ao reestabelecimento ou manutenção da função de células-tronco, através da ativação de genes chaves típicos das células-tronco (*POU5F1/OCT3/4*, *SOX2* e *NANOG*) e, uma região de 200 Kb no *locus* 12p 13.31, parece estar implicada neste processo.⁴⁶ Níveis aumentados de *NANOG* são suficientes para sobre-regular *POU5F1* e *SOX2* e, alterar o delicado balanço entre pluripotência e malignidade.¹⁴ Embora o momento em que ocorre o ganho do 12p nos TCGT não esteja completamente estabelecido, há evidências que células do tipo carcinoma embrionário não surgem antes de se tornarem invasivas, então argumenta-se que o surgimento do 12p ocorra nesta fase, trazendo consigo a manutenção da pluripotência.⁴⁷ Um grande número de genes tem sido mapeado no 12p e alguns tem se mostrado com expressão aumentada nos TCGT, levantando a importância deles na sua gênese.^{44, 47, 48} Estes genes estão associados a: células tronco (*STELLAR*, *NANOG*, *GDF3*, *EDR1*), e a expressão destes pode levar ou manter a célula com um fenótipo pluripotente, capaz de se auto renovar; regulação do ciclo celular (*CCND2*), que pode levar a uma vantagem proliferativa para as células recém transformadas; oncogenes (*KRAS*) que podem levar a transformação maligna; receptor de fator de crescimento (*TNFRSF1A*); metabolismo glicolítico (*GLUT3*, *GAPDH*, *TPI1*) assegurando o aumento do metabolismo energético necessário para um tumor que prolifera em altas taxas; fatores transcricionais e outros reguladores (*SOX5*, *ETV6/TEL*, *DDX11*); genes envolvidos na proteção celular contra danos oxidativos e reparo do DNA (*MGST1*, *RAD52*); e moléculas associadas ao sistema imune como o CD4.¹⁴ Outras alterações genóticas descritas podem ser observadas na Tabela 1.

Uma das primeiras alterações moleculares a ocorrer na transformação maligna dos TCGT é dependente do sistema KIT/SCF; uma potente via pró-sobrevivência; e o receptor KIT sobre-expresso poderia levar as células indiferenciadas a um retardo na sua diferenciação, o que proporcionaria uma oportunidade para novos eventos oncogênicos.¹⁷ Sugere-se que a alta expressão de genes de células tronco possa dirigir a reprogramação das GCNIS em células de carcinoma embrionário pluripotente e, juntamente com a sinalização via KIT, prevenir sua nova diferenciação.¹⁴ A análise de sequência em larga escala de 518 proteínas-quinases nos TCGT

mostraram uma frequência de mutação muito baixa no geral, com exceção de KIT.⁴⁹ Mutações ativadoras de KIT tem sido relatadas em uma frequência de 13 a 30% dos seminomas.⁵⁰ Alterações cromossômicas como o 12p e outras, estão direta ou indiretamente associadas com a via de sinalização KIT/SCF.¹⁸

Enquanto aberrações cromossômicas e alterações do número de cópias de genes são críticas para a iniciação e o desenvolvimento dos TCGT, as diferenças entre os subtipos histológicos, são provavelmente determinadas pela expressão genética diferencial resultante de reprogramação epigenética, em particular a ocorrência de metilação do DNA de regiões promotoras dos genes.¹⁴ De forma geral, os seminomas e as GCNIS são hipometilados em genes relacionados ao câncer e os não-seminomas são hipermetilados nestes mesmos genes e, isso suporta o modelo em que GCNIS se desenvolve em seminoma e carcinoma embrionário, para mais tarde subsequentemente se diferenciar nos não-seminomas.¹⁸ Além de outros mecanismos, a metilação de genes supressores tumorais está envolvida neste processo e, recentemente, nosso grupo tem demonstrado que a metilação dos genes MGMT e CALCA pode ser um importante atore neste processo (Martinelli et al. 2016; manuscrito submetido). Adicionalmente, a regulação epigenética negativa do gene supressor tumoral *TP53* exercida por microRNAs (miR-372 e miR373) tem sido descrita e, apesar do gene estar presente na forma selvagem, ele está funcionalmente suprimido.⁵¹ O quadro do Anexo B traz um resumo das alterações genéticas e epigenéticas mais comuns descritas em TCGT.

1.6 Instabilidade de microssatélites do DNA e mutações do *BRAF*

A integridade do genoma depende da ação coordenada de genes do reparo do DNA, também conhecidos como *caretakers*.⁵² A falha de um dos tipos destes “guardiões” do genoma, os genes do MMR do DNA, contribui para a instabilidade genômica e leva ao que chamamos de instabilidade de microssatélites de DNA ou MSI.^{53, 54} O sistema de MMR corrige a substituição de bases incompatíveis e pequenas deleções ou inserções incompatíveis que são geradas por erros no pareamento de bases, durante a duplicação do DNA ou por danos químicos ao DNA.⁵⁵ É possível identificar no genoma de eucariotos uma grande quantidade de sequências repetidas que podem ser dispersas ou em “tandem” e podem compor até 50% do genoma humano. As

regiões microssatélites são unidades de repetições curtas de DNA em “tandem” e estima-se 253.000 microssatélites no genoma humano com repetições de di-, tri- e tetranucleotídeos.⁵⁶ A inativação do sistema de MMR pode levar à ocorrência de deleções não pareadas nas regiões de microssatélites de DNA, resultando em comprimentos variáveis dessas regiões durante a replicação do DNA. Dessa forma, a identificação de comprimentos diferentes dos conhecidos nestas regiões de microssatélites é usada como um marcador para a deficiência do sistema do MMR. Esta inativação do sistema de MMR pode ser causada tanto por alterações genéticas ou epigenéticas de um ou vários genes envolvidos no MMR.⁵⁷

O fenótipo de MSI é um marco fundamental da síndrome dos cânceres coloretais não-polipose hereditário (HNPCC), mas também está presente em 10 a 15% dos cânceres coloretais esporádicos.⁵⁸⁻⁶⁰ Ele também tem sido descrito em outros tipos de câncer, como o câncer endometrial e gástrico.⁵⁹ Pacientes portadores de HNPCC tem um risco durante a vida de 60% a 80% de desenvolver câncer colorretal e, além disso, eles também estão em risco aumentado de desenvolverem cânceres extra-colônicos como o de endométrio, estômago, do trato hepatobiliar, ovário, intestino delgado, do trato urinário superior, sistema nervoso central (SNC) e pele.⁶¹ Recentemente, tumores coloretais e não coloretais com defeitos de MMR identificados, tem sido identificados como mais responsivos a uma nova droga inibidora do ponto de checagem imunológico *programmed death 1* (PD-1), o que ressalta um possível papel preditor da imunoterapia para o fenótipo de MSI.⁶² Presume-se que tumores com maior antigenicidade são os melhores alvos para a imunoterapia e aqueles que tenham uma maior carga mutacional estão entre os que merecem melhor avaliação neste cenário.⁶³ Sabe-se que a presença do fenótipo de MSI aumenta a taxa de mutação de nucleotídeos, estimado em 2 a 3 ordens maior do que em células normais.²⁷ Mutações em regiões codificadoras microssatélites estão associadas a carcinogênese.⁶⁴

O oncogene *BRAF* é uma parte importante da via de sinalização celular conhecida como *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) e está relacionada à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular.⁶⁵ *BRAF* é ativado por mutações *hotspot*, principalmente *V600E*, a qual tem sido encontrada em melanomas e outros tipos de câncer.^{66, 67} Recentemente, mutações *BRAF*

V600E tem surgido como importante alvo terapêutico em melanomas e levado a uma mudança na história natural desta doença sem precedentes.⁶⁸

Honecker et al.⁶⁹ têm sugerido uma associação da MSI e da mutação do *BRAF* com TCGT refratário ao tratamento. Entretanto, o papel da MSI e da mutação do *BRAF* nos TCGT é pouco caracterizado e os resultados permanecem controversos.⁶⁹⁻⁷⁵

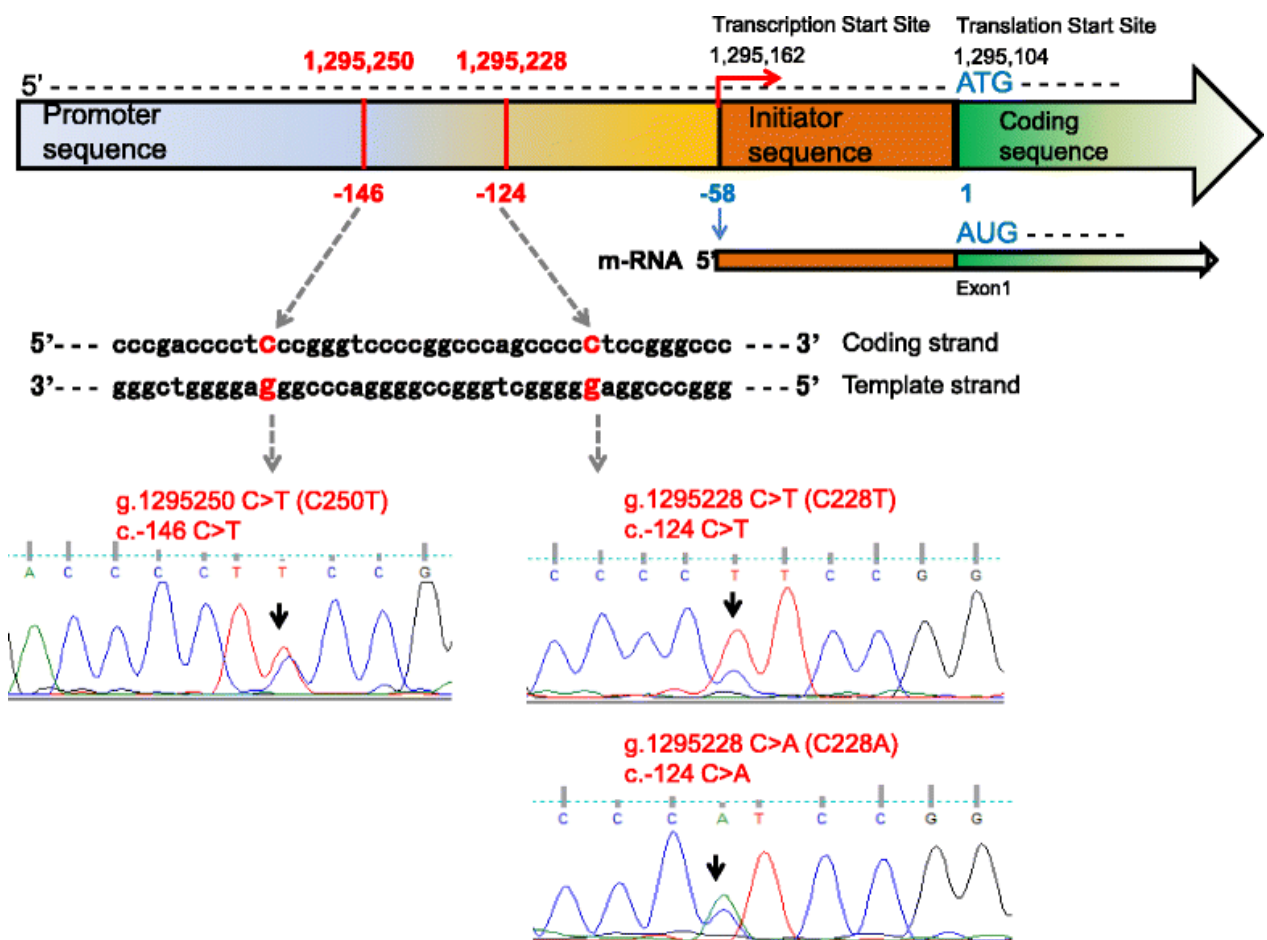
1.7 Mutações do gene da transcriptase reversa telomerase (*TERT*)

A manutenção e a regulação do telômero são fundamentais para a homeostasia celular e a atividade da telomerase é central neste processo.⁷⁶ Os telômeros são estruturas de proteína e DNA encontrados em ambas porções terminais de cada cromossomo e são responsáveis por proteger o genoma da degradação nucleolítica, recombinação desnecessária, reparo e fusão intercromossomial.⁷⁷ Um dos processos fundamentais da tumorigênese em humanos é o aumento de expressão dos níveis da telomerase, a qual é codificada pelo gene da transcriptase reversa telomerase ou simplesmente *TERT*.⁷⁶ Recentes estudos identificaram a presença de mutações somáticas *hotspot* na região promotora do *TERT*; especificamente as mutações -124:C>T e -146:C>T; em um grande número de cânceres humanos como de bexiga, gliomas, de tireóide e melanoma.⁷⁸⁻⁸¹ Tem sido demonstrado que estas mutações são responsáveis pela criação de um novo sítio motivo de ligação para o fator de transcrição ETS, o qual induz um aumento na expressão dos níveis do *TERT*.^{78, 81, 82} A Figura 2 abaixo ilustra o gene *TERT*, assim como as mutações descritas acima.

Recentemente, um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), localizado na região -245pb a montante do sítio de iniciação ATG da região promotora do *TERT* (rs2853669), tem sido estudado.⁸⁴ A variante C, menos frequente, tem sido implicada na redução da expressão do *TERT* em ambos os casos mutantes -124:C>T e -146:C>T e isso, aparentemente, está associado a um efeito protetor deste polimorfismo.⁸⁴ Em acordo com isso, tem-se demonstrado que o SNP rs2853669 está associado a mudanças nos desfechos clínicos no câncer de bexiga e no carcinoma de células renais.^{85, 86}

É bem conhecido que a atividade da telomerase está presente no tecido testicular normal e em TCGT e, o nível desta atividade, está inversamente relacionada ao estado de diferenciação

destes tumores.⁸⁷ Embora, os tumores de células germinativas não seminomatosos revelem-se com maiores fragmentos de restrição teloméricos do que o seminoma, a atividade da telomerase parece ser a mesma em ambos os grupos e outros fatores desconhecidos podem desempenhar um papel nisso.⁸⁸ Recentemente, um *genome wide association study* (GWAS) reportou uma associação do TCGT com variantes genéticas no locus do *TERT* no cromossomo 5, o que sugere o papel do gene *TERT* na tumorigênese do TCGT.⁸⁹



Fonte: Bae et al.⁸³

Figura 2 – Estrutura do gene *TERT* na sua forma selvagem e eletroferogramas com sequências representativas do DNA genômico da região promotora do *TERT*.

Adicionalmente, o perfil de mutação do *TERT* também tem sido associado com outras características moleculares em vários tipos de tumores. Em particular, foi observado uma associação entre mutação do *BRAF V600E* e mutação do *TERT* em melanoma cutâneo e câncer de tireoide.⁷⁹ Liu et al.⁹⁰ demonstraram que a coexistência da mutação do *TERT* com mutações *BRAF* em câncer de tireoide foi associado significativamente com a maior agressividade clínico-patológica nestes tumores. Entretanto, os mecanismos moleculares associados à ativação da telomerase nos diferentes tipos de TCGT são complexos e permanecem pouco explorados.

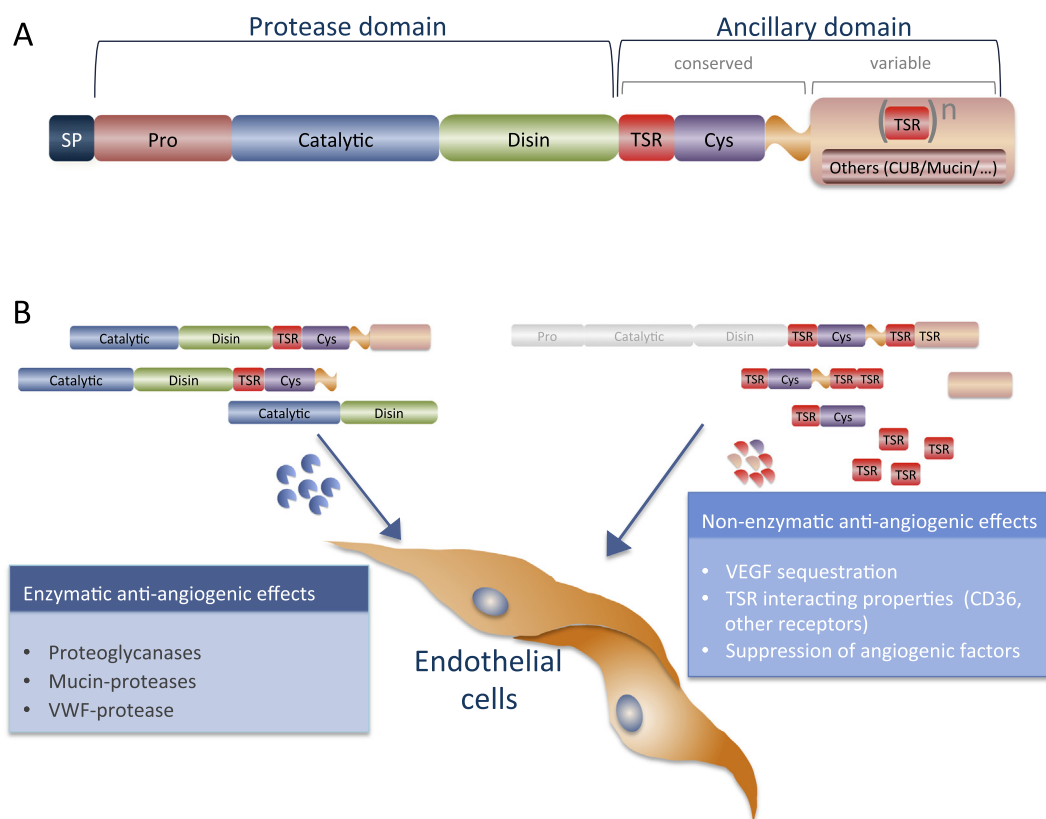
1.8 Metaloproteinase ADAMTS-1

ADAM trata-se de um acrônimo de "A Disintegrin And Metalloprotease". É uma glicoproteína com função de metaloproteinase dependente de Zinco, que desempenha papel na sinalização celular, fusão celular e interação célula-célula. A particular subfamília ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs), apresentam domínios, que combinam uma metaloproteinase tipo-ADAM com repetições trombospondina tipo-1.⁹¹ Membros Individuais desta família diferem no número de motivos trombospondina (TS) C-terminal e ADAMTS-1 contém duas alças desintegrinas e três motivos TS C-terminais.⁹² Desintegrinas são peptídeos anticoagulantes encontrados em venenos de cobras, as quais são caracterizadas por um alto teor de cisteína e funcionam como ligante de integrina, com capacidade de romper a interação célula-matriz.⁹³

ADAMTS-1 foi descrita pela primeira vez por Kuno et al.⁹³ como uma proteína rica em cisteína e que, diferentemente de outras ADAMs, não possuía um domínio transmembrana, sendo supostamente uma proteína secretada. Além disso os autores sugeriram que ADAMTS-1 não fosse constitutivamente expressa mas sim, um gene indutivo. ADAMTS-1 está associada fisicamente à matriz extra-celular (MEC) através de múltiplos locais de fixação independentes em sua região carboxi-terminal, enquanto que o domínio metaloproteinase, na região amino-terminal, é livre e esta característica é única dentro da família de ADAM.⁹⁴

A angiogênese é um evento muito importante em diversos processos patológicos e uma importante relação de ADAMTS-1 e angiogênese tem sido descrita na última década.⁹⁵ ADAMTS-1 parece exercer uma atividade anti-angiogênica no microambiente tumoral, muito devido aos

domínios trombospondina presentes na molécula, que por si só justificariam este efeito.⁹⁶ Entretanto, muitos outros mecanismos enzimáticos e não enzimáticos têm sido descritos conforme visto na Figura 3.

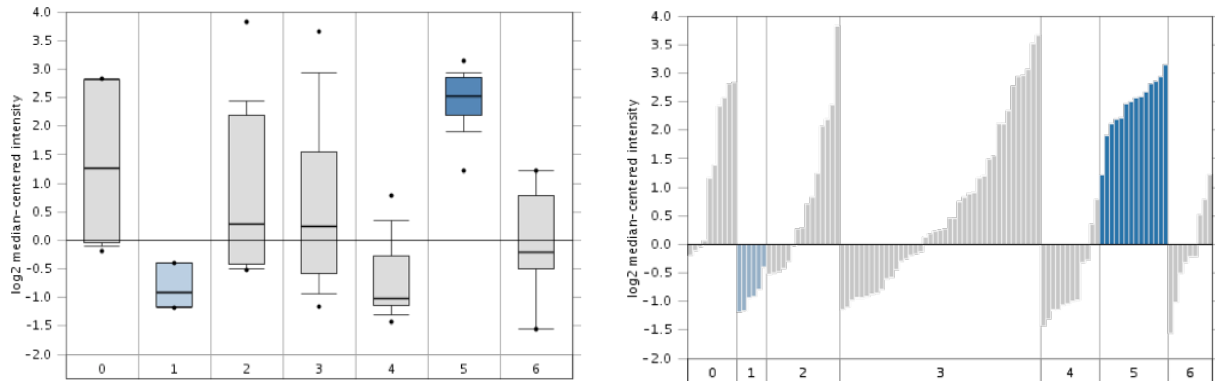


Fonte: Rodríguez-Manzanares et al.⁹⁵

Figura 3 – Diagrama esquemático da ADAMTS e seus efeitos anti-angiogênicos. Cys: domínio rico em cisteína; Disin: módulo tipo desintegrina; TSR: repetições trombospondina tipo 1.

Outras isoformas de ADAMTS têm sido associadas com sobrevida em pacientes com câncer de mama⁹⁷ e, recentemente, mutações no gene de ADAMTS foram associados a melhor sobrevida em pacientes com câncer de ovário.⁹⁸ ADAMTS-1 não tem sido avaliada em pacientes com TCG como e conforme dados extraídos do estudo de Korkola et al.⁴⁶, é possível observar uma expressão diferencial de ADAMTS-1 entre os diversos tipos histológicos em comparação com o testículo normal. Além disso, observa-se uma heterogeneidade da expressão para cada tipo

histológico, com exceção dos Teratomas, que demonstraram uma expressão aumentada e homogênea (Figura 4).



Fonte: www.oncomine.org. Dados originados do estudo de Korkola et al.⁴⁶

Figura 4 - Expressão de ADAMTS-1 nos TCGT. O *box plot* à esquerda representa a tendência e a dispersão da expressão em todos os casos de acordo com a histologia de TCG e testículo normal. O gráfico de barras à direita, representa o nível de expressão em cada caso para cada histologia e testículo normal. 0 - Sem especificações; 1 - Testículo Normal; 2 - Carcinoma Embrionário, SOE; 3 - TCG Misto, SOE; 4 - Seminoma, SOE ; 5 - Teratoma, SOE; 6 - Tumor do Seio Endodérmico, SOE.

Os TCGT são capazes de invadir e produzir metástase e um dos mecanismos responsáveis por isso envolve o processo de neovascularização dos tecidos malignos, principalmente nos não-seminomas.⁹⁹ Dessa forma, torna-se interessante explorar o papel de ADAMTS-1 neste tipo de tumor.

2 JUSTIFICATIVA

Embora seja uma doença altamente curável e quimiosensível, os TCGT de alto risco e, principalmente, os refratários ao tratamento, levam a um cenário desafiador na prática clínica do oncologista, por tratar-se de uma população jovem em plena idade laborativa e reprodutiva, sofrendo tratamentos mórbidos, sem preditores clínicos validados para guiar o seu manejo. A busca por ferramentas prognósticas e preditivas mais sensíveis faz-se necessária para uma melhor caracterização molecular desta doença e, para que possa conduzir a assinaturas que delinearão o tratamento para uma ação mais específica e efetiva, com um perfil de tolerância que justifique a relação entre risco e benefício. Eventos fundamentais para a tumorigênese foram descritos por Hanahan e Weinberg, como a instabilidade genômica, mutação, angiogênese sustentada e outros não menos importantes.^{76, 100} A associação da instabilidade de microssatélites de DNA e mutação do *BRAF* com desfechos clínicos adversos em outros tumores, colocam estes eventos como importantes focos de investigação nos TCGT e, além disso, os mesmos eventos quando já estudados em TCGT, ainda não trouxeram resultados contundentes. A associação da mutação e do polimorfismo do *TERT* com a tumorigênese e desfechos clínicos em outros tumores é convidativo para o entendimento deste evento molecular também nos TCGT. Por fim, reconhecendo a importância da angiogênese nos mecanismos de invasão tumoral nos TCGT e o interessante papel da ADAMTS-1 como regulador negativo deste evento no microambiente de outros tumores, é plausível haver um papel desta molécula nos mecanismos de regulação do microambiente tumoral dos TCGT.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar a frequência de mutações específicas e polimorfismo de DNA, a expressão de uma proteína presente no microambiente tumoral e a instabilidade de microssatélites de DNA nos TCGT. Além disso, avaliar a associação desses eventos moleculares fundamentais da tumorigênese com características clínico-patológicas e desfechos clínicos dos pacientes com TCGT.

3.2 Específicos

1. Avaliar a presença de instabilidade de microssatélites de DNA nos TCGT primários e em linhagens celulares de TCGT. Além disso, associar a presença dessa instabilidade a características clínico-patológicas da casuística estudada e, identificar possível valor prognóstico.
2. Avaliar a presença da mutação somática *BRAF V600E* nos TCGT primários e em linhagens celulares de TCGT. Além disso, associar a presença da mutação a características clínico-patológicas da casuística estudada e, identificar possível valor prognóstico.
3. Avaliar a presença das mutações somáticas -124:C>T e -146:C>T na região promotora do gene TERT nos TCGT e em linhagens celulares de TCGT. Além disso, associar a presença das mutações a características clínico-patológicas da casuística estudada e, identificar possível valor prognóstico.
4. Avaliar a frequência do SNP rs2853669 nos casos estudados para a mutação do TERT e associar a sua presença a características clínico-patológicas da casuística estudada.
5. Avaliar a expressão diferencial de ADAMTS-1 e, avaliar quanto à sua associação a características clínico-patológicas da casuística estudada e quanto ao seu possível valor prognóstico e preditivo de resposta a quimioterapia.

6. Realizar a quantificação dos microvasos no tecido tumoral dos casos de TCGT estudados e correlacioná-la com a expressão de ADAMTS-1.

7. Avaliar a probabilidade de sobrevivência global e comparar as mesmas entre grupos de interesse, de acordo com os eventos moleculares estudados.

8. Avaliar a probabilidade de sobrevivência livre de eventos e comparar a mesma entre grupos de interesse, de acordo com os eventos moleculares estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento e população estudada

Uma coorte retrospectiva foi criada a partir de casos consecutivos de TCGT provenientes do Hospital de Câncer de Barretos (Brasil) e do Hospital de Braga (Portugal), diagnosticados entre 2006 e 2012. Casos com material biológico indisponível ou escasso para análise foram excluídos, assim como aqueles que não haviam consentido o seu uso em pesquisa. Esta coorte foi composta por 150 pacientes e os tecidos fixados em parafina (FFPE) foram recuperados do Departamento de Patologia de ambas as instituições. Todas as amostras eram de tumores primários do testículo, antes do uso de qualquer tipo de tratamento sistêmico. Todos os casos foram revisados pelo patologista para a devida confirmação do diagnóstico histológico. Para o estudo da ADAMTS-1, apenas os 96 casos do Hospital de Câncer de Barretos submetidos a tratamento sistêmico com quimioterapia foram analisados. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Câncer de Barretos em 06 de março de 2013, sob o número CAEE 12297713.0.0000.5437 (Anexo C).

4.2 Linhagens celulares dos TCGT

As linhagens celulares de TCG NTERA-2, 1411H, 1777N e N2102Ep Clone2/A6 foram adquiridas da *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*. Elas foram cultivadas em DMEM, contendo 2 mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após alcançarem 80% de confluência, as linhagens celulares foram tripsinizadas, lavadas por duas vezes com PBS a 1% e centrifugadas. O DNA foi isolado através do uso do reagente TRIZOL (Life Technologies, Bethesda, MD, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A autenticação das linhagens celulares foi realizada através da tipagem do DNA usando *short tandem repeats (STR)* de acordo com a *International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines*, como reportado por Dirks et al.¹⁰¹ A genotipagem confirmou a identidade de todas as linhagens celulares utilizadas no trabalho.

4.3 Isolamento do DNA dos tecidos FFPE

O DNA foi obtido de porções representativas do tumor, conservadas como tecidos FFPE, conforme previamente descrito e com algumas modificações da técnica.¹⁰²⁻¹⁰⁴ De maneira sucinta, secções não coradas de 10 µm de espessura foram obtidas dos blocos de parafina. Secções coradas com hematoxilina & eosina (H&E) foram usadas para identificação e seleção da área tumoral. Esta então foi macrodissecada para dentro de um tubo de microcentrífuga, usando uma agulha estéril (Neolus, 25G – 0,5 mm). O tecido macrodissecado foi desparafinado por lavagens seriadas com xilol e etanol (100–70–50%) e deixados secar ao ar ambiente. O DNA foi isolado usando o QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA foram medidas usando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 e estocado a 20 °C até que a análise molecular fosse realizada.

4.4 Análise da instabilidade de microsatélites de DNA

A avaliação da instabilidade de microsatélites de DNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex, utilizando cinco marcadores de repetições de mononucleotídeos quasi-monomórficos (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, e BAT-26) conforme previamente descrito.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ De maneira sucinta, iniciador antisense foi marcado com um corante fluorescente: FAM (6-carboxifluoresceína) para o BAT-26 e NR-21, VIC (20-cloro-70-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína) para BAT-25 e NR-27, e NED (2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-tricloro-5-carboxifluoresceína) para NR-24. O PCR foi realizado usando o *Qiagen Multiplex PCR Kit* (Qiagen®), com 0,5 µL de DNA a 50 ng/µL. Todos os cinco marcadores foram co-amplificados com o uso da PCR multiplex padrão (desnaturação a 95 °C por 15 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, ligação a 55 °C por 90 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C por 40 min). Os produtos da PCR foram então submetidos a eletroforese capilar no *ABI 3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o programa GENEMAPPER v4.1 (Applied Biosystems).

Em um recente estudo, o nosso grupo determinou o alcance de variação quasi-monomórfica (QMVR) de cada marcador para a população brasileira.¹⁰⁶ Dessa forma, amostras

foram consideradas com alta MSI (MSI-H), quando dois ou mais marcadores estivessem alterados e baixo MSI (MSI-L), quando somente um marcador estivesse alterado. Nestes casos uma validação seria realizada através da análise do MSI no tecido normal ou imunohistoquímica das enzimas do MMR. As amostras foram consideradas com microssatélites estáveis, quando nenhum dos marcadores estivesse alterado.

A linhagem celular do câncer coloretal HCT-15 foi usada como um controle positivo de MSI-H em todas as análises de MSI. O DNA das células da HCT-15 foi extraído usando o reagente TRIZOL (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Em 10% das amostras, a análise de MSI foi repetida para o controle da qualidade da técnica.

4.5 Análise da mutação do *BRAF*

Regiões *hotspot* (exon 15) do oncogene *BRAF* (codon 600) foram analisadas por PCR, seguidas do sequenciamento direto, como previamente descrito pelo nosso grupo.^{102-104, 107} As PCR's foram realizadas com um volume final de 15 μ L, em conformidade com as seguintes condições: 1,5 μ L de tampão (Qiagen®); 2 mM de $MgCl_2$ (Qiagen®); 100 mM de dNTPs (Invitrogen, Carls-bad, CA, USA); 0,3 mM dos iniciadores direto e reverso (Sigma Aldrich), 1U de *HotStarTaq DNA polymerase* (Qiagen®) e 1 μ L de DNA. Os iniciadores do *BRAF* usados foram: 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' (direto) e 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3' (reverso).^{102-104, 107} O PCR foi realizado com o termociclador Veriti (Applied Biosystems) e os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Todos os produtos da PCR foram purificados com EXO-SAP (GE Technology, Cleveland, OH, USA), e submetidos à reação de sequenciamento usando 1 μ L de BigDye (Applied Biosystems), 1,5 μ L de tampão de sequenciamento (Applied Biosystems) e 1 μ L de iniciador. As reações de sequenciamento foram seguidas pela purificação pós-sequenciamento com EDTA, álcool e citrato de sódio. Os produtos da PCR foram eluídos em Hi-Di (formamide) e incubados a 95 °C por 5 min e subsequentemente resfriados a 4 °C por ao menos 5 min. O sequenciamento direto foi realizado no *ABI 3500 series Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Em 10% das amostras, a análise da mutação do *BRAF* foi repetida para o controle da qualidade da técnica.

4.6 Análise das mutações e do SNP do TERT

A análise de mutações *hotspot* na região promotora do *TERT* foi realizada por PCR seguido de sequenciamento direto conforme descrito previamente.⁷⁹ Resumidamente, um fragmento da região promotora de *TERT* foi amplificado por PCR usando os iniciadores direto: 5'-AGTGGATTCGCGGGCACAGA-3' e reverso: 5'-CAGCGCTGCCTGAAACTC-3', resultando em um produto de PCR de 235 pb, o qual continha os sítios de mutação -124:C>T e -146:C>T. A amplificação foi realizada segundo as condições: denaturação inicial de 95°C por 15 min, seguida por 40 ciclos de denaturação a 95°C por 30 segundos, ligação a 64°C por 90 segundos e alongação a 72°C por 30 segundos e alongação final a 72°C por 7 min. A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada por eletroforese em gel. O sequenciamento foi realizado usando um *Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems)* e o *ABI PRISM 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)*. A análise do eletroferograma gerado para cada caso permitiu também a identificação do SNP rs2853669.

4.7 Análise imunohistoquímica

Após selecionadas as lâminas com tumor, os blocos de parafina correspondentes foram submetidos a cortes histológicos de 4 micra de espessura e colocados em lâminas com carga positiva (Starfrost®). Para a análise de ADAMTS-1, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 70 °C e colocadas imediatamente em xilol. Na sequência, foram lavadas em momentos seguidos em diferentes concentrações de xilol, etanol e por fim água. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato em pH 6,0, usando micro-ondas 300W através de três sessões de 5 minutos. Depois de lavagem com PBS 1% e inativação das peroxidases com H₂O₂ 3% em metanol por 15 minutos, uma solução de bloqueio foi utilizada (Kit LabVision®) por 45 minutos e o anticorpo anti-ADAMTS-1 foi adicionado após diluição 1:200 usando o diluente universal (LabVision). As lâminas foram então encubadas *overnight* a 4 °C e o anticorpo secundário (LabVision) foi adicionado com uma gota para cada lâmina por 10 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem novamente com PBS, o complexo streptavidina-avidina (LabVision®) foi adicionado por 10 min em temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS e adição de

solução DAB (Dako®) por 6 a 7 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas e montadas para a leitura.

Para a análise de CD31 e consequente avaliação da microdensidade vascular (MDV), a recuperação antigênica foi realizada em banho Maria (PT LINK, Dako®, Denmark) em solução de recuperação antigênica de alto pH (Dako®, Denmark). Esse aparelho elevou a temperatura da solução até 90 °C e depois resfriou a mesma até 65 °C durante cerca de 50 minutos. As reações de imunohistoquímica foram realizadas no Autostainer Link 48 (Dako®, Denmark).

Utilizou-se o anticorpo anti-ADAMTS-1 (Santa Cruz Biotech., USA - Clone 3C8F4) e anti-CD31 (ABCAM, ab28364) para as análises imunohistoquímicas destas proteínas. Foram considerados como positivos os casos onde observamos imunomarcagem nas células tumorais (ADAMTS-1) e endoteliais (CD31). Para análise de ADAMTS-1, foi criado um escore semi-quantitativo onde foram observados a maior intensidade de coloração e a maior extensão de coloração. Cada uma dessas duas características foi pontuada de zero a três. O escore foi formado pela soma dos pontos para intensidade e extensão. Portanto, o escore poderia variar de zero a seis pontos definindo os casos de aumento e diminuição da expressão do marcador. Casos com escore 5 ou 6 foram considerados como alta expressão e os demais como baixa expressão, após análise de curva ROC para determinação do melhor *cut-off*, utilizando os eventos de interesse como parâmetro. Foi utilizado o tecido renal normal como controle positivo para análise de ADAMTS-1.

A análise da microdensidade vascular intratumoral foi realizada através da imunomarcagem endotelial do CD31 e seguiu a técnica já descrita por Weidner et al.¹⁰⁸, com alguma modificação.

4.8 Análise estatística

A descrição da amostra foi feita através de medidas de frequência, tendência e dispersão. Análise univariada foi utilizada para comparar categorias da amostra em relação às frequências encontradas dos marcadores biológicos analisados. Para isso, foram utilizados o teste do χ^2 ou o teste exato de Fischer de acordo com a característica da análise. Curvas de sobrevida foram plotadas através do método de Kaplan-Meier e as comparações univariadas de tempos de sobrevida foram realizadas através do teste de log rank. A sobrevida global foi calculada considerando o tempo entre o diagnóstico e o óbito como evento de interesse ou a data da última

informação do paciente vivo como censura. A sobrevida livre de eventos foi calculada considerando o tempo entre o diagnóstico e o primeiro evento de interesse. Paciente vivo sem evento de interesse documentado, foi censurado considerando a data da última informação. Foi considerado evento de interesse a progressão da doença, a recaída ou o óbito por qualquer causa. O valor de p estabelecido para significância estatística foi $< 0,05$. A análise dos dados foi realizada no programa SPSS 20.0 (*IBM Corp, Armonk, NY, USA*).

5 RESULTADOS

A Tabela 2 abaixo mostra a descrição da amostra de acordo com as subpopulações de estudo desta tese.

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos tumores de células germinativas do testículo (TCGT) conforme objetivo de estudo.

Características	Pacientes			
	<i>BRAF</i> , N (%)	<i>MSI</i> , N (%)	<i>TERT</i> , N (%)	<i>ADAMTS-1</i> , N (%)
TCGT válidos	132	133	138	96
Idade (anos)				
Média [DP]	30 [9,9]	30 [10,0]	30 [9,5]	28,9 [8,0]
Mín-máx	1 - 63	1 - 63	1 - 63	18 - 62
Grupo histológico				
Não-seminoma	90 (68,2)	91 (68,4)	95 (68,8)	71 (74,0)
Seminoma	42 (31,8)	42 (31,6)	43 (31,2)	25 (26,0)
Histologia				
Tumor misto	53 (40,2)	54 (40,6)	51 (37,0)	27 (28,1)
Seminoma	42 (31,8)	42 (31,6)	43 (31,2)	25 (26,0)
Carcinoma embrionário	16 (12,1)	17 (12,8)	18 (13,0)	11 (11,5)
Tumor do seio endodérmico	10 (7,6)	9 (6,8)	10 (7,2)	07 (7,3)
Teratoma imaturo	6 (4,5)	6 (4,5)	7 (5,1)	05 (5,2)
Teratoma maduro	3 (2,3)	3 (2,3)	4 (2,9)	1 (1,0)
Coriocarcinoma	2 (1,5)	2 (1,5)	2 (1,4)	2 (2,1)
Ignorado	0	0	3 (2,2)	0
Marcadores tumorais (AJCC)				
S0	18 (13,6)	17 (12,8)	18 (13,0)	01 (1,0)
S1	31 (23,5)	30 (22,6)	32 (23,2)	32 (33,3)
S2	38 (28,8)	37 (27,8)	39 (28,3)	25 (26,0)
S3	23 (17,4)	25 (18,8)	24 (17,4)	06 (6,2)
SX	22 (16,7)	24 (18,0)	25 (18,1)	32 (33,3)
Estadio (AJCC)				
I	28 (21,2)	28 (21,1)	29 (21,0)	6 (6,2)
IS	20 (15,2)	21 (15,8)	22 (15,9)	12 (12,5)
II	25 (18,9)	26 (19,5)	27 (19,6)	31 (32,3)
III	59 (44,7)	58 (43,6)	60 (43,5)	47 (49,0)
Número de sítios de metástase				
0	48 (36,4)	49 (36,8)	51 (37,0)	18 (18,8)
1	36 (27,3)	36 (27,1)	36 (26,1)	44 (45,8)
2	26 (19,7)	23 (17,3)	26 (18,8)	19 (19,8)
≥ 3	9 (6,8)	10 (7,5)	10 (7,2)	15 (15,6)
Ignorado	13 (9,8)	15 (11,3)	15 (10,9)	0
Tipo de quimioterapia (1ª linha)				
BEP	-	-	-	77 (80,2)
EP	-	-	-	17 (17,7)
Carboplatina	-	-	-	1 (1,0)
Outros	-	-	-	1 (1,0)
Nº Ciclos (1ª linha)				
1	-	-	-	8 (8,3)
2	-	-	-	5 (5,2)
3	-	-	-	29 (30,2)
4	-	-	-	54 (56,2)
Quimiosensibilidade				
Responsivo	84 (63,6)	84 (63,2)	94 (68,1)	68 (70,8)
Refratário	20 (15,2)	21 (15,8)	20 (14,5)	19 (19,8)
Não aplicável	28 (21,2)	28 (21,1)	24 (17,4)	9 (9,4)
Risco segundo IGCCCG				
Baixo	31 (23,5)	31 (23,3)	31 (22,5)	46 (47,9)
Intermediário	17 (12,9)	17 (12,8)	17 (12,3)	18 (18,7)
Alto	27 (20,5)	27 (20,3)	28 (20,3)	13 (13,5)
Não aplicável	48 (36,4)	49 (36,8)	51 (37,0)	18 (18,7)
Ignorado	9 (6,8)	9 (6,8)	11 (8,0)	1(1,0)

DP: Desvio padrão; AJCC: American Joint Committee on Cancer; IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group; BEP: Bleomicina, Etoposido e Cisplatina; EP: Etoposido e Cisplatina.

Dos casos que compunham a coorte, 17 casos da análise da MSI e 18 casos da análise da mutação do *BRAF* foram inconclusivos devido a pobre qualidade e quantidade do DNA extraído. Doze amostras demonstraram resultados inconclusivos para a análise da mutação do *TERT*, também devido a questões da qualidade do DNA extraído. Dessa forma, são demonstrados resultados conclusivos de 138, 132 e 133 pacientes, respectivamente, para análise da mutação do *TERT*, *BRAF* e da MSI. Para análise da expressão da ADAMTS-1 e da MDV, 96 casos conclusivos foram analisados.

5.1 Análise da MSI e da mutação do *BRAF*

A idade média do diagnóstico foi de 30 anos e a maioria dos casos (~68%) era composta por não-seminomas. A histologia predominante encontrada foi de tumor misto, seguido dos seminomas. Todos os estádios da doença foram observados, enquanto a doença avançada foi o estágio mais frequentemente identificado. Dentre aqueles que receberam quimioterapia, aproximadamente 20% foram considerados com doença refratária após o tratamento com BEP. A maior parte dos casos foram classificados em risco intermediário ou alto de acordo com o IGCCCG. O tempo de seguimento mediano foi de 36 meses para os casos analisados para MSI e de 35,5 meses para os casos avaliados para a mutação do *BRAF*. A sobrevida global em cinco anos foi de 84,5 e 83,2% para os casos avaliados para MSI e mutação do *BRAF*, respectivamente.

Dentre os pacientes refratários ao tratamento, a idade média foi de 29 anos (mín: 20 anos e máx: 51 anos) e 87% dos tumores eram não-seminomas. Um único caso foi categorizado como estágio II, enquanto os demais eram estágio III. Oitenta e cinco por cento dos casos válidos se apresentaram com dois ou mais sítios de metástase e 95% foram classificados com tendo risco alto ou intermediário de acordo com o IGCCCG.

A sobrevida global dos pacientes responsivos e daqueles refratários para os casos avaliados para MSI e mutação do *BRAF* são demonstrados nas figuras 5A e 5B, respectivamente. Os casos refratários tiveram sobrevida mais pobre quando comparados aos responsivos.

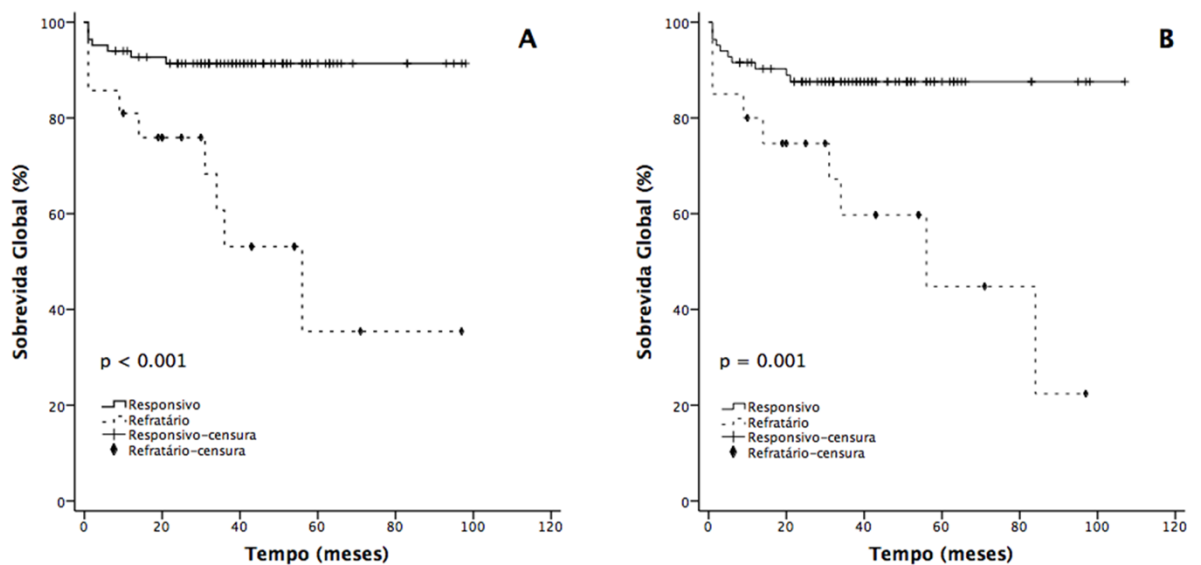


Figura 5 – Sobrevida global dos casos de TCGT responsivos e refratários ao tratamento. (A) amostra MSI; (B) amostra mutação do *BRAF*.

Nós obtivemos resultados do *status* da MSI para 88,7% (133/150) dos pacientes. Cento e vinte e seis tinham um genótipo estável para microsatélites (MSS), 7 tinham MSI-L e nenhum tinha MSI-H. Para determinar o MSI-L de forma acurada, os marcadores para MSI do tumor foram comparados com o tecido germinativo do paciente. Dessa forma, para os sete casos com MSI-L, nós isolamos o tecido normal circunjacente ao tumor e identificamos a presença de um idêntico perfil de marcadores para MSI, portanto indicando o fenótipo MSS.

A análise da mutação *BRAF V600E* obteve sucesso em 88% (132/150) dos casos de TCGT, sendo em todos os casos observado a presença do genótipo selvagem.

Todas as linhagens celulares de TCG foram observadas como tendo MSS e *BRAF* selvagem.

5.2 Análise da mutação do *TERT* e do SNP rs2853669

Setenta por-cento dos casos eram brasileiros e os demais, portugueses. Todos os grupos de risco de acordo com IGCCCG foram representados e a sobrevida global em cinco anos foi de 84,1%. A detecção da mutação nos *hotspots* da região promotora do gene *TERT* (c.-124:C>T e c.-146:C>T) mostrou a presença da c.-124:C>T em um paciente e a c.-146:C>T em três pacientes com TCGT (Tabela 3). A Figura 6 ilustra o eletroferograma e a histologia de dois destes casos.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos casos com mutação da região promotora do *TERT*.

Caso	Mutação	SNP rs2853669	Idade (anos)	Histologia	Tumor primário (cm)	Invasão vascular	Marcador tumoral	Estadio	Sítio de metástase	Risco pelo IGCCCG	Sensibilidade a quimioterapia	Status
1	c.-124:C>T	Não analisado	26	Carcinoma embrionário	6	Sim	S2	III	Linfonodo	Baixo	Responsivo	Vivo
2	c.-146:C>T	Não analisado	22	Tumor do seio endodérmico	Ignorado	Não	S2	III	Linfonodo	Intermediário	Refratário	Óbito pela doença
3	c.-146:C>T	TT	19	Tumor misto	9	Não	SX	I	n/a	n/a	n/a	Vivo
4	c.-146:C>T	TT	43	Seminoma	6,5	Sim	S1	I	n/a	n/a	n/a	Vivo

n/a - Não aplicável

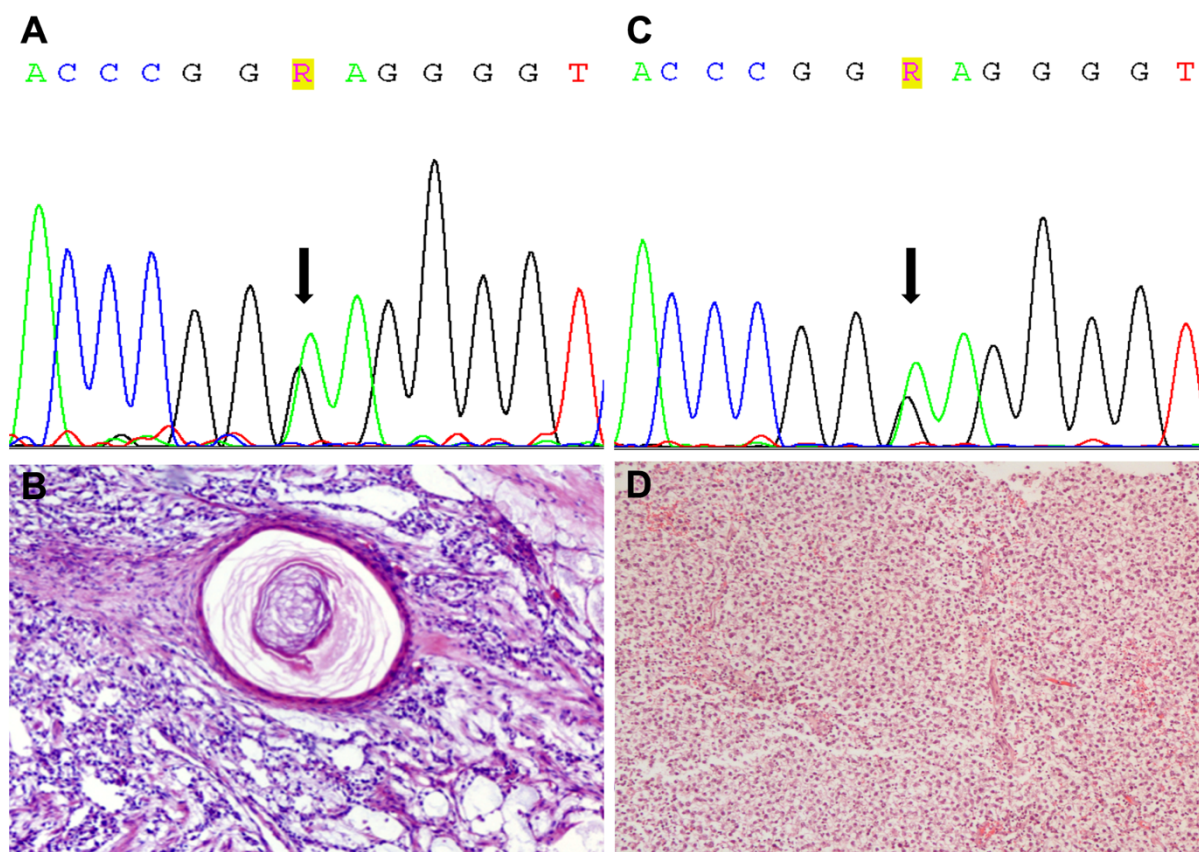


Figura 6 – Sequenciamento e histologia em coloração em H&E, dos casos 3 (A e B) e 4 (C e D) mostrados na tabela 3. O caso 3 apresentava um tumor misto composto por 50% de teratoma imaturo e 50 % de tumor do seio endodérmico e o caso 4 era um seminoma puro. As setas pretas indicam a posição da mutação c.-146:C>T na região promotora do *TERT*.

Três dos quatro casos mutados apresentaram tumores primários maiores que 6 centímetros. Um deles (caso 4, Tabela 3) foi um seminoma puro restrito ao testículo em um adulto

mais velho e os demais foram tumores não-seminoma em pacientes mais jovens. Somente um caso (caso 2, Tabela 3) correspondeu a doença refratária avançada e o paciente morreu devido ao TCGT. Nenhuma inferência estatística foi feita sobre associações entre a mutação do TERT e as características clínico-patológicas dos TCGT, devido a sua baixa frequência entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Mutação da região promotora do *TERT* de acordo com as variáveis estudadas nos TCGT.

Características	Pacientes N (%)	Mutação do <i>TERT</i>		
		c.-124:C>T	c.-146:C>T	Frequência
TCGT	138	1	3	2,9
Idade				
< 30 anos	83 (60,1)	1	2	3,6
≥ 30 anos	55 (39,9)	0	1	1,8
Grupo histológico				
Não-seminoma	95 (68,8)	1	2	3,2
Seminoma	43 (31,2)	0	1	2,3
Histologia				
Tumor misto	51 (37,0)	0	1	2,0
Seminoma	43 (31,2)	0	1	2,3
Carcinoma embrionário	18 (13,0)	1	0	5,6
Tumor do seio endodérmico	10 (7,2)	0	1	10,0
Teratoma imaturo	7 (5,1)	0	0	0
Teratoma maduro	4 (2,9)	0	0	0
Coriocarcinoma	2 (1,4)	0	0	0
Ignorado	3 (2,2)	0	0	0
Marcadores tumorais (AJCC)				
S0	18 (13,0)	0	0	0
S1	32 (23,2)	0	1	3,1
S2	39 (28,3)	1	1	5,1
S3	24 (17,4)	0	0	0
SX	25 (18,1)	0	1	4,0
Estadio (AJCC)				
I	29 (21,0)	0	2	6,9
IS	22 (15,9)	0	0	0
II	27 (19,6)	0	0	0
III	60 (43,5)	1	1	3,3
Número de sítios de metástase				
0	51 (37,0)	0	2	3,9
1	36 (26,1)	1	1	5,5
2	26 (18,8)	0	0	0
≥ 3	10 (7,2)	0	0	0
Ignorado	15 (10,9)	0	0	0
Quimiosensibilidade				
Responsivo	94 (68,1)	1	0	1,0
Refratário	20 (14,5)	0	1	5,0
Não aplicável	24 (17,4)	0	2	8,3
Risco segundo IGCCCG				
Baixo	31 (22,5)	1	0	3,2
Intermediário	17 (12,3)	0	1	5,9
Alto	28 (20,3)	0	0	0
Não aplicável	51 (37,0)	0	2	3,9
Ignorado	11 (8,0)	0	0	0

AJCC: American Joint Committee on Cancer; TERT: telomerase reverse transcriptase;

IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group.

A genotipagem do SNP rs2853669 obteve sucesso em 66,6% dos casos e foram encontrados os seguintes genótipos: 8,7% C/C, 28,2% T/C, e 63,0% T/T. A frequência alélica para T foi de 77,2% e para C foi de 22,8%. Nos quatro tumores com mutação no TERT, a genotipagem do SNP foi possível em dois casos e, ambos eram homocigotos T (Tabela 3).

O SNP rs2853669 (C/C + C/T) não foi associado com qualquer característica clínico-patológica dos TCGT (Tabela 5).

Tabela 5 - Polimorfismo do *TERT* e suas associações com as variáveis estudadas nos TCGT.

Características	Polimorfismo do <i>TERT</i> (SNP rs2853669)				
	Pacientes N (%)	(TT)	Portador (C/C + C/T)	Portador (%)	p-valor
TCGT	92	58	34	37,0	
Idade					
< 30 anos	52 (56,5)	35	17	32,7	0,33
≥ 30 anos	40 (43,5)	23	17	42,5	
Grupo histológico					
Não-seminoma	62 (67,4)	40	22	35,5	0,67
Seminoma	30 (32,6)	18	12	40,0	
Histologia					
Tumor misto	34 (36,9)	19	15	44,1	0,9
Seminoma	31 (33,7)	19	12	38,7	
Carcinoma embrionário	11 (12,0)	7	4	36,4	
Tumor do seio endodérmico	6 (6,5)	4	2	33,3	
Teratoma imaturo	6 (6,5)	5	1	16,7	
Teratoma maduro	2 (2,2)	2	0	0	
Coriocarcinoma	1 (1,1)	1	0	0	
Ignorado	1 (1,1)	1	0	0	
Marcadores tumorais (AJCC)					
S0	17 (18,5)	9	8	47,0	0,11
S1	24 (26,0)	20	4	16,7	
S2	22 (23,9)	12	10	45,4	
S3	16 (17,4)	8	8	50,0	
SX	13 (14,1)	9	4	30,8	
Estadio (AJCC)					
I	24 (26,0)	16	8	33,3	0,6
IS	13 (14,1)	6	7	53,8	
II	18 (19,7)	12	6	33,3	
III	37 (40,2)	24	13	35,1	
Número de sítios de metástase					
0	37 (40,2)	22	15	40,5	0,07
1	22 (23,9)	11	11	50,0	
2	17 (18,5)	15	2	11,8	
≥ 3	7 (7,6)	5	2	28,6	
Ignorado	9 (9,8)	5	4	44,4	
Quimiosensibilidade					
Responsivo	68 (73,9)	41	27	39,7	0,78
Refratário	14 (15,2)	9	5	75,4	
Não aplicável	10 (10,9)	8	2	20,0	
Risco segundo IGCCCG					
Baixo	22 (23,9)	17	5	22,7	0,22
Intermediário	12 (13,0)	5	7	58,3	
Alto	16 (17,4)	10	6	37,5	
Não aplicável	37 (40,2)	22	15	40,5	
Ignorado	5 (5,4)	4	1	20,0	

AJCC: American Joint Committee on Cancer; TERT: telomerase reverse transcriptase;

IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group.

Nós não fomos capazes de encontrar diferença significativa da sobrevida global em cinco anos dos genótipos C/C + C/T versus T/T (respectivamente 94,1 versus 81,7 %, $p = 0.33$). Nenhuma das quatro linhagens celulares de TCG apresentaram mutações nos hotspots da região promotora do gene TERT. Quanto ao SNP rs2853669, uma linhagem celular (NTERA-2) foi C/C e as demais foram T/T.

5.3 Análise da expressão da ADAMTS-1 e da MDV

Noventa e seis casos de TCGT submetidos a quimioterapia no Hospital de Câncer de Barretos foram analisados para a expressão de ADAMTS-1 e microdensidade vascular (Tabela 2).

A idade média do diagnóstico foi similar às demais subpopulações estudadas e uma proporção um pouco maior de casos de não-seminoma compunha esta amostra. Também aqui a histologia predominante encontrada foi de tumor misto, seguido dos seminomas. Todos os estádios da doença foram observados e a doença avançada foi mais frequente, mas aqui apenas uma pequena proporção de doença restrita ao testículo foi incluída (6,2%), submetidos a quimioterapia num contexto adjuvante. O protocolo de tratamento predominante em primeira linha foi BEP; com mais de 50% submetidos a quatro ciclos de tratamento; seguido do EP (BEP sem o uso da Bleomicina). Nesta casuística, quase metade dos casos era de baixo risco de acordo com o IGCCCG.

A média de microdensidade vascular encontrada em regiões vasculares *hotspot* dos TCGT foi de 20 vasos (mín: 5 e máx: 50; DP: 10). A Tabela 6 mostra a relação do nível de expressão da ADAMTS-1 nos TCGT com as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Tabela 6 - Expressão de ADAMTS-1 e variáveis clinicopatológicas do tumor de células germinativas do testículo.

Características	N	Expressão de ADAMTS-1		Valor p	
		Alta, N (%)	Baixa, N (%)		
TCGT	96	61 (63,5)	35 (36,5)		
Idade					
< 28,9 anos	60	40 (66,7)	20 (33,3)	0,41	
≥ 28,9 anos	36	21 (58,3)	15 (41,7)		
Grupo histológico					
Não-seminoma	71	44 (62,0)	27 (38,0)	0,59	
Seminoma	25	17 (68,0)	8 (32,0)		
Histologia*					
Seminoma	25	17 (68,0)	8 (32,0)	0,21	
Tumor misto	27	16 (59,3)	11 (40,7)		
Tumor misto com Teratoma	18	15 (83,3)	3 (16,7)		
Carcinoma embrionário	11	6 (54,5)	5 (45,5)		
Tumor do seio endodérmico	7	4 (57,1)	3 (42,9)		
Teratoma imaturo	5	2 (40,0)	3 (60,0)		
Coriocarcinoma	2	0 (00,0)	2 (100,0)		
Teratoma maduro	1	1 (100,0)	0 (0,0)		
Marcadores tumorais séricos (AJCC)*					
S0	1	0 (00,0)	1 (100,0)		0,04
S1	32	23 (71,9)	9 (28,1)		
S2	25	11 (44,0)	14 (56,0)		
S3	6	3 (50,0)	3 (50,0)		
SX	32	24 (75,0)	8 (25,0)		
Estadio (AJCC)					
I	6	3 (50,0)	3 (50,0)	0,46	
IS	12	10 (83,3)	2 (16,7)		
II	31	19 (61,3)	12 (38,7)		
III	47	29 (61,7)	18 (38,3)		
Número de sítios de metástase					
0	18	13 (72,2)	5 (27,8)	0,2	
1	44	29 (65,9)	15 (34,1)		
2	19	8 (42,1)	11 (57,9)		
≥ 3	15	11 (73,3)	4 (26,7)		
Quimiosensibilidade [‡]					
Responsivo	68	44 (64,7)	24 (35,3)	0,58	
Refratário	19	11 (57,9)	8 (42,1)		
Risco de acordo com IGCCCG [‡]					
Baixo	46	30 (65,2)	16 (34,8)	0,42	
Intermediário	18	12 (66,7)	6 (33,3)		
Alto	13	6 (46,2)	7 (53,8)		
Expressão de ADAMTS-1 no estroma [‡]					
Alta	21	20 (95,2)	1 (4,8)	0,001	
Baixa	60	32 (53,3)	28 (46,7)		
Microdensidade vascular (MDV) do TCGT					
Alta	40	23 (57,5)	17 (42,5)	0,29	
Baixa	56	38 (67,9)	18 (32,1)		
Invasão angio-linfática [‡]					
Sim	33	21 (63,6)	12 (36,4)	0,98	
Não	58	37 (63,8)	21 (36,2)		

AJCC: American Joint Committee on Cancer ; IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group ; BEP: Bleomicina, Etoposido e Cisplatina; EP: Etoposido e Cisplatina.

(*) Teste exato de Fischer.

(‡) Casos válidos.

Uma associação da expressão da ADAMTS-1 com os níveis dos marcadores séricos e, principalmente, com o nível de expressão de ADAMTS-1 no estroma circunjacente, foi encontrada. A Figura 7 abaixo mostra a fotomicrografia de três casos com diferentes níveis de expressão da ADAMTS-1.

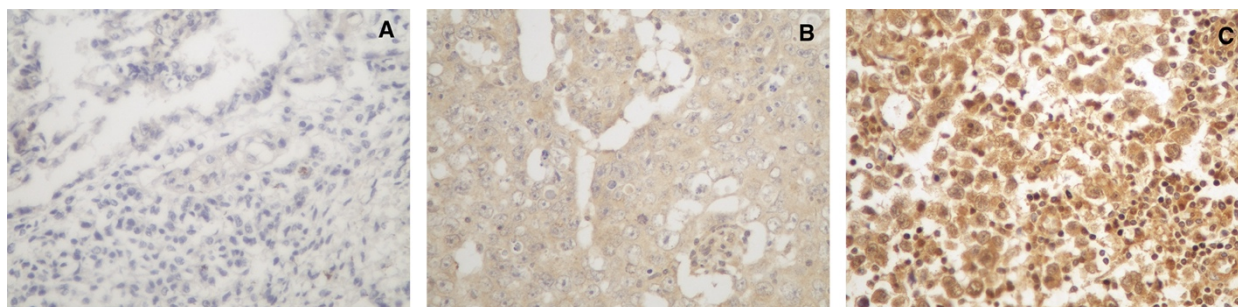


Figura 7 – Fotomicrografias com diferentes níveis de expressão da ADAMTS-1 (magnificação de 400x). (A) Teratoma imaturo e escore de expressão zero; (B) Carcinoma embrionário e escore de expressão 4; (C) Seminoma e escore de expressão 6.

A Tabela 7 mostra a relação da sobrevida livre de eventos e sobrevida global dos TCGT analisados para a expressão da ADAMTS-1, com as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Tabela 7 - Sobrevida global e livre de eventos dos TCGT conforme as variáveis estudadas.

Características	Pacientes N	Sobrevida Livre de Eventos (%)			Sobrevida Global (%)		
		2 anos	5 anos	p-value [†]	2 anos	5 anos	p-value [†]
TGCT	96	73,0	67,7	*	87,2	80,6	*
Idade							
< 28,9 anos	60	76,1	68,3	0,7	88,2	80,4	0,6
≥ 28,9 anos	36	67,5	67,5		85,2	80,7	
Grupo histológico							
Não-seminoma	71	71,0	64,3	0,3	86,9	80,2	0,9
Seminoma	25	79,0	79,0		88,0	82,1	
Histologia							
Seminoma	25	79,0	79,0		88,0	82,1	
Tumor misto	27	77,8	77,8		85,2	85,2	
Tumor misto com Teratoma	18	75,8	64,9	0,2	87,7	87,7	0,1
Carcinoma embrionário	11	81,8	70,1		100,0	100,0	
Tumor do seio endodérmico	7	28,6	28,6		83,3	44,4	
Teratoma imaturo	5	60,0	40,0		80,0	40,0	
Coriocarcinoma	2	50	*		50	*	
Teratoma maduro	1	100,0	100,0		100,0	100,0	
Marcadores séricos (AJCC)							
S0	1	100,0	100,0		100,0	100,0	
S1	32	90,3	90,3		93,8	93,8	
S2	25	67,0	61,5	< 0,001	83,6	79,0	0,02
S3	6	0	0		50	*	
SX	32	73,3	63,2		90,1	75,4	
Estadio (AJCC)							
I	6	100,0	100,0		100	100	
IS	12	100,0	100,0	< 0,001	100	100	0,04
II	31	86,4	81,0		96,8	80,8	
III	47	54,2	47,3		76,0	72,5	
Número de sítios de metástase							
0	18	100,0	100,0		100,0	100,0	
1	44	86,0	82,3	< 0,001	90,7	82,9	0,001
2	19	61,8	61,8		89,2	81,1	
≥ 3	15	20,0	0		60,0	50,0	
Quimiosensibilidade							
Responsivo	68	89,5	89,5	< 0,001	89,5	89,5	< 0,001
Refratário	19	10,5	0		73,3	42,2	
Risco conforme IGCCCG							
Baixo	46	88,8	85,3	< 0,001	95,6	95,6	< 0,001
Intermediário	18	45,4	36,3		76,9	56,1	
Alto	13	15,4	15,4		52,7	52,7	
Microdensidade vascular							
Alta	40	76,5	68,9	0,6	92,3	82,3	0,5
Baixa	56	70,5	67,3		83,5	79,3	
Invasão angio-linfática							
Sim	33	71,7	62,8	0,5	84,6	84,6	0,5
Não	58	75,2	72,9		91,2	84,4	
Expressão de ADAMTS-1							
Alta	61	73,9	68,0	0,8	88,2	83,3	0,7
Baixa	35	71,2	66,8		85,5	75,5	

AJCC: American Joint Committee on Cancer;

IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group;

* Não aplicável; † log rank teste

O tempo de seguimento mediano foi de 47,5 meses e a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global em cinco anos foi, respectivamente, de 67,7% e 80,6%. Variáveis conhecidas na literatura por estarem associadas a desfechos clínicos foram encontradas associadas à sobrevida livre de eventos e sobrevida global na nossa casuística, como marcadores séricos, estágio, quimiosensibilidade e risco pelo IGCCCG. Entretanto, nós não fomos capazes de mostrar uma associação dos desfechos clínicos com o nível de expressão da ADAMTS-1.

6 DISCUSSÃO

6.1 MSI e mutação do BRAF nos TCGT

Nesta tese, nós conseguimos demonstrar a ausência da MSI em todos os casos de TCGT analisados, mesmo nos casos refratários ao tratamento e nas linhagens celulares. Estes resultados estão de acordo com vários estudos, os quais também não foram capazes de observar tais alterações nos TCGT (Tabela 8).¹⁰⁹⁻¹¹²

Table 8 - Resumo dos estudos que avaliaram MSI em tumores de células germinativas do testículo (TCGT).

Autor, ano	Amostra (N) Total / Refratário	Idade (anos)	País	MSI alta (%) Total / Refratário	Marcadores para MSI
Huddart et al., 1995	29 / NR	NR	Reino Unido	21 / NA	Repetições de dinucleotídeo (D1S216, D2S123, D16S303, D17S796) e tetra- e tri-nucleotídeo.
Lothe et al., 1995	31 / NR	NR	Noruega, Finlândia e Dinamarca	0 / NA	32 loci de microsatélites (repetições de dinucleotídeo)
Faulkner et al., 2000	24 / NR	NR	Austrália	0 / NA	78 loci de microsatélites (repetições de di- e tetra-nucleotídeo)
Velasco et al., 2004	118 / NR	16 - 45	Chile	25 / NA	Mononucleotídeo (BAT25, BAT26) e dinucleotídeo (D2S123, D3S1029, D3S1283, D3S1293, D9S66, D9S113, LNSCA e TP53CA)
Sommerer et al., 2005	62 / 0	NR	Alemanha	6 / NA	Mononucleotídeo (BAT25, BAT26, BAT40) e dinucleotídeo (D2S123, D5S346, MSH6)
Olasz et al. 2005	51 / 15	17 - 60	Hungria	0 / 0	Mononucleotídeo (BAT25, BAT26) e dinucleotídeo (D2S123, D5S346, D17S250)
Honecker et al., 2009	135 / 35	14 - 66	Alemanha e Holanda	7 / 26	Mononucleotídeo (BAT25, BAT26, BAT27, BAT40) e dinucleotídeo (D2S123, D5S346, D17S250, MSH6)
Mayer et al., 2011 †	12 / NR	17 - 48	Alemanha e Holanda	33 / NA	Mononucleotídeo (BAT25, BAT26) e dinucleotídeo (D2S123, D5S346, D17S250)
Vladušić et al., 2014	40 / NR	17 - 60	Croácia	0 / NA	BAT-26 (mononucleotídeo) e 8 loci de microsatélites (repetições de dinucleotídeo)
Estudo atual	133 / 20	1 - 63	Brasil e Portugal	0 / 0	Mononucleotídeo (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26)

NR: não reportado; NA: não aplicável; † Recidiva tardia

Em contraste, outro estudo relatou a presença da MSI alta em uma frequência significativa (33%) de casos, sugerindo-o como um potencial biomarcador da doença refratária nos TCGT.¹¹³ Vários fatores podem explicar essa discrepância, incluindo as diferentes metodologias utilizadas, subtipos tumorais avaliados e populações etnicamente distintas. De fato, os dados são ainda controversos, com frequências da MSI variando de zero a 33% e avaliando um número limitado de casos (Tabela 8).

Metodologias distintas têm sido usadas na avaliação da MSI nos TCGT e estas incluem o uso de marcadores microsatélites específicos de mono- e tetra-nucleotídeos, onde cada um dos quais poderia levar a diferentes resultados, conforme reportado para EMAST, uma forma de MSI associada com repetições de tetra-nucleotídeos.^{114, 115} Em nosso trabalho foi utilizada uma metodologia validada, que compreende cinco marcadores de repetições de mononucleotídeos

quasi-monomórficos, para identificar MSI (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, e BAT-26), conforme previamente descrito.^{104, 105, 116} BAT- 25, BAT-26 (mononucleotídeos) e D5S346, D2S123, D17S250 (dinucleotídeos) eram classicamente recomendados pelo painel de Bethesda para a avaliação da MSI até o ano de 2002¹¹⁷, quando um consenso internacional atualizou a recomendação e excluiu as repetições de dinucleotídeos, considerando a melhor sensibilidade para um painel de marcadores de repetições de mononucleotídeos.¹¹⁸ Nós utilizamos esta nova metodologia recomendada para este estudo e que tem sido recentemente validada por nosso grupo na população Brasileira.¹⁰⁶ Outra causa potencial para as diferenças nos resultados pode estar associada com a agressividade tumoral. Mayer et al.⁷¹ avaliaram 111 casos de TCGT e 11 deles eram refratários ao tratamento. Os autores encontraram uma maior taxa da MSI nos casos refratários, comparados aos casos responsivos ao tratamento (45% vs. 6%, $p = 0,001$). É importante notar que dentre os casos refratários, o grupo com MSI alcançou uma melhor mediana de sobrevida livre de progressão (26 meses vs. 6 meses, $p = 0.05$), embora não esteja claro como os TCGT em ambos os grupos foram tratados. Cem casos não selecionados do estudo de Mayer et al. foram usados mais tarde como um grupo controle para o estudo de Honecker et al.⁶⁹ (Tabela 8). Velasco et al.⁷³ avaliaram a expressão das enzimas associadas ao MMR e MSI em 162 pacientes com TCGT, composto na sua maioria por seminomas. Os autores encontraram uma correlação negativa entre MSI e sobrevida. Entretanto, a frequência da doença avançada e de alto risco era desconhecida, o que pode levar a uma interpretação equivocada dos resultados. Apesar destes dados, Olasz et al.¹¹¹ estudaram 15 casos de TCGT refratários ao tratamento e 36 casos responsivos e, embora eles tenham encontrado MSI em 31,4% dos pacientes, nenhum dos casos era MSI-H e não houve correlação com qualquer variável clínica estudada, incluindo-se resistência ao tratamento. De maneira interessante, Piulats et al.¹¹⁹ também não identificou também MSI em um modelo de camundongo nude, através de xeno-enxertos de TCG refratário à cisplatina.

Outro biomarcador avaliado nesta tese foi a mutação *BRAF V600E*. Nós não identificamos qualquer caso ou linhagem celular portanto esta mutação do *BRAF* e isso está de acordo com a maioria dos estudos que abordam esta questão, desde do primeiro estudo desenvolvido por McIntyre et al.¹²⁰ (Table 9).

Table 9 - Resumo dos estudos que avaliaram mutação de *BRAF* em tumores de células germinativas do testículo (TCGT).

Autor, ano	Amostra (N)		Idade (mín-máx)	País	Mutação de <i>BRAF</i> (%)	
	Total	Refratário			Total	Refratário
McIntyre et al., 2005	65	/ NR	NR	Reino Unido	0	/ NA
Sommerer et al., 2005	62	/ 0	NR	Alemanha	5	/ NA
Honecker et al., 2009	135	/ 35	14 - 66	Alemanha e Holanda	7	/ 26
Piulats et al., 2010	75	/ 25	16 - 56	Espanha	0	/ 0
Mayer et al., 2011 †	12	/ NR	17 - 48	Alemanha e Holanda	28	/ NA
Masque-Soler et al., 2011	66	/ 15	1 - 20	Alemanha	0	/ 0
Satput et al., 2013	59	/ 33	NR	Estados Unidos	0	/ 0
Feldman et al., 2013	70	/ 46	14 - 60	Estados Unidos	0	/ 0
Estudo atual	132	/ 20	1 - 63	Brasil e Portugal	0	/ 0

NR: não reportado; NA: não aplicável; † Recidiva tardia

Todavia, alguns autores têm relatado mutações do *BRAF* nos TCGT, com uma frequência de até 28% (Table 9). De forma interessante, Honecker et al.⁶⁹ encontraram que os tumores refratários ao tratamento também tinham uma maior frequência de mutação *BRAF V600E* comparada com TCGT não selecionados (26% vs. 1%, $p = 0.0001$) e, pela primeira vez, uma correlação entre esta mutação e resistência à cisplatina foi relatada. Entretanto, Piulats et al.¹²¹ também avaliaram o *status* da mutação do *BRAF* em 75 pacientes com TCGT. Oitenta e quatro por cento dos casos eram não-seminomas e um terço de todos os casos eram refratários a cisplatina. Nenhum desses casos exibiu uma mutação *BRAF V600E*. Mais recentemente, Satpute et al.¹²² analisaram 59 casos de TCG e entre estes, mais da metade eram refratários ao tratamento e também, nenhuma mutação do *BRAF* foi encontrada. Adicionalmente, Feldman et al.¹²³ não encontraram mutações do *BRAF* em 46 casos de TCGT refratários e, esta foi a maior casuística de casos refratários já reportada, além de incluir também amostras biológicas de tumores primários e metastáticos. De forma interessante, TCAM2, uma linhagem celular de seminoma, havia sido inicialmente reportada como portadora de mutação do *BRAF*.¹²⁴ Entretanto, outros estudos acabaram contrapondo-se a este achado, mesmo em outras linhagens celulares de TCG.^{123, 125}

6.2 Mutação do TERT e presença do SNP rs2853669 nos TCGT

Nesta tese, nós relatamos pela primeira vez na literatura, a presença de mutações somáticas na região promotora do gene *TERT* nos TCGT. Nós observamos uma frequência de 2,9% (4/138) desta mutação nos casos avaliados. Recentes estudos têm descrito uma alta frequência de mutação na região promotora do *TERT* em vários tumores humanos e linhagens celulares humanas.^{78-81, 126, 127} Nos glioblastomas e câncer papilífero da tireoide, estas mutações foram associadas com idade mais avançada ao diagnóstico.⁷⁹ Outro recente estudo demonstrou uma associação entre esta mutação e idade mais avançada, tumores de maior tamanho, metástase distante e menor sobrevida doença específica no câncer papilífero da tireoide.¹²⁸ Em melanomas, mutações na região promotora de TERT foram também associadas com menor sobrevida livre de doença.¹²⁹ No nosso estudo, nós identificamos estas mutações em um pequeno número de casos que exibiam diferentes estádios de doença, invasividade e histologias, o que acabou por dificultar qualquer associação significativa.

O perfil de mutação do *TERT* tem sido associado com outras características moleculares em vários tipos de tumores, particularmente uma interessante associação com mutação do *BRAF* em melanomas cutâneos e câncer da tireoide.^{79, 80} Como visto nesta tese anteriormente, os TCGT parecem não apresentar mutações do *BRAF*, muito embora os dados permaneçam controversos.^{69, 74} É também importante notar que, conforme a maioria dos dados reportados para outros tipos tumorais, a mutação c.-146:C>T foi a mais prevalente do que a c.-124:C>T.¹³⁰ Novos estudos são necessários para estabelecer se essa observação possui algum significado biológico nos TCGT.

Em nossa série, a frequência do alelo C do SNP rs2853669 na região promotora do TERT (22,8%) foi similar àquela encontrada em mais do que 1000 genomas depositados em base de dados (30,0%).¹³¹ Em nosso trabalho, dois dos casos mutados não puderam ser analisados e os outros dois mostraram-se homozigotos para o alelo T, o genótipo mais frequente. Embora esse polimorfismo possa agir como um modificador do efeito da mutação nos *hotspots* da região promotora do *TERT* quanto a sobrevivência; como é visto em câncer de bexiga e carcinoma de células renais^{85, 86}; nosso estudo identificou poucos casos mutados, o que inviabilizou encontrar significância em qualquer análise deste tipo. Apesar disso, observando a nossa série como um

todo, os portadores da variante C do SNP rs2853669, parecem ter um melhor desfecho clínico. Novos estudos em uma coorte maior seriam necessários para testar esta hipótese.

A imortalização da célula é um marco fundamental do câncer que está associado com a manutenção anormal do tamanho dos telômeros.⁷⁶ O tamanho do telômero é principalmente controlado pela atividade da telomerase e sua reativação anormal é relatada em até 90% dos tumores humanos. Apenas recentemente, Huang et al.⁷⁸ e Horn et al.⁸¹ mostraram que as mutações na região promotora do gene *TERT*, nomeadas como mutações c.-146:C>T e c.-124:C>T, geravam um novo sítio de ligação para o fator de transcrição ETS/TCFs (CCGGAA), levando ao aumento de duas a quatro vezes a atividade promotora do *TERT*. A baixa frequência desta mutação observada em nosso estudo, levanta a hipótese de que outras vias podem estar envolvidas na regulação do telômero nos TCGT. É relatado que a ativação da telomerase pode ser mediada pelo ligante de *Kit* na espermatogônia em proliferação e nas células germinativas primordiais, mas não há atividade da telomerase nos espermatozoides¹³² A atividade da telomerase não tem sido identificada em teratomas maduros, enquanto está presente em outras histologias como seminoma, carcinoma embrionário, tumores mistos; como nosso terceiro caso mutado; e marcadamente nos teratomas imaturos.⁸⁷ Em nosso terceiro caso mutado com histologia mista (teratoma imaturo e tumor do seio endodérmico - caso 3, Tabela 3), não foi possível realizar microdissecção para avaliar ambos os componentes separadamente, dificultando o entendimento se a mutação está em ambos os componentes ou em apenas um deles. Esses achados estão em acordo com estudos de expressão gênica do *TERT* em TCGT.¹³³ Embora TCGT não-seminoma possuam fragmentos de restrição teloméricos mais longos que os seminomas, a atividade da telomerase parece ser similar em ambos os grupos e outros fatores ainda não conhecidos podem ter um papel neste contexto.⁸⁸ Por fim, o alongamento alternativo dos telômeros (ATL) é um mecanismo bem conhecido, envolvido na imortalização não-dependente de telomerase da célula cancerosa, mas o seu papel em TCGT ainda não foi explorado.¹³⁴

6.3 Expressão da ADAMTS-1 e microdensidade vascular nos TCGT

Nós descrevemos pela primeira vez em TCGT uma alta frequência da expressão de ADAMTS-1 (63,5%), e esta foi associada significativamente a altos níveis de expressão desta mesma proteína no estroma testicular circunjacente ao tumor ($p=0,001$). Nosso único caso de teratoma maduro e 83% dos tumores mistos que continham teratoma maduro apresentaram uma alta expressão de ADAMTS-1, o que está em concordância com os níveis consistentes de expressão gênica de ADAMTS-1 nos teratomas, visto *in silico* através do banco de dados do Oncomine (disponível em www.oncomine.com) (Figura 4), utilizando os dados do estudo de Korkola et al.⁴⁶ Uma frequência de aproximadamente 40% de expressão de ADAMTS-1 tem sido relatada em tumores de mama.¹³⁵ A avaliação imunohistoquímica de ADAMTS-1 em tumores de mama tem revelado que tumores com maiores estadiamentos e maior grau de malignidade, possuem uma menor marcação do estroma e, além disso, demonstraram uma concordância entre as células do estroma e as células tumorais, como visto em nossos resultados.¹³⁶ Recentemente, em um estudo de carcinoma coloretal, também se observou uma alta expressão de ADAMTS-1 por células do estroma e supõem-se que esta seja uma tentativa de parar a progressão do câncer por inibição da angiogênese. Em contrapartida, Tyan et al.¹³⁷ estudaram uma co-cultura de câncer de mama e mostraram que fibroblastos associados ao tecido normal da mama ganharam a capacidade de promover a invasão do câncer com a sobre-regulação da expressão de ADAMTS-1 e isso poderia ser mediado por mecanismos epigenéticos. Adicionalmente, um estudo demonstrou que a presença de ADAMTS-1 *in vitro* não afetou a proliferação, invasão e migração celular e tampouco a angiogênese.¹³⁸ Entretanto, a presença da ADAMTS-1 em um ensaio *in vivo* do mesmo estudo, promoveu o crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes. Estes dados divergentes talvez possam ser explicados pelo estudo de Liu et al.¹³⁹ que utilizaram modelos murinos de câncer de mama e pulmão. Os autores demonstraram que é possível obter uma atividade pró- ou anti-metastática de ADAMTS-1. Sugere-se que sua forma clivada nos fragmentos NTF e CTF, possui atividade antitumoral através dos motivos trombospondina, ao contrário de sua forma não clivada que os mantém ocultos. Outro argumento está no papel de substratos específicos de ADAMTS-1 no microambiente tumoral, como os nidogênios, onde sua degradação pela atividade de ADAMTS-1, poderia levar a uma modificação das estruturas vasculares tumorais, mas quando

inibida, traria efeito contrário.¹⁴⁰ Nossos dois casos de histologia mais agressiva (coriocarcinoma) também tiveram baixa imunocoloração para ADAMTS-1 e nossos dados sugerem que o estroma também pode ter um papel na regulação dos TCGT, mas os mecanismos envolvidos neste processo ainda precisam ser elucidados.

Embora, diferença significativa não tenha sido observada entre os estratos de risco dos TCGT e a expressão de ADAMTS-1, é importante notar que mais de 65% dos nossos casos de baixo risco conforme IGCCCG, estão associados a alto escore de imunocoloração de ADAMTS-1 versus 35% para baixo escore. Situação similar é vista para o risco intermediário, entretanto esta diferença se inverte no alto risco. Isso vai de encontro com os dados que sugerem que ADAMTS-1 é um fator de proteção, mas quando menos expressas nas células estromais, possuem pior prognóstico.

Nós observamos uma média de 20 vasos nas nossas amostras estudadas para MDV. Em carcinomas de mama invasivo localizado, esta média está em torno de 45, mas quando considera-se a doença metastática, ela sobe para em torno de 100.¹⁰⁸ Considerando que a nossa amostra é composta na sua maioria por doença metastática, a MDV encontrada parece estar abaixo do esperado. Contudo, a frequência de expressão da ADAMTS-1 na nossa amostra é relativamente alta, sendo bem conhecida a relação inversa da expressão da ADAMTS-1 e angiogênese. Embora não encontrássemos uma associação da MDV com o escore de imunocoloração da ADAMTS-1, quase 68% dos casos de alto escore da ADAMTS-1 estiveram associados a baixa MDV. É possível que em uma casuística maior e menos heterogênea seja observado melhor esta diferença.

Todavia, nossa amostra foi representativa, já que variáveis conhecidas na literatura por estarem associadas a desfechos clínicos como marcadores séricos, estágio, quimiosensibilidade e risco pelo IGCCCG, foram encontradas associadas à sobrevida livre de eventos e sobrevida global na nossa casuística (Tabela 7), embora não tenha sido observada uma associação significativa dos níveis de expressão de ADAMTS-1 com desfechos clínicos de interesse. Novos estudos do microambiente tumoral, substratos da ADAMTS-1 e de outros reguladores dessa molécula são necessários para definir seu real papel nos TCGT.

6.4 Limitações do estudo

Este estudo é uma análise retrospectiva e, dessa forma, possui um viés de seleção inerente ao delineamento proposto. Entretanto, nossos dados são consistentes com os achados de outros estudos que mostram MSI e mutação do *BRAF* ausentes em TCGT. Nossa série é bastante heterogênea e representada por vários tipos de histologias de TCGT, estádios clínicos e resposta à quimioterapia. Houve uma predominância de não-seminomas com doença avançada, o que difere da literatura clássica, onde os seminomas são mais representativos e doença restrita ao testículo é aquela mais frequente. Nossos casos tiveram uma predominância de tumores mistos, em acordo com a frequência descrita na literatura. Entretanto isso impõe um desafio, já que nem sempre é possível segregar as diversas histologias para uma análise separada da biologia molecular das mesmas, muito embora não haja implicações clínicas evidentes de distribuições histológicas específicas nos tumores mistos, associadas a desfechos clínicos na doença avançada. Outro aspecto importante está relacionado às limitações técnicas da leitura e gradação da expressão proteica nas lâminas imunocoradas, já que existe uma subjetividade inerente nos resultados do escore semi-quantitativo. Também, a contagem de vasos para avaliação da microdensidade vascular possui limitações técnicas, ainda que tenha sido realizado em duplicata.

O Hospital de Câncer de Barretos é um centro de referência para TCGT e parte do Grupo de Estudos Brasileiro dos Tumores de Células Germinativas da Infância, um consórcio nacional desenvolvido para padronizar a avaliação diagnóstica e o tratamento multidisciplinar dos pacientes com TCG no Brasil.¹⁴³ Este aspecto pode contribuir para o viés de casos mais avançados. Entretanto, vários grupos de risco foram bem representados no estudo.

7 CONCLUSÕES

Em contraste com outros tumores sólidos, MSI e mutação *BRAF V600E* não estão presentes nos TCGT, mesmo nos casos refratários. A mutação da região promotora do *TERT* parece ser um evento raro nos TCGT, mas pudemos mostrar aqui pela primeira vez que ela pode ser um evento molecular em um pequeno grupo (2,9%) de casos. Não foi possível estabelecer um valor prognóstico de ADAMTS-1 nos TCGT, mas assim como em outros tumores, o estroma parece ter algum papel na regulação do microambiente tumoral através da expressão da ADAMTS-1.

Novos estudos são necessários para estender e validar estes achados. Também, é necessário alvejar outras vias e explorar outros aspectos da genética, epigenética e microambiente dos TCGT, para melhor entender sua biologia e permitir identificar novos biomarcadores teranósticos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. [Internet] 2016 [cited 24 Mar 2016]; Available from: <http://www.who.int/>.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. *GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase*. 2013(11).
3. INCA. *Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil 2016*. Available from: <http://www.inca.gov.br/>.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016*. **CA Cancer J Clin**. 2016;66(1):7-30.
5. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse S, et al. *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Cancer Statistics Review, 1975–2011*. Bethesda, Md: **National Institutes of Health, National Cancer Institute doi**. 2011;10.
6. Li C, Ekwueme DU, Rim SH, Tangka FK. *Years of potential life lost and productivity losses from male urogenital cancer deaths--United States, 2004*. **Urology**. 2010;76(3):528-35.
7. Kamel MH, Moore PC, Bissada NK, Heshmat SM. *Potential Years of Life Lost Due to Urogenital Cancer in the United States: Trends From 1972 to 2006 Based on Data From the SEER Database*. **J Urol**. 2012;187(3):868-71.
8. Einhorn LH. *Treatment of testicular cancer: a new and improved model*. **J Clin Oncol**. 1990;8(11):1777-81.
9. Einhorn LH. *Curing metastatic testicular cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99(7):4592-5.
10. Trama A, Mallone S, Nicolai N, Necchi A, Schaapveld M, Gietema J, et al. *Burden of testicular, paratesticular and extragonadal germ cell tumours in Europe*. **Eur J Cancer**. 2012;48(2):159-69.
11. Ko JJ, Bernard B, Tran B, Li H, Asif T, Stukalin I, et al. *Conditional Survival of Patients With Metastatic Testicular Germ Cell Tumors Treated With First-Line Curative Therapy*. **J Clin Oncol**. 2016;34(7):714-20.
12. Gilligan TD, Seidenfeld J, Basch EM, Einhorn LH, Fancher T, Smith DC, 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):3388-404.

13. Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Moller H. *Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence*. **Nat Clin Pract Urol**. 2006;3(10):532-43.
14. Boublikova L, Buchler T, Stary J, Abrahamova J, Trka J. *Molecular biology of testicular germ cell tumors: Unique features awaiting clinical application*. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2014;89(3):366-85.
15. Oosterhuis JW, Looijenga LH. *Testicular germ-cell tumours in a broader perspective*. **Nat Rev Cancer**. 2005;5(3):210-22.
16. WHO, IARC. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 4 ed. **Geneva: WHO Press**; 2016.
17. Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bartek J, et al. *The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell*. **APMIS**. 2003;111(1):267-78; discussion 78-9.
18. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. *Molecular genetics of testicular germ cell tumors*. **Am J Cancer Res**. 2012;2(2):153-67.
19. Oosterhuis JW, Kersemaekers AM, Jacobsen GK, Timmer A, Steyerberg EW, Molier M, et al. *Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report*. **APMIS**. 2003;111(1):32-40; discussion 1-2.
20. Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. *Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance*. **Int J Androl**. 2011;34(4 Pt 2):e234-51.
21. Kufe DW, Holland JF, Frei E, American Cancer Society. *Cancer medicine 7*. 6th ed. **Hamilton, Ont.: B.C. Decker**; 2006.
22. Bosl GJ, Vogelzang NJ, Goldman A, Fraley EE, Lange PH, Levitt SH, et al. *Impact of delay in diagnosis on clinical stage of testicular cancer*. **Lancet**. 1981;2(8253):970-3.
23. McKendrick JJ, Theaker J, Mead GM. *Nonseminomatous germ cell tumor with very high serum human chorionic gonadotropin*. **Cancer**. 1991;67(3):684-9.
24. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK. *AJCC Cancer Staging Atlas: A Companion to the Seventh Editions of the AJCC Cancer Staging Manual and Handbook*: **Springer**; 2012.
25. NCI. *SEER Stat Fact Sheets: Testis Cancer*. [Internet]: NCI; 2016 [cited 05/Apr/2016]; Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/testis.html>.

26. Oldenburg J, Fossa SD, Nuver J, Heidenreich A, Schmoll HJ, Bokemeyer C, et al. *Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. **Ann Oncol**. 2013;24 Suppl 6:vi125-32.
27. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles & practice of oncology*. 9th ed. **Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins**; 2011. lxxv, 2898 p. p.
28. Freedman LS, Parkinson MC, Jones WG, Oliver RT, Peckham MJ, Read G, et al. *Histopathology in the prediction of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone*. **Lancet**. 1987;2(8554):294-8.
29. Talerman A, Haije WG, Baggerman L. *Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites: correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP*. **Cancer**. 1980;46(2):380-5.
30. Alvarado-Cabrero I, Hernandez-Toriz N, Paner GP. *Clinicopathologic analysis of choriocarcinoma as a pure or predominant component of germ cell tumor of the testis*. **Am J Surg Pathol**. 2014;38(1):111-8.
31. IGCCCG. *International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers*. *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*. **J Clin Oncol**. 1997;15(2):594-603.
32. Fizazi K, Culine S, Kramar A, Amato RJ, Bouzy J, Chen I, et al. *Early predicted time to normalization of tumor markers predicts outcome in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors*. **J Clin Oncol**. 2004;22(19):3868-76.
33. Lorch A, Beyer J, Bascoul-Mollevis C, Kramar A, Einhorn LH, Necchi A, et al. *Prognostic factors in patients with metastatic germ cell tumors who experienced treatment failure with cisplatin-based first-line chemotherapy*. **J Clin Oncol**. 2010;28(33):4906-11.
34. Fedyanin M, Tryakin A, Bulanov A, Fainshtein I, Zakharova T, Matveev V, et al. *Effect of the timing of orchidectomy on survival in patients with metastatic germ cell tumors of testis*. **Urol Oncol**. 2014;32(1):32 e27-33.
35. Higby DJ, Wallace HJ, Jr., Albert DJ, Holland JF. *Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors*. **Cancer**. 1974;33(5):1219-5.
36. Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. *Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide*. **N Engl J Med**. 1987;316(23):1435-40.

37. Warde P, Specht L, Horwich A, Oliver T, Panzarella T, Gospodarowicz M, et al. *Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis.* **J Clin Oncol.** 2002;20(22):4448-52.
38. Sweeney CJ, Hermans BP, Heilman DK, Foster RS, Donohue JP, Einhorn LH. *Results and outcome of retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I embryonal carcinoma--predominant testis cancer.* **J Clin Oncol.** 2000;18(2):358-62.
39. Motzer RJ, Agarwal N, Beard C, Bhayani S, Bolger GB, Buyyounouski MK, et al. *Testicular Cancer.* **Journal of the National Comprehensive Cancer Network.** 2012;10(4):502-35.
40. Fox EP, Weathers TD, Williams SD, Loehrer PJ, Ulbright TM, Donohue JP, et al. *Outcome analysis for patients with persistent nonteratomatous germ cell tumor in postchemotherapy retroperitoneal lymph node dissections.* **J Clin Oncol.** 1993;11(7):1294-9.
41. O'Carrigan B, Grimison P. *Current chemotherapeutic approaches for recurrent or refractory germ cell tumors.* **Urol Oncol.** 2015;33(8):343-54.
42. Popovic L, Matovina-Brko G, Popovic M, Petrovic D, Cvetanovic A, Vukojevic J, et al. *High dose chemotherapy with stem cell support in the treatment of testicular cancer.* **World J Stem Cells.** 2015;7(11):1222-32.
43. Pico JL, Rosti G, Kramar A, Wandt H, Koza V, Salvioni R, et al. *A randomised trial of high-dose chemotherapy in the salvage treatment of patients failing first-line platinum chemotherapy for advanced germ cell tumours.* **Ann Oncol.** 2005;16(7):1152-9.
44. Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW. *Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis.* **Ann N Y Acad Sci.** 2007;1120:187-214.
45. Atkin NB, Baker MC. *Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours?* **Lancet.** 1982;2(8311):1349.
46. Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, et al. *Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors.* **Cancer Res.** 2006;66(2):820-7.
47. Korkola JE, Houldsworth J, Bosl GJ, Chaganti RS. *Molecular events in germ cell tumours: linking chromosome-12 gain, acquisition of pluripotency and response to cisplatin.* **BJU Int.** 2009;104(9 Pt B):1334-8.

48. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJ, et al. *Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1.* **Oncogene.** 2003;22(12):1880-91.
49. Bignell G, Smith R, Hunter C, Stephens P, Davies H, Greenman C, et al. *Sequence analysis of the protein kinase gene family in human testicular germ-cell tumors of adolescents and adults.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2006;45(1):42-6.
50. Houldsworth J, Korkola JE, Bosl GJ, Chaganti RS. *Biology and genetics of adult male germ cell tumors.* **J Clin Oncol.** 2006;24(35):5512-8.
51. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, 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.
52. Kinzler KW, Vogelstein B. *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.* **Nature.** 1997;386(6627):761, 3.
53. Imai K, Yamamoto H. *Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics.* **Carcinogenesis.** 2008;29(4):673-80.
54. Shah SN, Hile SE, Eckert KA. *Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes.* **Cancer Res.** 2010;70(2):431-5.
55. Lindahl T, Wood RD. *Quality control by DNA repair.* **Science.** 1999;286(5446):1897-905.
56. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. *Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes.* **Microbiol Mol Biol Rev.** 2008;72(4):686-727.
57. Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. *Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999;96(18):10296-301.
58. Kinzler KW, Vogelstein B. *Lessons from hereditary colorectal cancer.* **Cell.** 1996;87(2):159-70.
59. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, et al. *[Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers].* **Bull Cancer.** 2008;95(1):121-32.
60. Gryfe R. *Inherited colorectal cancer syndromes.* **Clin Colon Rectal Surg.** 2009;22(4):198-208.
61. Goecke T, Schulmann K, Engel C, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Schackert HK, et al. *Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected*

- with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. **J Clin Oncol.** 2006;24(26):4285-92.
62. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency.* **N Engl J Med.** 2015;372(26):2509-20.
63. Lee V, Le DT. *Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency.* **Immunotherapy.** 2016;8(1):1-3.
64. Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, et al. *Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells.* **Int J Cancer.** 2001;93(1):12-9.
65. Kolch W. *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.* **The Biochemical journal.** 2000;351 Pt 2:289-305.
66. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status.* **Nature.** 2002;418(6901):934.
67. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. *BRAF(E600) in benign and malignant human tumours.* **Oncogene.** 2008;27(7):877-95.
68. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.* **The New England journal of medicine.** 2011;364(26):2507-16.
69. Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJ, Stoop H, van Gurp RJ, et al. *Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors.* **J Clin Oncol.** 2009;27(13):2129-36.
70. Huddart RA, Wooster R, Horwich A, Cooper CS. *Microsatellite instability in human testicular germ cell tumours.* **Br J Cancer.** 1995;72(3):642-5.
71. Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. *Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment.* **Cancer Res.** 2002;62(10):2758-60.
72. Velasco A, Riquelme E, Schultz M, Wistuba, II, Villarroel L, Pizarro J, et al. *Mismatch repair gene expression and genetic instability in testicular germ cell tumor.* **Cancer Biol Ther.** 2004;3(10):977-82.
73. Velasco A, Corvalan A, Wistuba, II, Riquelme E, Chuaqui R, Majerson A, et al. *Mismatch repair expression in testicular cancer predicts recurrence and survival.* **Int J Cancer.** 2008;122(8):1774-7.

74. Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, et al. *Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours.* **Int J Cancer.** 2005;113(2):329-35.
75. Masque-Soler N, Szczepanowski M, Leuschner I, Vokuhl C, Haag J, Calaminus G, et al. *Absence of BRAF mutation in pediatric and adolescent germ cell tumors indicate biological differences to adult tumors.* **Pediatr Blood Cancer.** 2011.
76. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.
77. Shammass MA. *Telomeres, lifestyle, cancer, and aging.* **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2011;14(1):28-34.
78. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. *Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma.* **Science.** 2013;339(6122):957-9.
79. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. *Frequency of TERT promoter mutations in human cancers.* **Nat Commun.** 2013;4:2185.
80. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013;110(15):6021-6.
81. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. *TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma.* **Science.** 2013;339(6122):959-61.
82. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. *Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer.* **Science.** 2015;348(6238):1036-9.
83. Bae JS, Kim Y, Jeon S, Kim SH, Kim TJ, Lee S, et al. *Clinical utility of TERT promoter mutations and ALK rearrangement in thyroid cancer patients with a high prevalence of the BRAF V600E mutation.* **Diagn Pathol.** 2016;11(1):21.
84. Park CK, Lee SH, Kim JY, Kim JE, Kim TM, Lee ST, et al. *Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma.* **Oncotarget.** 2014;5(10):3399-407.
85. Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, et al. *TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013;110(43):17426-31.

86. Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, Sitaram RT, Ljungberg B, Roos G, et al. *TERT promoter mutations in clear cell renal cell carcinoma*. **Int J Cancer**. 2014.
87. Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, et al. *Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas*. **J Natl Cancer Inst**. 1999;91(15):1321-6.
88. Nowak R, Sikora K, Pietas A, Skoneczna I, Chrapusta SJ. *Germ cell-like telomeric length homeostasis in nonseminomatous testicular germ cell tumors*. **Oncogene**. 2000;19(35):4075-8.
89. Turnbull C, Rahman N. *Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour*. **Int J Androl**. 2011;34(4 Pt 2):e86-96; discussion e-7.
90. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. *TERT Promoter Mutations and Their Association with BRAF V600E Mutation and Aggressive Clinicopathological Characteristics of Thyroid Cancer*. **J Clin Endocrinol Metab**. 2014:jc20134048.
91. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, et al. *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins*. **Nucleic Acids Res**. 2011;39(Database issue):D225-9.
92. Pruitt K, Tatusova T, Klimke W, Maglott D. *NCBI Reference Sequences: current status, policy, and new initiatives*. **Nucleic Acids Res**. 2009;37(Database issue):D32-6.
93. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. *Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene*. **J Biol Chem**. 1997;272(1):556-62.
94. Kuno K, Matsushima K. *ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region*. **J Biol Chem**. 1998;273(22):13912-7.
95. Rodriguez-Manzaneque JC, Fernandez-Rodriguez R, Rodriguez-Baena FJ, Iruela-Arispe ML. *ADAMTS proteases in vascular biology*. **Matrix Biol**. 2015;44-46:38-45.
96. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD. *Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats*. **Circulation**. 1999;100(13):1423-31.
97. Porter S, Span PN, Sweep FC, Tjan-Heijnen VC, Pennington CJ, Pedersen TX, et al. *ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma*. **Int J Cancer**. 2006;118(5):1241-7.
98. Liu Y, Yasukawa M, Chen K, Hu L, Broaddus RR, Ding L, et al. *Association of Somatic Mutations of ADAMTS Genes With Chemotherapy Sensitivity and Survival in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma*. **JAMA Oncol**. 2015;1(4):486-94.

99. Silvan U, Diez-Torre A, Bonilla Z, Moreno P, Diaz-Nunez M, Arechaga J. *Vasculogenesis and angiogenesis in nonseminomatous testicular germ cell tumors*. **Urol Oncol**. 2015;33(6):268 e17-28.
100. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. **Cell**. 2000;100(1):57-70.
101. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines*. **ALTEX**. 2005;22(2):103-9.
102. Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, et al. *Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas*. **Br J Cancer**. 2009;101(6):973-82.
103. Martinho O, Gouveia A, Viana-Pereira M, Silva P, Pimenta A, Reis RM, et al. *Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs*. **Histopathology**. 2009;55(1):53-62.
104. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, et al. *KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy*. **Oncol Rep**. 2014;32(4):1419-26.
105. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, et al. *Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation*. **PLoS One**. 2011;6(5):e20588.
106. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers*. **Eur J Hum Genet**. 2014;22(7):875-80.
107. Basto D, Trovisco V, Lopes JM, Martins A, Pardal F, Soares P, et al. *Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas*. **Acta neuropathologica**. 2005;109(2):207-10.
108. Weidner N. *Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors*. **Breast Cancer Res Treat**. 1995;36(2):169-80.
109. Lothe RA, Peltomaki P, Tommerup N, Fossa SD, Stenwig AE, Borresen AL, et al. *Molecular genetic changes in human male germ cell tumors*. **Lab Invest**. 1995;73(5):606-14.
110. Faulkner SW, Friedlander ML. *Microsatellite instability in germ cell tumors of the testis and ovary*. **Gynecol Oncol**. 2000;79(1):38-43.

111. Olasz J, Mandoky L, Geczi L, Bodrogi I, Csuka O, Bak M. *Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors.* **Anticancer Res.** 2005;25(6B):4319-24.
112. Vladusic T, Hrascan R, Kruslin B, Pecina-Slaus N, Perica K, Bicanic A, et al. *Histological groups of human postpubertal testicular germ cell tumours harbour different genetic alterations.* **Anticancer Res.** 2014;34(8):4005-12.
113. Mayer F, Wermann H, Albers P, Stoop H, Gillis AJ, Hartmann JT, et al. *Histopathological and molecular features of late relapses in non-seminomas.* **BJU Int.** 2011;107(6):936-43.
114. Devaraj B, Lee A, Cabrera BL, Miyai K, Luo L, Ramamoorthy S, et al. *Relationship of EMAST and microsatellite instability among patients with rectal cancer.* **J Gastrointest Surg.** 2010;14(10):1521-8.
115. Carethers JM, Koi M, Tseng-Rogenski SS. *EMAST is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression.* **Genes (Basel).** 2015;6(2):185-205.
116. Campanella NC, Penna V, Ribeiro G, Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C, Reis RM. *Absence of Microsatellite Instability In Soft Tissue Sarcomas.* **Pathobiology.** 2015;82(1):36-42.
117. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer.* **Cancer Res.** 1998;58(22):5248-57.
118. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. *Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis.* **Dis Markers.** 2004;20(4-5):251-7.
119. J. M. Piulats MN, M. Martinez-Iniesta, S. Puertas, S. Gonzalez, A. Vidal, E. Condom, J. Germa-Lluch, X. Garcia Del Muro, A. Villanueva. *Nude mice model of primary human nonseminoma germ cell tumors to study biology and resistance to cisplatin treatment.* In: **2009 ASCO Annual Meeting**; Orlando, FL; 2009. 27((suppl; abstr e16143)).
120. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. *Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors.* **Neoplasia.** 2005;7(12):1047-52.
121. J. M. Piulats AV, A. Villanueva, C. Muñoz, A. Pisa, M. Nadal, J. R. Germa-Lluch, E. Condom, X. Garcia del Muro. *MLH1 and BRAF status analysis in metastatic germ cell tumors.* In: **2010 ASCO Annual Meeting**; Chicago, IL; 2010. **J Clin Oncol.** 28((suppl; abstr e15092)).

122. Satpute SR, Koster R, Nathanson KL, Vaughn DJ, Albany C, Einhorn LH, et al. *Retrospective, correlative study of BRAF mutation V600E in testicular cancer patients*. In: **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**; 2013. **AMER SOC CLINICAL ONCOLOGY 2318 MILL ROAD, STE 800, ALEXANDRIA, VA 22314 USA**. 31(15).
123. Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, et al. *Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(14):3712-20.
124. de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, Hersmus R, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, et al. *Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2*. **Genes Chromosomes Cancer**. 2008;47(3):185-96.
125. Goddard NC, McIntyre A, Gilbert D, Kitazawa S, Shipley J. *No evidence for V600E BRAF mutation in the seminoma cell line TCam-2*. **Genes Chromosomes Cancer**. 2010;49(10):963-6.
126. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. *High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions*. **Nat Commun**. 2013;4:2218.
127. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. *TERT promoter mutations in cancer development*. **Curr Opin Genet Dev**. 2014;24c:30-7.
128. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. *TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas*. **J Clin Endocrinol Metab**. 2014;99(5):E754-65.
129. Populo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. *TERT Promoter Mutations in Skin Cancer: The Effects of Sun Exposure and X-Irradiation*. **J Invest Dermatol**. 2014.
130. Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Populo H, Boaventura P, et al. *Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker?* **Virchows Arch**. 2014;465(2):119-33.
131. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. **Nature**. 2012;491(7422):56-65.
132. Dolci S, Levati L, Pellegrini M, Faraoni I, Graziani G, Di Carlo A, et al. *Stem cell factor activates telomerase in mouse mitotic spermatogonia and in primordial germ cells*. **J Cell Sci**. 2002;115(Pt 8):1643-9.
133. Schrader M, Burger AM, Muller M, Krause H, Straub B, Smith GL, et al. *Quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in testicular germ cell tumors by quantitative fluorescence real-time RT-PCR*. **Oncol Rep**. 2002;9(5):1097-105.

134. Cesare AJ, Reddel RR. *Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications*. **Nat Rev Genet**. 2010;11(5):319-30.
135. Lu X, Wang Q, Hu G, Van Poznak C, Fleisher M, Reiss M, et al. *ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis*. **Genes Dev**. 2009;23(16):1882-94.
136. Freitas VM, do Amaral JB, Silva TA, Santos ES, Mangone FR, Pinheiro Jde J, et al. *Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion*. **Mol Cancer**. 2013;12:2.
137. Tyan SW, Hsu CH, Peng KL, Chen CC, Kuo WH, Lee EY, et al. *Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change*. **PLoS One**. 2012;7(4):e35128.
138. Rocks N, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Munaut C, Gonzalez ML, Gueders M, et al. *ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo*. **Cancer Res**. 2008;68(22):9541-50.
139. Liu YJ, Xu Y, Yu Q. *Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively*. **Oncogene**. 2006;25(17):2452-67.
140. Martino-Echarri E, Fernandez-Rodriguez R, Rodriguez-Baena FJ, Barrientos-Duran A, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge Mdel C, et al. *Contribution of ADAMTS1 as a tumor suppressor gene in human breast carcinoma. Linking its tumor inhibitory properties to its proteolytic activity on nidogen-1 and nidogen-2*. **Int J Cancer**. 2013;133(10):2315-24.
141. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. *Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001;98(22):12485-90.
142. Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. *ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165*. **J Biol Chem**. 2003;278(26):23656-65.
143. Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellaro MJ, Melaragno R, et al. *Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91*. **J Clin Oncol**. 2009;27(8):1297-303.

ANEXOS

Anexo A – Estádio do tumor de testículo conforme o AJCC.

CLINICAL <i>Extent of disease before any treatment</i>	STAGE CATEGORY DEFINITIONS	PATHOLOGIC <i>Extent of disease through completion of definitive surgery</i>
<input type="checkbox"/> y clinical – staging completed after neoadjuvant therapy but before subsequent surgery	TUMOR SIZE: _____ LATERALITY: <input type="checkbox"/> left <input type="checkbox"/> right <input type="checkbox"/> bilateral	<input type="checkbox"/> y pathologic – staging completed after neoadjuvant therapy AND subsequent surgery
<p>pTX</p> <p>pT0</p> <p>pTis</p> <p>pT1</p> <p>pT2</p> <p>pT3</p> <p>pT4</p>	<p style="text-align: center;">PRIMARY TUMOR (T)</p> <p>The extent of primary tumor is usually classified after radical orchiectomy and, for this reason, a <i>pathologic</i> stage is assigned.</p> <p>pTX Primary tumor cannot be assessed</p> <p>pT0 No evidence of primary tumor (e.g., histologic scar in testis)</p> <p>pTis Intratubular germ cell neoplasia (carcinoma <i>in situ</i>)</p> <p>pT1 Tumor limited to the testis and epididymis without vascular/lymphatic invasion; tumor may invade into the tunica albuginea but not the tunica vaginalis</p> <p>pT2 Tumor limited to the testis and epididymis with vascular/lymphatic invasion, or tumor extending through the tunica albuginea with involvement of the tunica vaginalis</p> <p>pT3 Tumor invades the spermatic cord with or without vascular/lymphatic invasion</p> <p>pT4 Tumor invades the scrotum with or without vascular/lymphatic invasion</p> <p>* Except for pTis and pT4, extent of primary tumor is classified by radical orchiectomy. TX may be used for other categories in the absence of radical orchiectomy.</p>	<p><input type="checkbox"/> pTX</p> <p><input type="checkbox"/> pT0</p> <p><input type="checkbox"/> pTis</p> <p><input type="checkbox"/> pT1</p> <p><input type="checkbox"/> pT2</p> <p><input type="checkbox"/> pT3</p> <p><input type="checkbox"/> pT4</p>
<p><input type="checkbox"/> NX</p> <p><input type="checkbox"/> N0</p> <p><input type="checkbox"/> N1</p> <p>pN1</p> <p><input type="checkbox"/> N2</p> <p><input type="checkbox"/> pN2</p> <p><input type="checkbox"/> N3</p> <p><input type="checkbox"/> pN3</p>	<p style="text-align: center;">REGIONAL LYMPH NODES (N)</p> <p>Regional lymph nodes cannot be assessed</p> <p>N0 No regional lymph node metastasis</p> <p>N1 Metastasis with a lymph node mass 2 cm or less in greatest dimension; or multiple lymph nodes, none more than 2 cm in greatest dimension</p> <p>pN1 Metastasis with a lymph node mass 2 cm or less in greatest dimension and less than or equal to 5 nodes positive, none more than 2 cm in greatest dimension</p> <p>N2 Metastasis with a lymph node mass more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension; or multiple lymph nodes, any one mass greater than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension</p> <p>pN2 Metastasis with a lymph node mass more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension; or more than 5 nodes positive, none more than 5 cm; or evidence of extranodal extension of tumor</p> <p>N3 Metastasis with a lymph node mass more than 5 cm in greatest dimension</p> <p>pN3 Metastasis with a lymph node mass more than 5 cm in greatest dimension</p>	<p><input type="checkbox"/> NX</p> <p><input type="checkbox"/> N0</p> <p><input type="checkbox"/> N1</p> <p><input type="checkbox"/> pN1</p> <p><input type="checkbox"/> pN2</p> <p><input type="checkbox"/> pN3</p>
<p><input type="checkbox"/> M0</p> <p><input type="checkbox"/> M1</p> <p><input type="checkbox"/> M1a</p> <p><input type="checkbox"/> M1b</p>	<p style="text-align: center;">DISTANT METASTASIS (M)</p> <p>M0 No distant metastasis</p> <p>M1 Distant metastasis</p> <p>M1a No regional nodal or pulmonary metastasis</p> <p>M1b Distant metastasis other than to non-regional lymph nodes and lung</p>	<p><input type="checkbox"/> M1</p> <p><input type="checkbox"/> M1a</p> <p><input type="checkbox"/> M1b</p>

ANATOMIC STAGE • PROGNOSTIC GROUPS									
		CLINICAL			PATHOLOGIC				
GROUP	T	N	M	S (serum tumor markers)	GROUP	T	N	M	S (serum tumor markers)
<input type="checkbox"/> 0	pTis	N0	M0	S0	<input type="checkbox"/> 0	pTis	N0	M0	S0
<input type="checkbox"/> I	pT1-4	N0	M0	SX	<input type="checkbox"/> I	pT1-4	N0	M0	SX
<input type="checkbox"/> IA	pT1	N0	M0	S0	<input type="checkbox"/> IA	pT1	N0	M0	S0
<input type="checkbox"/> IB	pT2	N0	M0	S0	<input type="checkbox"/> IB	pT2	N0	M0	S0
	pT3	N0	M0	S0		pT3	N0	M0	S0
	pT4	N0	M0	S0		pT4	N0	M0	S0
<input type="checkbox"/> IS	Any pT/Tx	N0	M0	S1-3 (post orchiectomy)	<input type="checkbox"/> IS	Any pT/Tx	N0	M0	S1-3 (post orchiectomy)
<input type="checkbox"/> II	Any pT/Tx	N1-3	M0	SX	<input type="checkbox"/> II	Any pT/Tx	N1-3	M0	SX
<input type="checkbox"/> IIA	Any pT/Tx	N1	M0	S0	<input type="checkbox"/> IIA	Any pT/Tx	N1	M0	S0
	Any pT/Tx	N1	M0	S1		Any pT/Tx	N1	M0	S1
<input type="checkbox"/> IIB	Any pT/Tx	N2	M0	S0	<input type="checkbox"/> IIB	Any pT/Tx	N2	M0	S0
	Any pT/Tx	N2	M0	S1		Any pT/Tx	N2	M0	S1
<input type="checkbox"/> IIC	Any pT/Tx	N3	M0	S0	<input type="checkbox"/> IIC	Any pT/Tx	N3	M0	S0
	Any pT/Tx	N3	M0	S1		Any pT/Tx	N3	M0	S1
<input type="checkbox"/> III	Any pT/Tx	Any N	M1	SX	<input type="checkbox"/> III	Any pT/Tx	Any N	M1	SX
<input type="checkbox"/> IIIA	Any pT/Tx	Any N	M1a	S0	<input type="checkbox"/> IIIA	Any pT/Tx	Any N	M1a	S0
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S1		Any pT/Tx	Any N	M1a	S1
<input type="checkbox"/> IIIB	Any pT/Tx	N1-3	M0	S2	<input type="checkbox"/> IIIB	Any pT/Tx	N1-3	M0	S2
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S2		Any pT/Tx	Any N	M1a	S2
<input type="checkbox"/> IIIC	Any pT/Tx	N1-3	M0	S3	<input type="checkbox"/> IIIC	Any pT/Tx	N1-3	M0	S3
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S3		Any pT/Tx	Any N	M1a	S3
	Any pT/Tx	Any N	M1b	Any S		Any pT/Tx	Any N	M1b	Any S
<input type="checkbox"/> Stage unknown					<input type="checkbox"/> Stage unknown				

PROGNOSTIC FACTORS (SITE-SPECIFIC FACTORS)	
REQUIRED FOR STAGING: Serum Tumor Markers (S)	
SX	Marker studies not available or not performed
S0	Marker study levels within normal limits
S1	LDH < 1.5 X N* AND hCG (mlu/ml) < 5000 AND AFP (ng/ml) < 1000
S2	LDH 1.5-10 x N OR hCG (mlu/ml) 5000-50,000 OR AFP (ng/ml) 1000-10,000
S3	LDH > 10 x N OR hCG (mlu/ml) > 50,000 OR AFP (ng/ml) > 10,000
*N indicates the upper limit of normal for the LDH assay.	
Serum tumor marker levels should be measured prior to orchiectomy for assignment of S category. The only exception is for stage grouping classification of Stage IS in which persistent elevation of serum tumor markers following orchiectomy is required.	
The Serum Tumor Markers (S) category is comprised of the following: Alpha Fetoprotein (AFP) Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Lactate Dehydrogenase (LDH)	
CLINICALLY SIGNIFICANT:	
Size of Largest Metastases in Lymph Nodes: _____	
Radical Orchiectomy Performed: _____	

General Notes: For identification of special cases of TNM or pTNM classifications, the "m" suffix and "y," "r," and "a" prefixes are used. Although they do not affect the stage grouping, they indicate cases needing separate analysis. m suffix indicates the presence of multiple primary tumors in a single site and is recorded in parentheses: pT(m)NM.
--

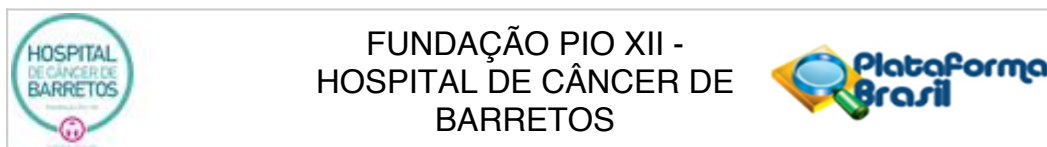
Fonte: American Joint Committee on Cancer.²⁴

Anexo B – Alterações genéticas e epigenéticas nos TCGT.

	TGCT subtype	Alteration (Effect)	Role in TGCT pathogenesis
Chromosomal			
12p	Invasive TGCT; Intratubular seminoma; Intratubular embryonal carcinoma	Gain of 12p, mostly isochromosome 12p (amplification of a cluster of genes, promoting tumor invasion)	1. Most common single genetic event 2. Genetic hallmark of TGCT
Single-gene mutations			
<i>KIT</i>	IGCNU; Seminoma > NSGCT	Activating mutation in the receptor for KITLG (suppressing apoptosis)	1. Most common single gene mutation 2. May be associated with TGCT initiation 3. Mutant tumors responsive to imatinib mesylate
<i>TP53</i>	Seminoma	Inactivating mutation in cell cycle regulator <i>p53</i> (leading to impaired DNA repair and cell cycle dysregulation)	Role in TGCT pathogenesis unclear
<i>KRAS</i>	Seminoma > NSGCT	Activating mutation in a small GTPase (promoting cell proliferation, differentiation, and migration)	<i>KRAS</i> wild type → chemoresistance
<i>NRAS</i>	Seminoma > NSGCT	Same as <i>KRAS</i>	Mutation frequency in NSGCT is controversial
<i>BRAF</i>	Seminoma < NSGCT	Activating mutations in a serine/threonine kinase (promoting cell proliferation and differentiation)	Mutation → chemoresistance
Differentially expressed genes*			
Tumor vs normal	IGCNU	Up-regulated: <i>KITLG</i> , <i>PDPN</i> , <i>ANXA3</i> , <i>C12orf35</i> , <i>DOCK11</i> , <i>IL22RA1</i> , <i>KIT</i> , <i>L1TD1</i> , <i>LIN28A</i> , <i>MYCL1</i> , <i>NANOG</i> , <i>NSMAF</i> , <i>OSBPL3</i> , <i>PLBD1</i> , <i>POU5F1</i> (<i>OCT3/4</i>), <i>SLC25A16</i> , <i>SOX17</i> , <i>TCL6</i> , <i>TFCP2L1</i> , <i>UPP1</i>	
	Seminoma	Upregulated: <i>JUP</i> , <i>CCND2</i> , <i>LZTS1</i> , <i>PIM2</i> , <i>BAX</i> , <i>CACNB3</i> , <i>CCNF</i> , <i>CDC25B</i> , <i>CDH3</i> , <i>ETV1</i> , <i>IL6R</i> , <i>KCNJ8</i> , <i>MMP12</i> , <i>MYCN</i> , <i>OSBPL3</i> , <i>PIM1</i> , <i>SLC43A1</i> , <i>SOX4</i> , <i>TCL1B</i> , <i>TUBB</i> Downregulated: <i>CLU</i>	
Subtype-specific signatures	Seminoma	<i>LZTS1</i>	
	Embryonal carcinoma	<i>DNMT3B</i> , <i>DPPA4</i> , <i>GAL</i> , <i>GPC4</i> , <i>POU5F1</i> , <i>TERF1</i>	
	Yolk sac tumor	<i>AFP</i> , <i>APOA2</i> , <i>B4GALT4</i> , <i>BMP2</i> , <i>C5</i> , <i>CYP26A1</i> , <i>DSCAM</i> , <i>EOMES</i> , <i>FAM89A</i> , <i>FERMT2</i> , <i>FLRT3</i> , <i>FOXA2</i> , <i>LEPREL1</i> , <i>LRRN1</i> , <i>NEK2</i> , <i>NRXN3</i> , <i>OTX2</i> , <i>RAGE</i> , <i>SEBOX</i> , <i>VTN</i>	
	Choriocarcinoma	<i>CGA</i>	
	Teratoma	<i>EMP1</i> , <i>CDH17</i> , <i>MFAP4</i> , <i>NFKBIZ</i> , <i>TSPAN8</i>	
Epigenetic changes			
Global DNA methylation	IGCNU; Seminoma	Low level (Promoter hypomethylation allows gene transcription)	1. Associated with undifferentiated tumors 2. Hypermethylation → chemoresistance
	Embryonal carcinoma	Intermediate level	1. Associated with transformed undifferentiated tumor 2. Hypermethylation → chemoresistance
	Yolk sac tumor; Choriocarcinoma; Teratoma	High level: similar to other solid tumors (Promoter hypermethylation suppresses gene transcription)	1. Associated with more differentiated tumors 2. Hypermethylation → chemoresistance

IGCNU = intratubular germ cell neoplasia unclassified, NSGCT = non-seminomatous germ cell tumor *: Genes in bold fonts are those identified by 3-4 independent studies. Genes in regular fonts are those identified by 2 independent studies.

Fonte: Extraído de Sheikine et al.¹⁸

Anexo C – Cartas do Comitê de Ética em Pesquisa de aprovação do estudo e da emenda**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da Instabilidade Microsatélite, ADAMTS1 e OCT-3/4 nos Tumores de Células Germinativas do Testículo e suas Associações Prognósticas e Preditivas de Resposta nos Pacientes submetidos à Quimioterapia.

Pesquisador: FLAVIO MAVIGNIER CARCANO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12297713.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.070

Data da Relatoria: 10/01/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado, claro e bem estruturado. Faz uma adequada revisão da literatura. Faltou um tópico "Justificativa" para deixar mais evidente os fatores que justifiquem o presente estudo (embora tenha sido descrito na introdução vários aspectos que justifiquem o estudo).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar uma coorte de pacientes com TCG de testículo tratados com quimioterapia nos seguintes aspectos: Níveis de expressão de ADAMTS1. Níveis de expressão de Oct-3/4. Níveis de expressão de MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Presença da Instabilidade Microsatélite. Sobrevida Global. Sobrevida Livre de Progressão. Resposta ao tratamento. Correlação dos achados moleculares com os grupos de risco clínicos já conhecidos. Definir novos fatores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento.

Objetivos são factíveis e estão em acordo com a metodologia proposta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos aos sujeitos de pesquisa: nenhum, pois trata-se de um estudo retrospectivo.

Benefícios: Indiretos, pelo ganho de melhor conhecimento científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Estudo observacional retrospectivo e de epidemiologia molecular dos tumores de células germinativas do testículo. Uma coorte de pacientes com câncer de testículo que foram submetidos a quimioterapia no Hospital de Câncer de Barretos será avaliada através de dados clínicos e moleculares de acordo com os objetivos do estudo.

Etapa 1 - Casos com histologias de TCG serão recuperados aleatoriamente para cada código morfológico do

Biobanco do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos para serem submetidos a análise molecular proposta pelo estudo. Os grupos considerados serão Teratoma Maduro, Teratoma Imaturo, Carcinoma Embrionário, Tumor do seio Endodérmico, Coriocarcinoma, Seminoma/Disgerminoma, Quimiorrefratários e Quimioresponsivos

N= 32 (4 de cada grupo). Etapa 2 - Pacientes com diagnóstico de TCG de testículo tratados com quimioterapia no Hospital de Câncer de Barretos no período de Janeiro de 2001 a Dezembro de 2010. N estimado (200). As análises moleculares serão as mesmas para ambos os grupos. Ou seja, serão utilizados blocos de parafina, confeccionados lâminas de imunohistoquímica convencional. Serão avaliadas as expressões das seguintes proteínas: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, ADAMTS, Oct2/3. Será também extraído DNA para realização de PCR multiplex (análise de microsatélite). Para esta análise será utilizado tecido normal adjacente ao tumor ou sangue periférico se esse estiver disponível. Os autores esclarecem que nesta situação aplicarão TCLE específico. No entanto, este Termo não se encontra entre os documentos enviados ao CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão adequados:

1. MABIN, 2. Declaração de Compromisso do Pesquisador com a Fundação Pio XII, 3. Ciência e Autorização da Patologia (Assinatura Dra Ligia), 4. Ciência e Autorização - CEPON, 5. Ciência e Autorização SAME, 6. Declaração de FOnTe de Financiamento (PAIP e FAPESP - submetido)

Recomendações:

1. Escrever Termo de Consentimento Livre e ESclarecido (TCLE) para a possível necessidade quando do uso de sangue periférico (para análise de microsatélite)

2. Epspecificar tempo de seguimento dos pacientes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer Ad Hoc NAP:

- Desenho de estudo: adequado. Coorte histórica.

- Análise estatística adequada. Seria conveniente colocar no projeto o tempo de seguimento dos

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

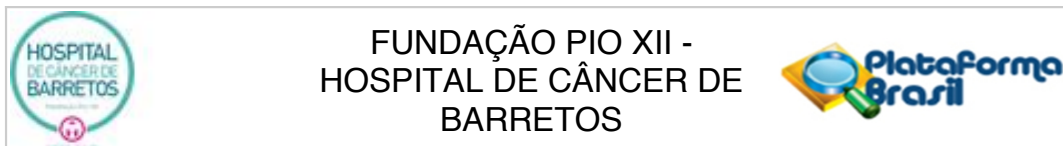
UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



pacientes (pacientes com câncer de testículo submetidos a quimioterapia entre 2001 à 2010), até quando serão acompanhados?

- Ficha de coleta adequada.

Projeto importante para a temática e com objetivos factíveis. Metodologia adequada. Por tratar-se de pesquisa retrospectiva, com análise de material biológico humano de Biobanco (já está disponível TCLE das amostras para uso futuro em pesquisa) acredito não haver necessidade de consentimento. Necessário discussão quanto ao TCLE já disponível no Biobanco (conforme Resolução 441, item V-5, no TCLE o sujeito de pesquisa deve deixar claro se quer ser ou não reconsentido a cada nova pesquisa). No entanto, caso seja aplicado TCLE nos casos de uso de sangue periférico, necessário redigir um TCLE para esta eventual indicação.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos analisou o referido projeto, decidindo que o mesmo encontra-se em situação de Pendente. As adequações devem ser enviadas em até 60 dias a partir da emissão deste parecer, incluindo na submissão um documento informando as alterações realizadas

BARRETOS, 18 de Janeiro de 2013

Assinador por:
José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-6600 **Fax:** (17)3321-6629 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Instabilidade Microsatélite, ADAMTS1 e OCT-3/4 nos Tumores de Células Germinativas do Testículo e suas Associações Prognósticas e Preditivas de Resposta nos Pacientes submetidos à Quimioterapia.

Pesquisador: FLAVIO MAVIGNIER CARCANO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12297713.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII
Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 212.805

Data da Relatoria: 26/02/2013

Apresentação do Projeto:

Vide parecer consubstanciado anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer consubstanciado anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem pendências.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer consubstanciado anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem pendências.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências solucionadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para 06/03/2014.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o Biobanco para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

BARRETOS, 06 de Março de 2013

Assinador por:
Ednise Woyciechowski
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de alterações moleculares e genéticas nos tumores de células germinativas do testículo e suas associações clínico-patológicas.

Pesquisador: FLAVIO MAVIGNIER CARCANO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 12297713.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 675.495

Data da Relatoria: 19/05/2014

Apresentação do Projeto:

Emenda submetida para necessidades de suprimir uma metodologia proposta devido ao seu menor potencial de inferência e associação ao objetivo principal do estudo. Além disso, novos métodos se mostraram necessários para ampliar o conhecimento proposto e auxiliar no melhor entendimento dos resultados a serem encontrados. Consequentemente, o título do projeto deverá ser alterado para se ajustar aos objetivos e novas metodologias propostas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo proposto na EMENDA é a necessidades de suprimir uma metodologia proposta devido ao seu menor potencial de inferência e associação ao objetivo principal do estudo consequentemente alterar o título da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve alteração nos riscos e benefícios propostos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários ou considerações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos referentes a submissão da referida EMENDA foram devidamente apresentados

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Continuação do Parecer: 675.495

nesta submissão.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências ou Inadequações a serem citadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU a EMENDA ao referido projeto e decidindo que a mesma encontra-se APROVADA.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para 06/03/2014 .
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o Biobanco para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este Projeto encontra-se registrado no CEP-HCB com o número 676/2013.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Continuação do Parecer: 675.495

BARRETOS, 05 de Junho de 2014

Assinado por:
Sergio Vicente Serrano
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo D – Publicação referente ao estudo de mutação do *TERT*

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-015-4317-y



ORIGINAL ARTICLE

Hotspot *TERT* promoter mutations are rare events in testicular germ cell tumors

Flavio Mavignier Cárcano^{1,2} · Daniel Onofre Vidal^{3,4} · André van Helvoort Lengert^{3,4} · Cristovam Scapulatempo Neto^{3,5} · Luisa Queiroz⁶ · Herlander Marques⁶ · Fátima Baltazar^{7,8} · Camila Maria da Silva Martinelli³ · Paula Soares^{9,10,11} · Eduardo Caetano Albino da Silva⁵ · Luiz Fernando Lopes^{3,4} · Rui Manuel Reis^{3,7,8}

Received: 28 July 2015 / Accepted: 22 October 2015
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

Abstract The abnormal activation of telomerase, codified by the telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene, is related to one of cancer hallmarks. Hotspot somatic mutations in the promoter region of *TERT*, specifically the c.-124:C>T and c.-146:C>T, were recently identified in a range of human cancers and have been associated with a more aggressive behavior. Testicular germ cell tumors frequently exhibit a good prognosis; however, the development of refractory disease is still a clinical challenge. In this study, we aim to evaluate for the first time the presence of the hotspot telomerase reverse transcriptase gene promoter mutations in testicular germ cell tumors. A series of 150 testicular germ cell tumor cases and four germ cell tumor cell lines were evaluated by PCR followed by direct Sanger sequencing and correlated with patient's clinical pathological features. Additionally, we genotyped the telomerase reverse transcriptase gene promoter single nucleotide polymorphism rs2853669 (T>C) located at -245 position. We observed the presence of the *TERT* promoter mutation in four patients, one exhibited the c.-124:C>T and three the c.-

146:C>T. No association between *TERT* mutation status and clinicopathological features could be identified. The analysis of the rs2853669 showed that variant C was present in 22.8 % of the cases. In conclusion, we showed for the first time that *TERT* promoter mutations occur in a small subset (~3 %) of testicular germ cell tumors.

Keywords Testicular neoplasms · Neoplasms, germ cell, and embryonal · *TERT* protein · Mutation · Polymorphism, single nucleotide

Introduction

Telomere maintenance and regulation are fundamental for normal cell homeostasis, and telomerase activity is central in this process [1]. One of the key human cancer hallmarks is the abnormal upregulation of telomerase, that is codified by the telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene [1]. Recent

✉ Luiz Fernando Lopes
lf.lopes@yahoo.com
✉ Rui Manuel Reis
rreis@ecsaude.uminho.pt

¹ Department of Clinical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil
² Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata-FACISB, Barretos, Brazil
³ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, 1331, Rua Antenor Duarte Vilela St, CEP 14784 400 Barretos, Sao Paulo, Brazil
⁴ Barretos Children's Cancer Hospital, 3025, Avenida João Baroni, Barretos, Brazil

⁵ Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil
⁶ Department of Medical Oncology, Hospital de Braga, Braga, Portugal
⁷ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal
⁸ ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal
⁹ Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto-IPATIMUP, Porto, Portugal
¹⁰ Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal
¹¹ Medical Faculty, University of Porto, 4200-319 Porto, Portugal

studies identified the presence of hotspot somatic mutations in the promoter region of *TERT* gene, specifically the -124:C>T and -146:C>T mutations, in a range of human cancers such as bladder, gliomas, thyroid and melanoma [2–5]. These mutations have been shown to create a new binding motif sites for ETS transcription factors, which induces upregulation of *TERT* levels [2, 5, 6]. Recently, the less frequent variant C of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs2853669 located -245 bp upstream from the ATG start site of the *TERT* promoter region has been shown to decrease *TERT* expression levels in both -124:C>T and -146:C>T mutant cases, apparently introducing a protective effect [7]. In accordance, this rs2853669 SNP modifies the clinical outcomes in bladder cancer and renal cell carcinoma [8, 9].

Testicular germ cell tumor (TGCT) is the most frequent malignant neoplasm in young man, representing 95 % of the testicular cancers [10]. Commonly, TGCTs are classified in two distinct groups, the seminomas (SE) and the non-seminomas (non-SE), with a slight predominance of the last group and frequently appearing as a mixed tumor containing both histologies. The mainstay TGCT treatment over the last decades has been platinum-based chemotherapy associated with surgery, leading to high response rates and also in some cases to a curable disease [11]. Nevertheless, the development of refractory disease is still a challenge in around 15 % of the cases, and even within this group, there is a large range of risk [12, 13]. Currently, the risk stratification of the patients is based only on clinical parameters as the spreading pattern and serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG), alpha-fetoprotein (AFP), and lactate dehydrogenase (LDH).

It is well known that telomerase activity is present in normal testicular tissue and in TGCT, and its activity level has been inversely related to the differentiation state of clinical germ cell tumors [14]. Recently, a GWAS study reported an association of TGCT and genetic variants on the *TERT* locus, on chromosome 5, suggesting the role of *TERT* gene on TGCT tumorigenesis [15]. However, the molecular mechanism associated with telomerase activation in different types of germ cell tumors are complex and remain unclear. Herein, we evaluated the presence and clinicopathological impact of somatic mutations and rs2853669 polymorphism in the promoter region of *TERT* gene in a population of Brazilian and Portuguese TGCT.

Materials and methods

Human subjects and samples

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues from 150 cases of testicular germ cell tumors (SE, non-SE, and mixed tumors) were retrieved from the files of the Department of Pathology at Barretos Cancer Hospital (Brazil) and Hospital

de Braga (Portugal). All the patients were diagnosed between 2006 and 2012. The samples analyzed were from primary tumors at diagnosis prior the use of any possible systemic treatment. All the TGCT cases were reevaluated by a pathologist to the confirmation of the diagnosis.

Germ cell tumor cell lines

The germ cell tumor cell lines (NTERA-2, 1411H, 1777N and N2102Ep Clone2/A6) were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). DNA was isolated from cell lines using TRIzol reagent (Life Technologies) following the manufacturer's recommendation. Authentication of cell lines was performed by short tandem repeat (STR) DNA typing according to the International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines, as reported by Dirks et al. [16]. Genotyping confirmed the identity of all cell lines.

DNA isolation from FFPE tissue

DNA was obtained from FFPE tissue sections representative of the tumor lesions using the QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen), following manufacturer's instructions and as previously described [17].

TERT mutation and SNP analysis

The analysis of hotspot mutations of *TERT* promoter regions was performed by PCR followed by direct Sanger sequencing as described previously by our group [3, 18, 19].

The electropherogram analysis of the same region allowed the genotyping of rs2853669 SNP.

Statistical analysis

To assess the relationship between variables, we used the Fisher's exact test. The overall survival was assessed by Kaplan-Meier method, and comparisons between curves were performed by log-rank test. The *p* value established for the statistical significance was <0.05. All the statistical analysis was performed using SPSS 19.0 software (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

Results

Twelve samples yielded inconclusive results due to DNA quality issues. Therefore, the major clinical and pathological features of the 138 patients (70 % from Brazil and 30 % from Portugal) analyzed with conclusive results are summarized in Table 1. All IGCCCG [20] risk groups were represented, and the 5-year overall survival was 84.1 %.

Table 1 Clinicopathological and molecular features of testicular germ cell tumor (TGCT) and their association with polymorphism

Characteristics	Patients <i>N</i> (%)	TERT promoter mutation			SNP rs2853669				<i>p</i> value
		c.-124:C>T	c.-146:C>T	Percent ^a	All	Carrier (C/C+C/T)	(TT)	Percent ^b	
TGCT	138	1	3	2.9	92	34	58	37	
Age (mean±SD=30 years±9.5)									
<30 years	83 (60.1)	1	2	3.6	52	17	35	32.7	0.33
≥30 years	55 (39.9)	0	1	1.8	40	17	23	42.5	
Histology group									
Non-seminoma	95 (68.8)	1	2	3.2	62	22	40	35.5	0.67
Seminoma	43 (31.2)	0	1	2.3	30	12	18	40	
Histology									
Mixed tumor	51 (37.0)	0	1	2	34	15	19	44.1	0.9
Seminoma	43 (31.2)	0	1	2.3	31	12	19	38.7	
Embryonal carcinoma	18 (13.0)	1	0	5.6	11	4	7	36.4	
Yolk sac tumor	10 (7.2)	0	1	10	6	2	4	33.3	
Immature teratoma	7 (5.1)	0	0	0	6	1	5	16.7	
Mature teratoma	4 (2.9)	0	0	0	2	0	2	0	
Choriocarcinoma	2 (1.4)	0	0	0	1	0	1	0	
Missing	3 (2.2)	0	0	0	1	0	1	0	
Serum tumor markers (AJCC)									
S0	18 (13.0)	0	0	0	17	8	9	47	0.11
S1	32 (23.2)	0	1	3.1	24	4	20	16.7	
S2	39 (28.3)	1	1	5.1	22	10	12	45.4	
S3	24 (17.4)	0	0	0	16	8	8	50	
SX	25 (18.1)	0	1	4	13	4	9	30.8	
Staging (AJCC)									
I	29 (21.0)	0	2	6.9	24	8	16	33.3	0.6
IS	22 (15.9)	0	0	0	13	7	6	53.8	
II	27 (19.6)	0	0	0	18	6	12	33.3	
III	60 (43.5)	1	1	3.3	37	13	24	35.1	
Number of metastasis site									
0	51 (37.0)	0	2	3.9	37	15	22	40.5	0.07
1	36 (26.1)	1	1	5.5	22	11	11	50	
2	26 (18.8)	0	0	0	17	2	15	11.8	
≥3	10 (7.2)	0	0	0	7	2	5	28.6	
Missing	15 (10.9)	0	0	0	9	4	5	44.4	
Chemosensitivity									
Responsive	94 (68.1)	1	0	1	68	27	41	39.7	0.78
Refractory	20 (14.5)	0	1	5	14	5	9	75.4	
No chemotherapy	24 (17.4)	0	2	8.3	10	2	8	20	
IGCCCG risk									
Good	31 (22.5)	1	0	3.2	22	5	17	22.7	0.22
Intermediate	17 (12.3)	0	1	5.9	12	7	5	58.3	
Poor	28 (20.3)	0	0	0	16	6	10	37.5	
Not applicable	51 (37.0)	0	2	3.9	37	15	22	40.5	
Missing	11 (8.0)	0	0	0	5	1	4	20	

AJCC American Joint Committee on Cancer, TERT telomerase reverse transcriptase, IGCCCG International Germ Cell Cancer Cooperative Group

^a Percentage of TERT promoter mutation

^b Percentage of carriers of the polymorphism

Table 2 *TERT* promoter mutation and clinical featuring in testicular germ cell tumors

Case	<i>TERT</i> mutation	SNP rs2853669	Age (year)	Histology	Primary tumor (cm)	Invasiveness ^a	Tumor marker	TNM stage	Metastasis site	IGCCCG risk	Chemosensitivity	Survival status
1	c.-124:C>T	Not analyzed	26	Embryonal carcinoma	6	+	S2	III	Lymph node	Good	Responsive	Alive
2	c.-146:C>T	Not analyzed	22	Yolk sac tumor	Unknown	-	S2	III	Lymph node	Intermediate	Refractory	Dead of disease
3	c.-146:C>T	TT	19	Mixed tumor	9	-	SX	I	n/a	n/a	n/a	Alive
4	c.-146:C>T	TT	43	Seminoma	6.5	+	S1	I	n/a	n/a	n/a	Alive

n/a not applicable

^a Vascular invasion

The mutation screening of the hotspot promoter region of *TERT* gene (c.-124:C>T and c.-146:C>T) showed the presence of the c.-124:C>T in one patient and the c.-146:C>T *TERT* mutation in three patients with testicular germ cell tumors (Table 2 and Fig. 1). Three of the four mutated cases presented primary tumors larger than 6 cm. One of them (case 4, Table 2) was a localized pure seminoma in an older adult, and the remaining were non-SE tumors in younger patients. Only one case (case 2, Table 2) corresponded to advanced refractory disease, and the patient died due to testicular germ cell tumor. There were no significant associations between *TERT* mutation and any of the clinicopathological characteristics.

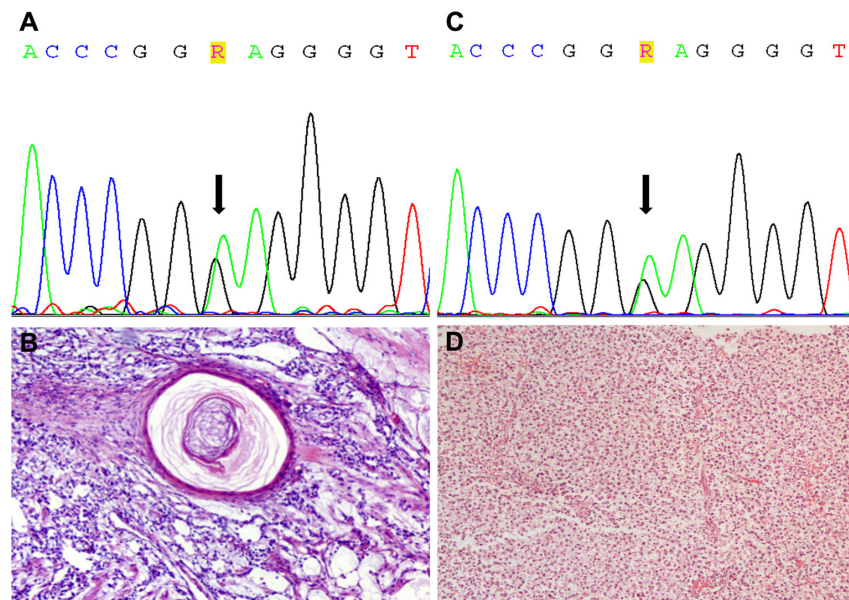
SNP rs2853669 genotyping was successful in 66.6 % of cases, and we found the following genotypes: 8.7 % C/C, 28.2 % T/C, and 63.0 % T/T. The allele frequency for T was 77.2 % and for C was 22.8 %. In the four *TERT*-mutated tumors, the SNP genotyping was possible in two and both exhibited homozygous T (Table 2).

The SNP rs2853669 (C/C+C/T) did not associate with any clinicopathological characteristic (Table 1). The 5-year overall survival of C/C+C/T versus TT was not statistically significant (respectively 94.1 versus 81.7 %, $p=0.33$). None of the four GCT cell lines presented mutations in the hotspot promoter regions of *TERT* gene, and concerning the rs2853669, one cell line (NTERA-2) was C/C and the remaining were T/T.

Discussion

This study reports for the first time the presence of somatic mutations in the promoter region of *TERT* gene in TGCT. We observed a frequency of 2.9 % (4/138) of *TERT* promoter mutation. Recent studies have described a high frequency of *TERT* promoter mutation in several human tumors and human cell lines [2–5, 21, 22]. In glioblastomas and papillary thyroid cancer, the mutations were associated with older age at diagnosis [3]. Another recent study demonstrated association

Fig. 1 Sequencing and histology of two TGCT cases presenting c.-146:C>T *TERT* promoter mutation. Case 1: **a** electropherogram reporting the c.-146:C>T mutation in a 19-year-old patient and **b** H&E staining demonstrating the mixed TGCT, containing 50 % of immature teratoma and 50 % of yolk sac tumor. Case 2: **c** electropherogram reporting the c.-146:C>T mutation in a 43-year-old patient and **d** H&E staining demonstrating the pure seminoma tissue. Black arrow indicates the position of c.-146:C>T mutation into the *TERT* promoter region



between *TERT* promoter mutations and older patient age, larger tumor size, distant metastases, and shorter disease specific survival in papillary thyroid cancer [23]. In melanoma, *TERT* promoter mutations were also associated with shorter disease free survival [24]. In our study, we identified *TERT* promoter mutations in small number of cases that exhibited different stages, invasiveness, and histologies, hindering meaningful statistical associations.

The *TERT* mutation profile has been associated with other molecular features in several tumor types, in particular an interesting association with *BRAF* mutation in skin melanomas and thyroid cancer [3, 4]. The frequency and clinical impact of *BRAF* mutations in TGCT is still controversial [25, 26]. *BRAF* mutations were not evaluated in the present study. It is also of note in TGCT that, at variance with the majority of the other tumor types on record, the c.-146:C>T mutation was more prevalent than the c.-124:C>T [27]. Further studies are needed to clarify if this observation represents any biological significance.

In our series, the frequency of allele C (22.8 %) of SNP rs2853669 in the *TERT* promoter region was similar to those found in more than 1000 genome database (30 %) [28]. Two of our mutated cases could not be analyzed and the other two showed T/T, the most frequent genotype. Although this polymorphism could act as a modifier of the effect of the hotspot promoter mutations on survival, as seen in bladder cancer and renal cell carcinoma [8, 9], our study has few mutated cases, hampering its statistical significance. Nevertheless, in the whole series, the carriers of the C variant for rs2853669 seem to have a better outcome. Further studies with larger cohorts would be needed to test this hypothesis.

Cell immortalization is a cancer hallmark, which is associated with abnormal telomeres size maintenance [1]. Telomere size is mainly controlled by telomerase activity, and its abnormal reactivation is reported in up to 90 % of human tumors. Only recently, Huang et al. [2] and Horn et al. [5] showed that mutations in the promoter region of *TERT* gene, namely the c.-146:C>T and the c.-124:C>T mutations, generate a new consensus binding site for ETS/TCFs transcription factors (CCGGAA) leading to a two- to fourfold increase of the *TERT* promoter activity. The low frequency of *TERT* promoter mutations observed in our study raises evidence that other pathways may be involved in telomere regulation in TGCT. It is reported that activation of telomerase can be mediated by Kit ligand in proliferating spermatogonia and primordial germ cells, but there is no telomerase activity in sperm cells [29]. Telomerase activity has not been identified in mature teratomas, while it is present in other histologies like seminoma, embryonal carcinoma, mixed tumors, as our third case, and markedly in immature teratomas [14]. In the *TERT*-mutated case, that showed a mixed (immature teratoma and yolk sac tumor—case 3, Table 2) histology, it was not possible to accurately microdissect both components, hampering to understand

whether the mutation is present in both components or in just one of them. This finding fits with the mRNA expression of *TERT* [30]. Although non-SE germ cell tumors reveal longer telomeric restriction fragment than seminomas, telomerase activity seems to be similar in both groups, and other unknown factors might play a role [31]. Finally, alternative lengthening of telomeres (ALT) is a well-known mechanism involved in non-telomerase-dependent cancer cell immortalization [32], and its role in TGCT is unexplored.

Our series is very heterogeneous, representative of several types of germ cell tumor histologies, clinical staging, and response to chemotherapy. The predominance of advanced disease and non-SE histologies in our series differs from the classical literature, where seminomas and stage I disease is the most common finding [33]. Our hospital is a reference center for TGCT, associated to the Brazilian Childhood Germ Cell Tumor Study Group, a consortium developed to standardize diagnostic assessment and multidisciplinary treatment of TGCT patients in Brazil [34] and for that reason, our series might be biased by more advanced cases. However, the several risk groups were well represented in the study.

Conclusions

TERT promoter mutations seem to be a rare event in TCGTs; however, we showed for the first time that *TERT* promoter mutations can be a new molecular event in a small subset (2.9 %) of cases. Further studies are needed to extend and validate these findings, in order to assess the clinical impact of *TERT* mutations and rs2853669 polymorphism in TGCT patients and to associate *TERT* with the other molecular features of TGCT, in particular with *BRAF* mutation status.

Acknowledgments The authors acknowledge the support of the Center for Research Support (NAP), Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation.

Compliance with ethical standards

Funding This work was supported by the Barretos Cancer Hospital internal research funds (PAIP): Project “Microenvironment, metabolism and cancer” that was partially supported by Programa Operacional Regional do Norte (ON.2 – O Novo Norte), under the Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN), and through the Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER). R.M.R. has a National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) scholarship.

Conflicts of interest None

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee (register number CAAE 12297713.0.0000.5437) and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. For this type of study, formal consent is not required.

References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339(6122):957–9. doi:10.1126/science.1229259.
- Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185. doi:10.1038/ncomms3185.
- Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz Jr LA, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021–6. doi:10.1073/pnas.1303607110.
- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339(6122):959–61. doi:10.1126/science.1230062.
- Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015;348(6238):1036–9. doi:10.1126/science.aab0015.
- Park CK, Lee SH, Kim JY, Kim JE, Kim TM, Lee ST, et al. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget*. 2014;5(10):3399–407.
- Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17426–31. doi:10.1073/pnas.1310522110.
- Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, Sitaram RT, Ljungberg B, Roos G, et al. TERT promoter mutations in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2014. doi:10.1002/ijc.29279.
- Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Moller H. Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nat Clin Pract Urol*. 2006;3(10):532–43. doi:10.1038/ncpuro0606.
- Einhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. 1990;8(11):1777–81.
- Lorch A, Beyer J, Bascoul-Mollevi C, Kramar A, Einhorn LH, Necchi A, et al. Prognostic factors in patients with metastatic germ cell tumors who experienced treatment failure with cisplatin-based first-line chemotherapy. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(33):4906–11. doi:10.1200/JCO.2009.26.8128.
- Mead GM, Cullen MH, Huddart R, Harper P, Rustin GJ, Cook PA, et al. A phase II trial of TIP (paclitaxel, ifosfamide and cisplatin) given as second-line (post-BEP) salvage chemotherapy for patients with metastatic germ cell cancer: a medical research council trial. *Br J Cancer*. 2005;93(2):178–84. doi:10.1038/sj.bjc.6602682.
- Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, et al. Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(15):1321–6.
- Turnbull C, Rapley EA, Seal S, Pernet D, Renwick A, Hughes D, et al. Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nat Genet*. 2010;42(7):604–7. doi:10.1038/ng.607.
- Dirks WG, Faehrich S, Estella IA, Drexler HG. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX*. 2005;22(2):103–9.
- Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer*. 2009;101(6):973–82. doi:10.1038/sj.bjc.6605225.
- Campanella NC, Celestino R, Pestana A, Scapulatempo-Neto C, de Oliveira AT, Brito MJ, et al. Low frequency of TERT promoter mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Eur J Hum Genet: EJHG*. 2014. doi:10.1038/ejhg.2014.195.
- Campanella NC, Penna V, Abrahao-Machado LF, Cruvinel-Carloni A, Ribeiro G, Soares P, et al. TERT promoter mutations in soft tissue sarcomas. *Int J Biol Markers*. 2015. doi:10.5301/ijbm.5000168.
- IGCCCG. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *Int Germ Cell Cancer Collab Group J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997;15(2):594–603.
- Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*. 2013;4:2218. doi:10.1038/ncomms3218.
- Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24c:30–7. doi:10.1016/j.gde.2013.11.005.
- Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E754–65. doi:10.1210/jc.2013-3734.
- Populo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and x-irradiation. *J Invest Dermatol*. 2014. doi:10.1038/jid.2014.163.
- Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJ, Stoop H, van Gurp RJ, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(13):2129–36. doi:10.1200/JCO.2008.18.8623.
- Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, et al. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer*. 2005;113(2):329–35. doi:10.1002/ijc.20567.
- Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Populo H, Boaventura P, et al. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch: Int J Pathol*. 2014;465(2):119–33. doi:10.1007/s00428-014-1608-4.
- Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56–65. doi:10.1038/nature11632.
- Dolci S, Levati L, Pellegrini M, Faraoni I, Graziani G, Di Carlo A, et al. Stem cell factor activates telomerase in mouse mitotic spermatogonia and in primordial germ cells. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 8):1643–9.
- Schrader M, Burger AM, Muller M, Krause H, Straub B, Smith GL, et al. Quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in testicular germ cell tumors by quantitative fluorescence real-time RT-PCR. *Oncol Rep*. 2002;9(5):1097–105.

31. Nowak R, Sikora K, Pietas A, Skoneczna I, Chrapusta SJ. Germ cell-like telomeric length homeostasis in nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 2000;19(35):4075–8. doi:10.1038/sj.onc.1203746.
32. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):319–30. doi:10.1038/nrg2763.
33. Ries LAG YJ, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors). SEER survival monograph: cancer survival among adults: U.S. SEER Program, 1988–2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07–6215, Bethesda, MD, 2007; p165-70. 2007.
34. Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos AS, Mastellaro MJ, Melaragno R, et al. Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: Brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(8):1297–303. doi:10.1200/JCO.2008.16.4202.

Anexo E – Artigo “em correção gráfica” referente ao estudo de MSI e da mutação do *BRAF*

ISSN: 2047-2919

ANDROLOGY

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Rui Manuel Reis, Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, 1331, Rua Antenor Duarte Villela St, CEP 14784 400, Barretos, São Paulo, Brazil.
E-mail: ruireis.hcb@gmail.com

Keywords:

microsatellite instability, mutation, proto-oncogene protein B-raf, testicular germ cell tumors, testicular neoplasms

Received: 4-Sep-2015

Revised: 16-Mar-2016

Accepted: 18-Mar-2016

doi: 10.1111/andr.12200

Absence of microsatellite instability and *BRAF* (V600E) mutation in testicular germ cell tumors

^{1,2}F. M. Cárcano, ^{3,4}A. H. Lengert, ^{3,4}D. O. Vidal, ^{3,5}C. Scapulatempo Neto, ⁶L. Queiroz, ⁶H. Marques, ^{7,8}F. Baltazar, ³G. N. Berardinelli, ³C. M. S. Martinelli, ⁵E. C. A. da Silva, ^{3,7,8}R. M. Reis and ^{3,4}L. F. Lopes

¹Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, ²Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata – FACISB, ³Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, ⁴Barretos Children's Cancer Hospital, ⁵Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil, ⁶Department of Medical Oncology, Hospital de Braga, ⁷Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, and ⁸ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga, Guimarães, Portugal

SUMMARY

Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most common malignant neoplasm in young men. DNA mismatch repair deficiency can lead to microsatellite instability (MSI), an important mechanism of genetic instability. A mutation of the *BRAF* gene has been implicated in the pathogenesis of several solid tumors and has recently become an important therapeutic target. The role of MSI and *BRAF* gene mutation in TGCT, particularly in refractory disease, is poorly understood and reported findings are controversial. In this study, we aimed to determine the frequency and clinical impact of MSI status and *BRAF* mutations in TGCT. DNA was isolated from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue from 150 TGCT cases. The MSI phenotype was evaluated using multiplex PCR for five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers. Exon 15 of the *BRAF* oncogene (V600E) was analyzed by PCR, followed by direct sequencing. Sixteen percent of cases were considered to have refractory disease. In a small subset of cases (17 for MSI and 18 for *BRAF*), the quantity and quality of DNA recovery were poor and therefore, were unable to be analyzed. The remaining 133 TGCT cases showed a complete absence of MSI. Of the 132 cases successfully evaluated for *BRAF* mutations, all were V600E wild-type. In conclusion, despite a distinct response of testicular germ cell tumors to therapy, microsatellite instability, and the *BRAF* V600E mutation were absent in all testicular germ cell tumors tested in this study.

INTRODUCTION

Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most frequent malignant neoplasm found in young men and represent 95% of testicular cancers (Bray *et al.*, 2006). Commonly, TGCTs are classified into two distinct groups, seminomas (SE) and non-seminomas (non-SE). The mainstay treatment for both over the last few decades has been platinum-based chemotherapy and surgery, leading to robust response and cure rates (Einhorn, 2002; Feldman, 2015). Patients with advanced disease achieve a 5-year-overall survival of more than 70% (Ries *et al.*, 2007), while those with non-SE have a poorer prognosis and 5-year-overall survival of 50% (IGCCCG, 1997). Fifteen percent of all patients will develop refractory disease representing a challenge in the clinical management (Mead *et al.*, 2005; Lorch *et al.*, 2010).

The integrity of the genome depends on the coordinated action of DNA repair genes, also known as ‘caretakers’ (Kinzler & Vogelstein, 1997). The failure of one type of such caretakers, a

DNA mismatch repair gene, contributes to genome instability by making microsatellite regions more susceptible to mismatch, leading to what is termed microsatellite instability (MSI) (Imai & Yamamoto, 2008; Shah *et al.*, 2010). The MSI phenotype is a hallmark of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome, but is also present in 10–15% of sporadic colorectal cancers (Kinzler & Vogelstein, 1996; Hamelin *et al.*, 2008; Gryfe, 2009). MSI phenotype has also been described in other cancers including endometrial and gastric (Hamelin *et al.*, 2008). Recently, colorectal and non-colorectal tumors with identified mismatch-repair defects have been reported as more responsive to a new anti-programmed death 1 immune checkpoint inhibitor drug, highlighting a new role for MSI in immunotherapeutic prediction (Le *et al.*, 2015).

The *BRAF* oncogene is an important part of the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) cellular signaling pathway and related to cell proliferation, differentiation and survival (Kolch,

2000). *BRAF* is activated by hotspot mutations, mainly V600E, which has been found in melanomas and other types of cancer (Rajagopalan *et al.*, 2002; Michaloglou *et al.*, 2008). Recently, the *BRAF* V600E mutation has emerged as a therapeutic target in melanoma, changing the natural history of the disease (Chapman *et al.*, 2011).

In TGCT, the roles of MSI and *BRAF* mutations are poorly characterized and controversial results have been reported (Huddart *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2004, 2008; Sommerer *et al.*, 2005; Honecker *et al.*, 2009; Masquesoler *et al.*, 2011). Therefore, in the present study, we evaluated the presence and clinical impact of MSI and *BRAF* mutations in a large series of TGCTs.

MATERIALS AND METHODS

Patients and specimens

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues from 150 consecutive cases of testicular germ cell tumors were retrieved from the Biobank of the Departments of Pathology at Barretos Cancer Hospital (Brazil) and Hospital de Braga (Portugal). All patients were diagnosed between 2006 and 2012 and all analyzed samples were collected from primary tumors at diagnosis prior to the use of any systemic treatment. All TGCT cases were independently re-evaluated by a pathologist for diagnosis confirmation.

Germ cell tumor cell lines

The germ cell tumor cell lines NTERA-2, 1411H, 1777N and N2102Ep Clone2/A6 were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). Cell lines were cultured in DMEM containing 2 mM glutamine and 10% FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). After achieving 80% confluence, cell lines were trypsinized, washed twice with 1% PBS, and centrifuged. DNA was isolated using the TRIZOL reagent (Life Technologies, Bethesda, MD, USA) and manufacturer's recommendations were followed.

DNA isolation from FFPE tissue

DNA was obtained from FFPE tissue sections representative of tumor pathology as previously described (Martinho *et al.*, 2009a, b; Yamane *et al.*, 2014), with minor modifications. Briefly, 10 µm thick unstained sections of paraffin blocks were sectioned and one H&E section was used for identification and selection of the tumor area, which was then macrodissected into a microfuge tube using a sterile needle (Neolus, 25G – 0.5 mm). The macrodissected tissue was deparaffinized by a serial wash with xylol and ethanol (100–70–50%) and allowed to air-dry. DNA was isolated using the QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The quality and concentration of DNA were measured using a Nanodrop 2000 Spectrophotometer and stored at –20 °C until molecular analysis.

Microsatellite instability analysis

Microsatellite instability evaluation was performed using multiplex PCR for five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, and BAT-26) as previously described (Viana-Pereira *et al.*, 2011; Campanella *et al.*, 2014; Yamane *et al.*, 2014). Briefly, each antisense primer

was end-labeled with a fluorescent dye: FAM (6-carboxyfluorescein) for BAT-26 and NR-21, VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein) for BAT-25 and NR-27, and NED (2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein) for NR-24. PCR was performed using the Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen) with 0.5 µL of DNA at 50 ng/µL. All five markers were co-amplified in a standard multiplex PCR (denaturation at 95 °C for 15 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55 °C for 90 sec and extension at 72 °C for 30 sec, followed by a final extension at 72 °C for 40 min). PCR products were then submitted to capillary electrophoresis on an ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. Results were analyzed using GENEMAPPER v4.1 (Applied Biosystems) software.

In a recent study, our group determined the quasimonomorphic variation range (QMVR) of each marker for the Brazilian population (Campanella *et al.*, 2014). Accordingly, samples were considered MSI-H when two or more markers were altered and MSI-low (MSI-L) when only one marker was altered, with further validation by MSI analysis of normal tissue or immunohistochemistry of the mismatch repair (MMR) enzymes. Samples were considered microsatellite stable (MSS) when none of the markers were altered.

The HCT-15 colorectal cancer cell line was used as a positive control of MSI-High (MSI-H) in all MSI analyses. DNA from HCT-15 cells was extracted using the TRIZOL reagent (Life Technologies) following the manufacturer's protocol.

In 10% of samples, the MSI analysis was repeated for quality control.

Mutational analysis of *BRAF*

Hotspot regions (exon 15) of the oncogene *BRAF* (codon 600) were analyzed by polymerase chain reaction (PCR), followed by direct sequencing, as previously described by our group (Basto *et al.*, 2005; Martinho *et al.*, 2009a,b; Yamane *et al.*, 2014).

Polymerase chain reactions were performed in a final volume of 15 µL, according the following conditions: 1.5 µL buffer (Qiagen); 2 mM MgCl₂ (Qiagen); 100 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 0.3 mM of both sense and anti-sense primers (Sigma Aldrich), 1 unit of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen) and 1 µL of DNA. The *BRAF* primers used were: 5'-TCA-TAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' (sense) and 5'-GGCCAAAATT-TAATCAGTGGGA-3' (antisense) (Basto *et al.*, 2005; Martinho *et al.*, 2009a,b; Yamane *et al.*, 2014). The PCR was performed with a Veriti thermocycler (Applied Biosystems) and products were evaluated by electrophoresis in 1% agarose gel.

All PCR products were purified with EXO-SAP (GE Technology, Cleveland, OH, USA), and submitted for a sequencing reaction using 1 µL of BigDye (Applied Biosystems), 1.5 µL of sequencing buffer (Applied Biosystems) and 1 µL of primer. Sequencing reactions were followed by post-sequencing purification with EDTA, alcohol and sodium citrate. PCR products were eluted in Hi-Di (formamide) and incubated at 95 °C for 5 min and subsequently cooled at –4 °C for at least 5 min. Direct sequencing was performed on an ABI 3500 series Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

In 10% of samples, the *BRAF* mutation analysis was repeated for quality control.

Statistical analysis

We assessed measurements of frequency, central tendency, and dispersion for clinical and pathological characteristics. The overall survival was assessed using Kaplan–Meier methods. All diagnostics were performed by orchidectomy before any systemic therapy. Date of diagnosis was the starting point for the survival analysis and events were defined as all-cause mortality. Patients lost to follow-up or alive at the time of this analysis were censored. Survival curves were compared using Logrank tests. The two-sided *p*-values were considered statistically significant at <0.05 . All statistical analyses were performed using *spss* 19.0 software (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

RESULTS

One hundred and fifty cases of TGCT were retrieved. After DNA isolation, 17 cases of MSI and 18 cases of *BRAF* yielded inconclusive results as a result of poor quality and quantity of extracted DNA. The clinicopathological features of all validated cases are summarized in Table 1.

The mean age of diagnosis was 30 years old and the majority of cases (~68%) had non-SE. The predominant histologies

identified were mixed tumor followed by seminoma. All stages of disease were observed, while advanced disease was the most frequent stage identified. Among those who received chemotherapy, around 16% were considered to have refractory disease after treatment with the first-line chemotherapy regimen, BEP (Bleomicine, Etoposide and Cisplatin). A majority of cases were classified as having intermediate or high-risk disease according to IGCCCG. Median follow-up was 36.0 months for cases evaluating MSI and 35.5 months for *BRAF* evaluated cases. Five-year overall survival was 84.5 and 83.2% for MSI and *BRAF* evaluated cases, respectively.

Among treatment-refractory patients, the mean age was 29 (min: 20 years and max: 51 years) and 87% of tumors were non-SE. A single case was categorized as stage II, while all other cases were stage III. Eighty-five percent of valid cases presented with two or more sites of metastasis and 95% were classified as high or intermediate risk according IGCCCG (data not shown).

The overall survival of responsive and refractory patients to chemotherapy in the cases evaluated for MSI or *BRAF* mutation are demonstrated in Fig. 1A and B, respectively. Refractory cases had a poorer overall survival rate compared to responsive cases.

We obtained results of MSI status for 88.7% (133/150) of patients. 126 had a microsatellite stable (MSS) genotype, 7 had MSI-L and none had MSI-H. In a previous study (Campanella *et al.*, 2014), our group reported that in order to accurately determine MSI-L, the MSI markers of tumor tissue should be compared with the germ-line tissue of the patient. Therefore, for the seven cases with MSI-L, we isolated adjacent normal tissue and identified the presence of an identical MSI marker profile, thereby indicating a MSS phenotype.

The mutation analysis of *BRAF* V600E was successful in 88% (132/150) of TGCT cases. None were determined to have a *BRAF* V600E mutation.

All germ cell tumor cell lines were observed to have MSS and wild type *BRAF*.

DISCUSSION

In our study, we demonstrated an absence of MSI in all TGCT analyzed even in the refractory cases and cell lines. These results are in accordance with several studies, which also did not observe such alterations in TGCT (Lothe *et al.*, 1995; Faulkner & Friedlander, 2000; Olasz *et al.*, 2005; Vladusic *et al.*, 2014) (Table 2). In contrast, another study reported the presence of MSI at a significant frequency (33%) and as a potential biomarker of refractory TGCT and poor clinical outcome (Mayer *et al.*, 2011). Several factors may explain this discrepancy, including differences in methodology, tumor subtype, and ethnically distinct populations. Indeed, the data are still controversial, with MSI frequencies varying from 0 to 33%, and assessing a limited number of cases (Table 2).

Distinct methodologies have been used in the assessment of MSI in TGCT (Table 2), including the use of specific microsatellite markers from mononucleotides to tetranucleotides, each of which could lead to different results, as reported for EMAST, an MSI form associated with tetranucleotide repeats (Devaraj *et al.*, 2010; Carethers *et al.*, 2015). Herein, we used a validated methodology that comprised five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers to identify MSI (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, and BAT-26) as previously described (Viana-Pereira *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2014; Campanella *et al.*, 2015). BAT-

Table 1 Clinicopathological features of testicular germ cell tumor (TGCT) valid cases

Characteristics	Patients	
	<i>BRAF</i> N (%)	MSI N (%)
TGCT valid	132	133
Age (year)		
Mean (SD)	30 (9.9)	30 (10.0)
Range	1–63	1–63
Histological group		
Non-seminoma	90 (68.2)	91 (68.4)
Seminoma	42 (31.8)	42 (31.6)
Histology		
Mixed tumor	53 (40.2)	54 (40.6)
Seminoma	42 (31.8)	42 (31.6)
Embryonal carcinoma	16 (12.1)	17 (12.8)
Yolk Sac tumor	10 (7.6)	9 (6.8)
Immature teratoma	6 (4.5)	6 (4.5)
Mature teratoma	3 (2.3)	3 (2.3)
Choriocarcinoma	2 (1.5)	2 (1.5)
Serum tumor markers (AJCC)		
S0	18 (13.6)	17 (12.8)
S1	31 (23.5)	30 (22.6)
S2	38 (28.8)	37 (27.8)
S3	23 (17.4)	25 (18.8)
SX	22 (16.7)	24 (18)
Staging (AJCC)		
I	28 (21.2)	28 (21.1)
IS	20 (15.2)	21 (15.8)
II	25 (18.9)	26 (19.5)
III	59 (44.7)	58 (43.6)
Chemosensitivity		
Responsive	84 (63.6)	84 (63.2)
Refractory	20 (15.2)	21 (15.8)
No chemotherapy	28 (21.2)	28 (21.1)
IGCCCG risk		
Good	31 (23.5)	31 (23.3)
Intermediate	17 (12.9)	17 (12.8)
Poor	27 (20.5)	27 (20.3)
Not applicable	48 (36.4)	49 (36.8)
Missing	9 (6.8)	9 (6.8)

SD: Standard deviation; AJCC: American Joint Committee on Cancer; IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group.

Figure 1 Overall survival of refractory and responsive testicular germ cell tumors cases. (A) microsatellite instability sample; (B) *BRAF* mutation sample.

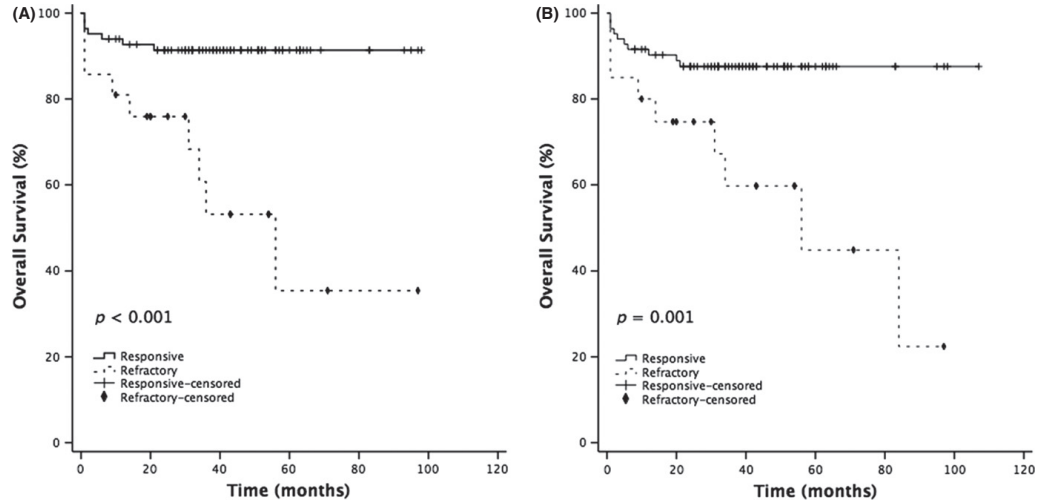


Table 2 Summary of studies assessing MSI in testicular germ cell tumors (TGCT)

Author, year	Sample (N) Total/Refractory	Age (years)	Country	MSI high (%) Total/Refractory	MSI markers
Huddart <i>et al.</i> (1995)	29/NR	NR	United Kingdom	21/NA	Dinucleotide (D1S216, D2S123, D16S303, D17S796) and tetra- and tri-nucleotide repeats.
Lothe <i>et al.</i> (1995)	31/NR	NR	Norway, Finland and Denmark	0/NA	32 microsatellite loci (dinucleotide repeats)
Faulkner & Friedlander (2000)	24/NR	NR	Australia	0/NA	78 microsatellite loci (di- and tetra-nucleotide repeats)
Velasco <i>et al.</i> (2004)	118/NR	16–45	Chile	25/NA	Mononucleotide (BAT25, BAT26) and dinucleotide (D2S123, D3S1029, D3S1283, D3S1293, D9S66, D9S113, LNSCA and TP53CA)
Sommerer <i>et al.</i> (2005)	62/0	NR	Germany	6/NA	Mononucleotide (BAT25, BAT26, BAT40) and dinucleotide (D2S123, D5S346, MSH6)
Olasz <i>et al.</i> (2005)	51/15	17–60	Hungary	0/0	Mononucleotide (BAT25, BAT26) and dinucleotide (D2S123, D5S346, D17S250)
Honecker <i>et al.</i> (2009)	135/35	14–66	Germany and Netherlands	7/26	Mononucleotide (BAT25, BAT26, BATH, BAT40) and dinucleotide (D2S123, D5S346, D17S250, MSH6)
Mayer <i>et al.</i> (2011) ^a	12/NR	17–48	Germany and Netherlands	33/NA	Mononucleotide (BAT25, BAT26) and dinucleotide (D2S123, D5S346, D17S250)
Vladusic <i>et al.</i> (2014)	40/NR	17–60	Croatia	0/NA	BAT-26 (mononucleotides) and 8 microsatellite loci (dinucleotide repeats)
Current study	133/20	1–63	Brazil and Portugal	0/0	Mononucleotide (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26)

NR: not reported; NA: not applicable. ^aLate relapses.

25, BAT-26 (mononucleotides) and D5S346, D2S123, D17S250 (dinucleotides) were classically recommended by Bethesda panel for MSI evaluation until 2002 (Boland *et al.*, 1998), when an international consensus updated the recommendation and recommended that dinucleotide repeats be substituted for mononucleotide repeats because of improved sensitivity (Buhard *et al.*, 2004). We utilized this new recommended methodology for this study – a methodology that has been recently validated by our group in the Brazilian population (Campanella *et al.*, 2014).

Other potential causes of differing results may be associated with tumor aggressiveness. Mayer *et al.* (2002) assessed 111 TGCT cases and 11 of these were refractory to treatment. The

authors found a higher rate of MSI in the refractory cases compared to treatment-responsive cases (45 vs. 6%, $p = 0.001$). It is noteworthy that among refractory cases, the MSI group achieved better median progression free-survival (26 months vs. 6 months, $p = 0.05$). Although, it is not clear how TGCT was treated in both groups. One hundred unselected cases from study by Mayer *et al.* were used later as a control cohort in the study by Honecker *et al.* (2009) (Table 2). Velasco *et al.* (2008) assessed the MMR enzyme expression and MSI in 162 TGCT patients, with a majority having seminomas. The authors found a negative correlation between MSI and survival. However, the rate of advanced and high-risk disease was unknown, which may lead to a misinterpretation of the results.

Table 3 Summary of studies assessing *BRAF* mutation in testicular germ cell tumors (TGCT)

Author, year	Sample (N) Total/ Refractory	Age (range)	Country	<i>BRAF</i> mutation (%) Total/ Refractory
McIntyre <i>et al.</i> (2005)	65/NR	NR	United Kingdom	0/NA
Sommerer <i>et al.</i> (2005)	62/0	NR	Germany	5/NA
Honecker <i>et al.</i> (2009)	135/35	14–66	Germany and Netherlands	7/26
Piulats <i>et al.</i> (2010)	75/25	16–56	Spain	0/0
Mayer <i>et al.</i> (2011) ^a	12/NR	17–48	Germany and Netherlands	28/NA
Masque-Soler <i>et al.</i> (2011)	66/15	1–20	Germany	0/0
Satpute <i>et al.</i> (2013)	59/33	NR	United States	0/0
Feldman <i>et al.</i> (2014)	70/46	14–60	United States	0/0
Current study	132/20	1–63	Brazil and Portugal	0/0

NR: not reported; NA: not applicable. ^aLate relapses.

Despite these data, Olasz *et al.* (2005) studied 15 cases of treatment refractory and 36 treatment-responsive TGCT cases and although they found MSI in 31.4% of patients, none of cases was MSI-high and there was no correlation with any clinical variable, including resistance to treatment. Interestingly, Piulats *et al.* (2009) did not identify the MSI in a nude mice model with xenografts of germ cell tumor refractory to cisplatin.

Another biomarker analyzed in the present study was the *BRAF* V600E mutation. Herein, we did not identify any case or cell line harboring a *BRAF* mutation, in accordance with the majority of the studies that addressed this issue after McIntyre *et al.* (2005) (Table 3). Nevertheless, some authors have reported *BRAF* mutations in TGCT, with a frequency up to 28% (Table 3). Interestingly, Honecker *et al.* (2009) found that resistant tumors had a higher incidence of *BRAF* V600E mutations compared with unselected tumors (26 vs. 1%, $p = 0.0001$) and, for the first time, a correlation between *BRAF* V600E and cisplatin resistance was reported. Nevertheless, Piulats *et al.* also assessed *BRAF* mutation status in 75 men with germ cell tumors; 84% of cases were non-SE and one-third of all cases were refractory to cisplatin. None of these cases exhibited a *BRAF* V600E mutation (Piulats *et al.*, 2010). More recently, Satpute *et al.* (2013) analyzed 59 germ-cell tumors, among these more than half were treatment-refractory, and no *BRAF* mutations were identified. Additionally, Feldman *et al.* (2014) found no *BRAF* mutations in 46 GCT refractory cases, the largest number of refractory cases already reported. Interestingly, the TCAM2 seminoma cell line was initially reported to exhibit a *BRAF* mutation (de Jong *et al.*, 2008). However, other studies did not corroborate these findings even in other germ cell tumor cell lines (Goddard *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2014).

Our study is a retrospective analysis and therefore has an inherent selection bias. However, our data are consistent with findings from other studies that show MSI and *BRAF* mutations are not present in TGCT. This series of 150 cases is very heterogeneous and representative of several types of germ cell tumor histologies, clinical staging, and response rates to chemotherapy. The predominance of advanced disease and non-SE histologies

in our series differs from the classical literature, where seminomas and stage I disease are the most common (Ries *et al.*, 2007). Our hospital is a reference center for TGCT, and affiliated with the Brazilian Childhood Germ Cell Tumor Study Group, a consortium developed to standardize the diagnostic assessment and multidisciplinary treatment of TGCT patients in Brazil (Lopes *et al.*, 2009). For this reason, our series might be biased by more advanced cases. However, the several risk groups were well represented in the study.

In conclusion, contrasting to other solid tumors, microsatellite instability and *BRAF* V600E mutation are not present in testicular germ cell tumors, even in treatment-refractory cases. It is necessary to target other pathways and explore other aspects of genetics and epigenetics in TGCT to better understand its biology and identify new theranostic biomarkers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financially supported by Barretos Cancer Hospital internal research funds (PAIP). The authors acknowledge Dr. Laura Musselwhite for her critical review of the manuscript.

AUTHORS' CONTRIBUTION

RMR and FMC designed the study. FMC, LQ and HM contributed to data recovery and management. CSN, ECAS and FB retrieved the biologic samples and prepared them for the genetic analysis. The genetic analysis was performed by FMC, AHL, and CMSM, under supervision of DOV and RMR. The cell lines were evaluated by AHL, under supervision of DOV and RMR. GNB, AHL, DOV, and RMR participated in MSI analysis and mutational analysis of *BRAF*. FMC, DOV, LFL, and RMR drafted the manuscript, analyzed the data, and critically reviewed and discussed the results. All authors read and accepted the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors have no competing interests.

ETHICS APPROVAL

The study was conducted following national and institutional ethical policies, and it was previously approved by the Barretos Cancer Hospital Ethical Committee (protocol CAEE 12297713.0.0000.5437). The ethical committee classified this study as having minimal risk, ensuring confidentiality, and not resulting in any clinical influences because changes in treatment or genetic counselling for the participants and their families. For these reasons, the ethical committee waived the need for consent.

REFERENCES

- Basto D, Trovisco V, Lopes JM, Martins A, Pardal F, Soares P & Reis RM. (2005) Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 207–210.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN & Srivastava S. (1998) A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248–5257.

- Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA & Moller H. (2006) Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nat Clin Pract Urol* 3, 532–543.
- Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A & Hamelin R. (2004) Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 20, 251–257.
- Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R & Reis RM. (2014) Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur J Hum Genet* 22, 875–880.
- Campanella NC, Penna V, Ribeiro G, Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C & Reis RM. (2015) Absence of microsatellite instability in soft tissue sarcomas. *Pathobiology* 82, 36–42.
- Carethers JM, Koi M & Tseng-Rogenski SS. (2015) EMAS is a form of microsatellite instability that is initiated by inflammation and modulates colorectal cancer progression. *Genes (Base)* 6, 185–205.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507–2516.
- Devaraj B, Lee A, Cabrera BL, Miyai K, Luo L, Ramamoorthy S, Keku T, Sandler RS, McGuire KL & Carethers JM. (2010) Relationship of EMAS and microsatellite instability among patients with rectal cancer. *J Gastrointest Surg* 14, 1521–1528.
- Einhorn LH. (2002) Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4592–4595.
- Faulkner SW & Friedlander ML. (2000) Microsatellite instability in germ cell tumors of the testis and ovary. *Gynecol Oncol* 79, 38–43.
- Feldman DR. (2015) Update in germ cell tumours. *Curr Opin Oncol* 27, 177–184.
- Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS & Solit DB. (2014) Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 20, 3712–3720.
- Goddard NC, McIntyre A, Gilbert D, Kitazawa S & Shipley J. (2010) No evidence for V600E BRAF mutation in the seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosom Cancer* 49, 963–966.
- Gryfe R. (2009) Inherited colorectal cancer syndromes. *Clin Colon Rectal Surg* 22, 198–208.
- Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanen A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Flejoux JF & Duval A. (2008) Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer* 95, 121–132.
- Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJ, Stoop H, van Gurp RJ, Oechsle K, Steyerberg E, Hartmann JT, Dinjens WN, Oosterhuis JW, Bokemeyer C & Looijenga LH. (2009) Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27, 2129–2136.
- Huddart RA, Wooster R, Horwich A & Cooper CS. (1995) Microsatellite instability in human testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 72, 642–645.
- IGCCCG. (1997) International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol* 15, 594–603.
- Imai K & Yamamoto H. (2008) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29, 673–680.
- de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, Hersmus R, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, van Druenen E, Beverloo HB, Schneider DT, Sherlock JK, Baeten J, Kitazawa S, van Zoelen EJ, van Roozendaal K, Oosterhuis JW & Looijenga LH. (2008) Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosom Cancer* 47, 185–196.
- Kinzler KW & Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.
- Kinzler KW & Vogelstein B. (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761–763.
- Kolch W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351(Pt 2), 289–305.
- Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, *et al.* (2015) PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372, 2509–2520.
- Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellaro MJ, Melaragno R, Vianna SM, Lopes PA, Mendonca N, de Assis Almeida MT, Sonaglio V, Ribeiro KB, Santana VM, Schneider DT & de Camargo B. (2009) Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91. *J Clin Oncol* 27, 1297–1303.
- Lorch A, Beyer J, Bascoul-Mollevi C, Kramar A, Einhorn LH, Necchi A, Massard C, De Giorgi U, Flechon A, Margolin KA, Lotz JP, Germa Lluch JR, Powles T & Kollmannsberger CK. (2010) Prognostic factors in patients with metastatic germ cell tumors who experienced treatment failure with cisplatin-based first-line chemotherapy. *J Clin Oncol* 28, 4906–4911.
- Lothe RA, Peltomaki P, Tommerup N, Fossa SD, Stenwig AE, Borresen AL & Nesland JM. (1995) Molecular genetic changes in human male germ cell tumors. *Lab Invest* 73, 606–614.
- Martinho O, Gouveia A, Viana-Pereira M, Silva P, Pimenta A, Reis RM & Lopes JM. (2009a) Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs. *Histopathology* 55, 53–62.
- Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, Pardal F, Amorim J, Mackay A, Milanezi F, Tamber N, Fenwick K, Ashworth A, Reis-Filho JS, Lopes JM & Reis RM. (2009b) Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer* 101, 973–982.
- Masque-Soler N, Szczepanowski M, Leuschner I, Vokuhl C, Haag J, Calaminus G & Klapper W. (2011) Absence of BRAF mutation in pediatric and adolescent germ cell tumors indicate biological differences to adult tumors. *Pediatr Blood Cancer* 59, 732–735.
- Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C & Looijenga LH. (2002) Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62, 2758–2760.
- Mayer F, Wermann H, Albers P, Stoop H, Gillis AJ, Hartmann JT, Bokemeyer CC, Oosterhuis JW, Looijenga LH & Honecker F. (2011) Histopathological and molecular features of late relapses in non-seminomas. *BJU Int* 107, 936–943.
- McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R & Shipley J. (2005) Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. *Neoplasia* 7, 1047–1052.
- Mead GM, Cullen MH, Huddart R, Harper P, Rustin GJ, Cook PA, Stenning SP & Mason M. (2005) A phase II trial of TIP (paclitaxel, ifosfamide and cisplatin) given as second-line (post-BEP) salvage chemotherapy for patients with metastatic germ cell cancer: a medical research council trial. *Br J Cancer* 93, 178–184.
- Michaloglou C, Vredevelde LC, Mooi WJ & Peeper DS. (2008) BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 27, 877–895.
- Olasz J, Mandoky L, Gecki L, Bodrogi I, Csuka O & Bak M. (2005) Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors. *Anticancer Res* 25, 4319–4324.
- Piulats JM, Nadal M, Martinez-Iniesta M, Puertas S, Gonzalez S, Vidal A, Condom E, Germa-Lluch J, Garcia Del Muro X & Villanueva A. (2009) Nude mice model of primary human

- nonseminoma germ cell tumors to study biology and resistance to cisplatin treatment. In: *ASCO Annual Meeting Proceedings*, Vol. 27, p. e16143.
- Piulats JM, Vidal A, Villanueva A, Munoz C, Pisa A, Nadal M, Germa-Lluch J, Condom E & Garcia del Muro X. (2010) MLH1 and BRAF status analysis in metastatic germ cell tumors. In: *ASCO Annual Meeting Proceedings*, Vol. 28, p. e15092.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B & Velculescu VE. (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934.
- Ries L, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD & Horner M-J. (eds) (2007) SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988–2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD, 2007, 165–170.
- Satpute SR, Koster R, Nathanson KL, Vaughn DJ, Albany C, Einhorn LH & Hanna NH. (2013) Retrospective, correlative study of BRAF mutation V600E in testicular cancer patients. In: *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 31. Amer Soc Clinical Oncology 2318 Mill Road, STE 800, Alexandria, VA 22314, USA.
- Shah SN, Hile SE & Eckert KA. (2010) Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res* 70, 431–435.
- Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C & Tannapfel A. (2005) Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 113, 329–335.
- Velasco A, Riquelme E, Schultz M, Wistuba II, Villarroel L, Koh MS & Leach FS (2004) Microsatellite instability and loss of heterozygosity have distinct prognostic value for testicular germ cell tumor recurrence. *Cancer Biol Ther* 3, 1152–1158; discussion 1159–1161.
- Velasco A, Corvalan A, Wistuba II, Riquelme E, Chuaqui R, Majerson A & Leach FS. (2008) Mismatch repair expression in testicular cancer predicts recurrence and survival. *Int J Cancer* 122, 1774–1777.
- Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, Stavale JN, Hargrave D, Jones C & Reis RM. (2011) Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. *PLoS ONE* 6, e20588.
- Vladusic T, Hrascan R, Kruslin B, Pecina-Slaus N, Perica K, Bicanic A, Vrhovac I, Gamulin M & Franekic J. (2014) Histological groups of human postpubertal testicular germ cell tumours harbour different genetic alterations. *Anticancer Res* 34, 4005–4012.
- Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, Cunha TR, Fava G, Colaiacovo W, Melani A, Fregnani JH, Reis RM & Guimaraes DP. (2014) KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncol Rep* 32, 1419–1426.