

**MARCELO LUIZ BENDHACK**

**FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA  
COMO MARCADOR TUMORAL  
PARA NEOPLASIAS SEMINOMATOSAS DO TESTÍCULO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos A. Rocha

Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

**CURITIBA**

**1999**

Bendhack, Marcelo Luiz  
Fosfatase alcalina placentária como marcador tumoral para neoplasias  
seminomatosas do testículo. – Curitiba, 1999.

f. 51, il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos A. Rocha.  
Dissertação (Mestrado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná.

1. Câncer do testículo. 2. Marcador tumoral. 3. PLAP.

I. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DE  
TESE/DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: **Marcelo Luiz Bendhack**

Título da Tese: "FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA COMO  
MARCADOR TUMORAL PARA NEOPLASIAS SEMINOMATOSAS DO  
TESTÍCULO"


CONCEITOS EMITIDOS:

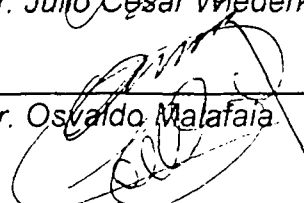
Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkher	- Conceito emitido	A	Equivalência	10
Prof. Dr. Osvaldo Malafaia	- Conceito emitido	1	Equivalência	10
Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho	- Conceito emitido	A	Equivalência	10

Conceito Final de Avaliação:

*Aprovado com o conceito final A e equivalência de 10*

Curitiba, 28 de janeiro de 1999

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkher

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho

DEDICO ESTE TRABALHO

À MINHA ESPOSA CAROLINA  
À MINHA FILHA GABRIELA  
AOS MEUS PAIS LILIAN E DONARD

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha, orientador deste trabalho, pela disponibilidade imediata, estímulo e influência marcantes.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, o estímulo e apoio incondicionais à formação a nível de Pós-graduação nesta Universidade.

Ao Prof. Dr. Rolf Ackermann, Diretor do Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Alemanha, a indicação do tema e os seus múltiplos e interessantes comentários. Também o seu apoio incansável à realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Hans Bojar, Diretor do Instituto de Química Oncológica da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Alemanha, os importantes comentários e também à Sra. Vossen, técnica do mesmo Instituto, pela participação dos valores obtidos e pelo trabalho em equipe, o qual foi indispensável.

Ao CNPq, o apoio a esta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 MARCADORES TUMORAIS PARA TUMORES DE CÉLULAS</b>	
<b>GERMINATIVAS DO TESTÍCULO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1 Isoenzimas da fosfatase alcalina placentária (PLAP).....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2 Métodos de determinação.....</b>	<b>9</b>
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 PACIENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 DETERMINAÇÃO DA PLAP.....</b>	<b>12</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 ESTÁDIO E DISTRIBUIÇÃO POR LATERALIDADE.....</b>	<b>17</b>
<b>4.3 VALORES SÉRICOS DA PLAP PARA PACIENTES COM</b>	
<b>TUMORES TESTICULARES.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 AFP PARA TUMORES TESTICULARES.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5 β-hCG PARA TUMORES TESTICULARES.....</b>	<b>21</b>
<b>4.6 TRATAMENTO DE PACIENTES COM VALORES SÉRICOS</b>	
<b>ELEVADOS DA PLAP NO PRÉ-OPERATÓRIO.....</b>	<b>23</b>
<b>4.7 PLAP E ESTÁDIO PRÉ-OPERATÓRIO.....</b>	<b>25</b>
<b>4.8 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP ENTRE PACIENTES</b>	
<b>COM PATOLOGIAS UROLÓGICAS BENIGNAS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.9 VALORES SÉRICOS DA PLAP PARA FUMANTES E</b>	
<b>NÃO FUMANTES.....</b>	<b>26</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>

<b>5.1 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PLAP EM RELAÇÃO AO TIPO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 ELEVAÇÃO DA PLAP NA DEPENDÊNCIA DO ESTÁDIO TUMORAL.....</b>	<b>33</b>
<b>5.3 VALORES SÉRICOS DA PLAP NA DEPENDÊNCIA DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 INFLUÊNCIA DO HÁBITO DE FUMAR SOBRE OS VALORES SÉRICOS DA PLAP.....</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - DISTRIBUIÇÃO POR IDADE.....	11
<b>TABELA 2</b> - DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES.....	12
<b>TABELA 3</b> - ESQUEMA DE PIPETAGEM PARA A DETERMINAÇÃO DO LW E HW.....	13
<b>TABELA 4</b> - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA E NÚMERO DE PACIENTES.....	17
<b>TABELA 5</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM TUMOR DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO RELACIONADA AO ESTÁDIO CLÍNICO. CAVALLI, et al (1980).....	17
<b>TABELA 6</b> - HISTOLOGIA E ESTÁDIO CLÍNICO DE TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO. CAVALLI, et al (1980).....	18
<b>TABELA 7</b> - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL PLAP.....	19
<b>TABELA 8</b> - VALORES SÉRICOS DA PLAP NO PRÉ- E PÓS-OPERATÓRIO CORRESPONDENDO AO ESTÁDIO CLÍNICO. CAVALLI, et al (1980).....	20
<b>TABELA 9</b> - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL AFP.....	21
<b>TABELA 10</b> - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL $\beta$ -HCG.....	22
<b>TABELA 11</b> - ELEVAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DOS MARCADORES PLAP, AFP E $\beta$ -HCG PARA TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO.....	22

<b>TABELA 12</b> - PACIENTES COM ELEVAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DOS VALORES SÉRICOS DA PLAP (N = 17), ESTÁDIO CLÍNICO, CAVALLI, et al (1980) E CLASSIFICAÇÃO DE INDIANA. BIRCH, et al (1986), TRATAMENTO E EVOLUÇÃO DA DOENÇA.....	24
<b>TABELA 13</b> - VALORES SÉRICOS DA PLAP ELEVADOS NO PRÉ-OPERATÓRIO E ESTÁDIO CLÍNICO. CAVALLI, et al (1980).....	25
<b>TABELA 14</b> - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP PARA PACIENTES COM DOENÇA UROLÓGICA BENIGNA.....	26
<b>TABELA 15</b> - VALORES SÉRICOS PRÉ-OPERATÓRIOS DA PLAP E HÁBITO DE FUMAR.....	26
<b>TABELA 16</b> - VALORES SÉRICOS PRÉ-OPERATÓRIOS NORMAIS DA PLAP E HÁBITO DE FUMAR.....	26
<b>TABELA 17</b> - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MARCADOR TUMORAL PLAP PARA TUMORES SEMINOMATOSOS DO TESTÍCULO.....	30

## LISTA DE ABREVIACOES

AFP	Alfa-feto-proteína
AP	Fosfatase alcalina tecido inespecífica ou hepática (fígado, ossos e rins)
β-hCG	Subunidade β da gonadotrofina coriônica humana
CEA	Antígeno carcinoembrionário
DCC	Genes ‘deleted in colon cancer’
DDR	República Democrática Alemã
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EIA	“Enzyme-antigen-immuno-assay”
ELISA	“Enzyme-linked-immunosorbent-assay”
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HEP	Metástases hepáticas
HLA	Antígenos de histocompatibilidade
HW	Valor principal
IAP	Fosfatase alcalina intestinal
LDH	Desidrogenase láctica
LW	Valor branco
mAbs	Anticorpo monoclonal
Naftol-AS-MX-fosfato	{(3-hidroxi-2-ácido naftóico 2,4-dimetilanilida)-fosfato}
NED	Sem sinais da presença de doença ativa
NSGCT	Tumor de células germinativas do testículo de apenas um tipo histológico
pAbs	Anticorpos policlonais
PE	Quimioterapia com cisplatina e etoposide
PEB	Quimioterapia com cisplatina, etoposide e bleomicina
PEI	Quimioterapia com cisplatina, etoposide und ifosfamida
PLAP	Fosfatase alcalina placentária
PIV	Quimioterapia com cisplatina, ifosfamida und vinblastina
PUL	Metástases pulmonares
RIA	“Radio-immuno-assay”
ROC	“Receiver operating characteristic”
RLA	Linfadenectomia retroperitoneal
T1/2	Tempo de meia vida
TGT	Tumor de células germinativas do testículo
TNM	Classificação de tumores malignos: T = Tumor, N = Linfonodos, M = Metástases à distância
UICC	Unio Internationalis Contra Cancrum
WHO	World Health Organization

## RESUMO

Alfa-feto-proteína (AFP) e a gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG) são marcadores tumorais clinicamente importantes para o diagnóstico e controle de tratamento dos tumores de células germinativas do testículo (TGT). Com exceção do  $\beta$ -hCG, que serve como marcador em 10 a 20 % dos seminomas, não existe para o tipo histológico mais freqüente de TGT nenhum marcador. O valor clínico das isoenzimas da fosfatase alcalina placentária (PLAP) tem sido discutido de maneira controversa. No presente estudo foram avaliadas a sensibilidade, a especificidade e a importância deste marcador para como parâmetro de controle para os TGT. Entre agosto de 1989 e dezembro de 1994 foram determinados os valores séricos dos marcadores tumorais AFP,  $\beta$ -hCG e PLAP em 136 pacientes (média de idade de 35,5 anos), os quais foram tratados na Clínica Urológica do Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf. A determinação da PLAP foi realizada enzimaticamente em 480 amostras do soro. Nesta reação naftol-AS-MX-fosfato {(3-hidroxi-2-ácido naftóico 2,4-dimetilanilida)-fosfato} foi defosforilado a um produto fluorescente sob pH básico (10.2). Valores menores que 3,75 $\mu$ mol/l foram considerados como normais. A média do tempo de seguimento para os pacientes com TGT e PLAP elevado foi de 30 meses. Sessenta e oito pacientes apresentaram um TGT e 60 uma doença benigna dos órgãos da bolsa escrotal ou do trato urinário. Entre os 68 pacientes se encontravam 33 com seminomas puros assim como 22 com tumores mistos que continham elementos seminomatosos. A maior sensibilidade foi verificada entre pacientes com seminomas puros (40,7 %), seguido de uma sensibilidade de 37,5 % para os tumores mistos com elementos seminomatosos. Não se verificou nenhuma correlação entre a magnitude dos valores séricos da PLAP e o estágio tumoral. 16 dos 17 pacientes com níveis séricos da PLAP elevados pré-operatoriamente demonstraram uma diminuição destes correspondente à evolução da doença. O seguimento não foi possível para um paciente. 16,6% dos pacientes com doenças benignas dos órgãos da bolsa escrotal ou do trato urinário apresentaram resultados falsos positivos. Caso PLAP venha a ser utilizada como controle no seguimento após uma terapia primária, o hábito de fumar do paciente necessita ser considerado para evitar erros de interpretação. Este hábito pode determinar valores falso positivos. Relevante é a cinética de diminuição deste marcador. O método escolhido para a determinação da PLAP pode influenciar a sensibilidade e especificidade. Devido aos resultados apresentados neste estudo, PLAP pode ser considerada, com uma sensibilidade de 41 % e uma especificidade de 83,3 %, como marcador potencial no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com seminomas puros ou tumores mistos com componentes seminomatosos. Apesar da limitação da especificidade, muitos estudos apóiam a utilização da PLAP para os seminomas, tumores estes sem marcadores tumorais mais sensíveis.

## ABSTRACT

The study of alpha-fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin (hCG) is clinically useful in the diagnosis and follow-up of patients with germ cell testis cancer. For seminoma as the most frequent testis cancer, however, no sensitive or specific tumor marker but hCG, which is preoperatively elevated in about only 10 to 20 % of the patients, is available. The role of the isozymes of the tumor marker placental alkaline phosphatase (PLAP) remains controversial. This study aims the determination of the specificity and sensitivity of PLAP among these patients. From August 1989 until December 1994, 136 patients (mean 35,5 years old), treated at the Department of Urology, University of Düsseldorf, underwent tumor marker evaluations (AFP, hCG and PLAP). A sensitive enzymatic assay involving the fluorogenic substrate naphthol AS-MX phosphate {(3-hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilid)-phosphate} under pH of 10,2 was utilized to determine the levels of PLAP in a total of 480 serum probes. This reaction of dephosphorilation under pH of 10,2 allows the formation of a fluorogenic product. Values under 3,75  $\mu\text{mol/l}$  were considered normal. Patients with testis cancer and preoperative elevated PLAP were followed (mean follow-up of 30 months). Sixty-eight patients had a germ cell tumor of the testis and 60 patients a benign disease of the scrotum or urinary tract. 33 and 22 out of the 68 patients with testis cancer had pure seminomas and mixed tumors with seminomatous elements, respectively. The highest incidence (40,7%) was among pure seminomas, followed by composed tumors with seminomatous elements (37,5%). No correlation between the magnitude of elevation and stage could be seen. 16 of the 17 patients with preoperative elevated PLAP-levels demonstrated a decrease along with therapy according to clinical findings. One patient has lost to follow-up. Among patients with benign diseases of the scrotum and of the urinary tract, 16,6% showed false positive results. If PLAP is employed in the follow-up after primary therapy, the smoking habits of the patients should be considered in order to avoid false interpretations. Smoking habit may lead to false positive values. The sensitivity and specificity depend on the method of determination of PLAP. According to the results of this study PLAP may be considered, with a sensitivity of 41 % and a specificity of 83,3 %, a potential marker in the diagnosis and follow-up of patients with pure seminomas and composed tumors with seminomatous elements. Although a limitation of specificity could be observed, several studies support the determination of PLAP for seminomas, tumors that do not have markers with higher sensitivity.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O tumor maligno do testículo representa doença principalmente do adulto jovem, sendo considerada a doença neoplásica maligna mais freqüente dos homens entre 20 e 30 anos de idade (BERNDT e BERNDT, 1982). Devido à faixa etária predominante, torna-se fácil compreender o aspecto sócio-econômico importante associado ao tumor do testículo, pois os homens com esta doença se encontram - no momento do diagnóstico - na fase de formação profissional e/ou familiar ou início da atividade de trabalho.

Para os tumores de células germinativas do testículo (TGT) não seminomatosos os marcadores tumorais gonadotrofina coriônica humana (hCG) e alfa-fetoproteína (AFP) são de grande valor para o diagnóstico e como parâmetros de controle (MANN, 1990). A desidrogenase láctica (LDH) encontra-se elevada sobretudo em estádios de doença avançada (LIPPERT e JAVADPOUR, 1981; CANAL et al., 1984), no entanto possui baixa especificidade (MANN, 1990; BARTLETT et al., 1991; KOSHIDA et al., 1991).

Os tumores seminomatosos representam cerca de 40 % dos TGT. Com exceção da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e/ou sua subunidade  $\beta$  ( $\beta$ -hCG), a qual está elevada em cerca de 20 % dos seminomas puros, não existe para os seminomas nenhum outro marcador tumoral com sensibilidade e especificidade aceitáveis. A fosfatase alcalina placentária (PLAP) possivelmente apresenta para os seminomas valor diagnóstico ainda não extensivamente estudado e pode ser útil também como parâmetro evolutivo (MANN, 1990).

Em contraposição a quase todos os tumores malignos, pacientes com tumores do testículo podem ser atualmente curados também na fase de doença metastática avançada. Apesar deste resultado, ainda hoje cerca de 15 % destes pacientes morrem em consequência desta neoplasia. Assim sendo, conceitos terapêuticos que, avaliando o risco da doença, permitam evitar um tratamento extremo para pacientes com bom prognóstico, e que ajudem a indicar uma terapia máxima - e assim curativa - para pacientes com alto risco, são extremamente importantes (BENDHACK, 1996). Neste sentido os marcadores tumorais representam método auxiliar indispensável.

No presente estudo procura-se identificar a sensibilidade e especificidade da PLAP como marcador tumoral no diagnóstico e acompanhamento dos tumores testiculares seminomatosos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MARCADORES TUMORAIS PARA TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO

Há muito tempo se procura identificar marcadores que indiquem a presença de um processo tumoral. Estas substâncias, denominadas de marcadores tumorais, se apresentam freqüentemente como consequência da transformação celular maligna. Elas podem ser identificadas histologicamente no tecido tumoral – marcadores celulares, p. ex., receptores hormonais do câncer da mama – ou em líquidos corporais – marcadores humorais, p. ex., antígenos associados a tumores, hormônios e marcadores induzidos pelo tumor (proteína de fase aguda). A determinação de marcadores tumorais séricos representou um grande desenvolvimento para a oncologia (HEISE et al., 1994).

Antígenos associados a tumores são produzidos pelos próprios tumores e secretados no soro. Nesta classe encontram-se, dentre outros, antígenos oncofetais como AFP e antígenos tumorais definidos por anticorpos monoclonais (mAbs) como p. ex., CA 125. Também determinados hormônios como  $\beta$ -hCG podem ser produzidos em grande concentração pelo tecido tumoral de células germinativas (HEISE et al., 1994).

Os marcadores tumorais não são, com poucas exceções, específicos de determinados órgãos. Todavia se conseguiu, por meio da introdução de novos marcadores tumorais definidos por anticorpos, melhorar a especificidade em relação ao órgão (HEISE et al., 1994). Por meio da determinação quantitativa com técnicas radioimunológicas verificou-se que a sensibilidade depende da pureza do marcador tumoral em questão – AFP e  $\beta$ -hCG, enquanto que a especificidade depende da qualidade dos anticorpos (ACKERMANN, 1979).

Idealmente os marcadores tumorais devem apresentar as seguintes propriedades (HEISE et al., 1994):

- 1 100 % de diferenciação entre indivíduos sãos e doentes;
- 2 definição de todos os pacientes com tumor, se possível em estágio inicial;
- 3 especificidade em relação ao órgão envolvido, permitindo assim identificação da localização do tumor;
- 4 correlação entre a magnitude de elevação do marcador livre circulante no soro com o estágio tumoral próprio;

- 5 indicação de todas as alterações da evolução do processo quando sob terapia e seguimento;
- 6 informações prognósticas relacionadas ao grau de elevação do marcador.

Caso as duas primeiras condições se façam presentes, a utilização do marcador em questão durante um *screening* seria possível e racional. Sendo a gênese tumoral muito complexa, provavelmente tal marcador tumoral não exista.

A determinação de marcadores tumorais auxilia a definir condutas terapêuticas precocemente, não sendo, no entanto, adequados para detecção precoce de tumores em pessoas sadias (*screening*) e necessitam ser consideradas em associação com outros achados de exames e com a evolução clínica da doença (MANN, 1990).

No entanto, alguns marcadores tumorais são utilizados atualmente para o controle de pacientes considerados como membros de grupos de risco. Isto é especialmente válido para o antígeno prostático específico (PSA), cuja determinação é sugerida para homens com idade superior a 45 anos para o diagnóstico precoce do carcinoma da próstata (CARTER e PARTIN, 1998). O PSA determinado de rotina aumenta a detecção do carcinoma prostático mais que o exame dígito-retal, aumenta o valor preditivo positivo do exame retal e eleva a taxa de detecção de carcinomas restritos ao órgão e significantes em termos de tamanho e diferenciação (CARTER e PARTIN, 1998). O método mais eficiente para a detecção desta doença é, no entanto, a associação do exame dígito-retal e a dosagem do PSA, no sentido de determinar o risco da presença da doença.

Progressivamente foram descobertos paralelos entre tecido tumoral e tecido embrionário, e assim relações entre oncogênese e ontogênese puderam ser estabelecidas. Especialmente os tumores de células germinativas, aos quais os tumores malignos do testículo pertencem, apresentam tendência à expressão de antígenos oncofetais. Isto faz com que possam servir como marcadores tumorais por estarem intimamente relacionados com a origem e crescimento destes tumores (HEISE et al., 1994).

Os principais marcadores de tumores masculinos de células germinativas são AFP,  $\beta$ -hCG e LDH. Eles são caracterizados por sensibilidade satisfatória (probabilidade do teste ser positivo quando da presença de um tumor, isto é, verdadeiro positivo) e especificidade (frequência de verdadeiros negativos entre indivíduos sadios).

Para os TGT não seminomatosos ambos os marcadores  $\beta$ -hCG e AFP são de alto valor para o diagnóstico e seguimento. Valores elevados de AFP excluem a presença de um seminoma puro (MANN, 1990). Em contrapartida, em cerca de 20 % dos seminomas puros encontram-se valores elevados de hCG/ $\beta$ -hCG, a qual é produzida por células sinciciotrofoblásticas (MANN, 1990). Já para os seminomas ainda não se dispõe de nenhum marcador sensível e específico (MANN, 1990). Tendo-se excluído outras causas de elevação dos marcadores tumorais AFP e  $\beta$ -hCG em homens jovens sem achado suspeito a nível do testículo, valores aumentados destes marcadores podem ser primeiro indício da presença de tumor extragonadal de células germinativas (BURT e JAVADPOUR, 1981). A LDH está elevada sobretudo em estádios avançados dos tumores testiculares.

Fator fundamental para o uso adequado de marcadores tumorais é a consequência terapêutica que o resultado patológico deste exame pode causar. Neste contexto, parâmetros que possam indicar a evolução da doença e precocemente apontar com segurança uma recidiva são de grande importância (MANN, 1990). Marcadores tumorais freqüentemente definem recidivas e/ou metástases mais precocemente do que métodos de imagem. Esta diferença de tempo se encontra, em média, na ordem de 3 a 6 meses e pode ser, em casos particulares, até maior do que um ano (HEISE et al., 1994).

Os marcadores tumorais  $\beta$ -hCG e AFP são dois marcadores independentes entre si, que se originam de estruturas histologicamente distintas. Basicamente os dois marcadores precisam ser determinados simultaneamente (MANN, 1990).

A freqüência de valores elevados, e não a magnitude do valor sérico, é dependente do estágio tumoral (estádio I 45 %, II 55 % e III 84 %) (MANN et al., 1980). Através da determinação de marcadores tumorais se permite definir melhor o estágio clínico da doença (BURT e JAVADPOUR, 1981).

A taxa de redução pós-operatória de um marcador sérico (tempo de meia vida biológica) auxilia a definir se houve a retirada completa do tumor através de uma orquiectomia e/ou linfadenectomia (HEISE et al., 1994). No caso de retirada completa do tumor testicular produtor de marcador, a concentração de  $\beta$ -hCG decresce fisiologicamente em 1 a 3 dias e a de AFP em 4 a 6 dias até os níveis de referência (MANN, 1990). Tempo de meia vida prolongado pode ser causado por catabolismo alterado de forma molecular também modificada de hCG produzida pelo tumor, através de função hepática ou renal prejudicada, ou mesmo pela presença de tumor residual. Por motivos de segurança, os marcadores deveriam ser determinados duas vezes

antes da orquiectomia, de duas a três vezes durante a primeira semana pós-operatória para a definição da taxa de redução, e semanalmente até a normalização, quando sob regimes de quimioterapia ou irradiação (MANN, 1990).

Devido à necrose tumoral pode ocorrer, sob quimioterapia, aumento transitório e rápido da  $\beta$ -hCG ou AFP (MANN, 1988). Tal liberação do marcador tumoral foi observada dentro de 8 dias para a  $\beta$ -hCG, e em até 21 dias após a quimioterapia para a AFP. Esta liberação do marcador não indica, nestas circunstâncias, resistência ao tratamento (MANN, 1990).

A elevação dos valores pré-operatórios, isto é, uma nova elevação da concentração do marcador após o tratamento apresenta, para certos marcadores, valor prognóstico. Especialmente no seguimento dos pacientes, um novo aumento ou a permanência de valores elevados está intimamente relacionado ao prognóstico. Os valores preditivos positivo e negativo se apresentam, nesta situação, como parâmetros importantes para interpretação dos resultados (HEISE et al., 1994).

### **2.1.1 Isoenzimas da fosfatase alcalina placentária (PLAP)**

As fosfatases, ou fosfatases protéicas, são enzimas que retiram um grupo fosfato de uma proteína através de hidrólise (ALBERTS et al., 1995). Existem muitas famílias de fosfatases protéicas: algumas são enzimas altamente especializadas e retiram grupos fosfato de somente uma ou poucas proteínas; outras são relativamente inespecíficas, e atuam sobre amplo espectro de proteínas (ALBERTS et al., 1995). As fosfatases são classificadas, de acordo com a sua ação ótima, em alcalinas ou ácidas. As fosfatases alcalinas agem sob um pH de 9 a 10. Trata-se de proteínas de membrana de diferentes células, p. ex., granulócitos, osteoblastos, células endoteliais do fígado e vasos sanguíneos. Elas podem ser liberadas da membrana celular e medidas no sangue de indivíduos saudáveis (KOSHIDA e WAHREN, 1990).

As fosfatases alcalinas humanas compreendem três enzimas geneticamente distintas: as fosfatases alcalinas do fígado ou tecido inespecíficas (AP), as fosfatases alcalinas intestinais (IAP) e as fosfatases alcalinas placentárias (PLAP) (FISHMAN, 1974).

A fosfatase alcalina placentária é composta por duas subunidades, apresenta um peso molecular de 120.000 Daltons (DE GROOTE et al., 1983) e é formada fisiologicamente a partir da décima segunda semana

de gestação por células sincício e citotrofoblásticas da placenta e pode ser detectada no soro da mãe (DE GROOTE et al., 1983). O *locus* genético foi identificado na região 2q34-37 (WENNERBERG et al., 1995). A proteína da PLAP possui 513 aminoácidos (MILLAN, 1986). Em indivíduos sadios do sexo masculino e mulheres não grávidas foi possível a determinação, com o uso de mAbs contra 3 isoenzimas da fosfatase alcalina, da atividade da PLAP em relação à atividade de todas as fosfatases alcalinas. A PLAP é responsável por cerca de 1 % da atividade das fosfatases alcalinas (HIRANO, MATSUMOTO e TANAKA, 1987). Quantidades muito baixas de PLAP foram detectadas também em tecido normal composto por células germinativas normais (CHANG et al., 1980; GOLDSTEIN et al., 1982; HIRANO et al., 1987), no fígado, na mucosa intestinal (HIRANO et al., 1987), pulmão, colo uterino e timo (GOLDSTEIN et al., 1982).

Fishman identificou, no ano de 1968, em um paciente com carcinoma de pulmão, uma isoenzima das fosfatases alcalinas e a designou, a exemplo do nome do paciente, de isoenzima “Regan” (FISHMAN, 1968). Devido a suas propriedades bioquímicas ela foi posteriormente caracterizada como uma das isoenzimas semelhantes à fosfatase alcalina placentária (UCHIDA et al., 1981). Uma segunda isoenzima da fosfatase alcalina placentária foi descrita no ano de 1970 (NAKAYAMA et al., 1970) e designada com isoenzima de “Nagao” ou também como isoenzima semelhante à PLAP.

HIRANO et al. descreveram, no ano de 1987, uma determinação quantitativa de 3 isoenzimas da PLAP em tecido testicular normal e tumoral. No tecido testicular normal a atividade catalítica resultou em 90 % da fosfatase alcalina tecido inespecífica (também verificado no fígado, ossos e rins) (AP), enquanto que a atividade restante era originada pela fosfatase alcalina intestinal (IAP) (5 %) e PLAP ou PLAP-isoenzima (5 %). Em tecidos de tumores seminomatosos foram detectadas grandes quantidades das enzimas acima citadas, sendo que a atividade catalítica da AP e isoenzimas semelhantes à PLAP eram cerca de 10 a 100 vezes e da IAP 2 a 10 vezes mais elevadas do que aquelas do tecido normal. HIRANO et al. relacionaram esta observação a uma expressão genética elevada, no tecido seminomatoso, de todas as fosfatases alcalinas, sobretudo da AP e PLAP (HIRANO, et al., 1987). YAMAMOTO et al. não conseguiram identificar, por métodos de imuno-histoquímica com o auxílio de mAbs, a presença de IAP em todas as amostras de tecido seminomatoso por eles estudadas (YAMAMOTO et al., 1993).

MILLAN e STIGBRAND (1983), assim como WAHREN et al., (1986) identificaram com o auxílio de mAbs de especificidade definida, respectivamente, 4 e 6 diferentes fenótipos de PLAP originárias do

testículo; uma dessas isoenzimas (tipo II) se parecia com a fosfatase alcalina placentária. A isoenzima formada pelo tumor pertencia, no entanto, na sua maior parte, ao tipo I (JEPPSSON et al., 1984; WAHREN et al., 1986).

A PLAP elevada em tecido seminomatoso apresenta mesmo polimorfismo enzimático, como aquele que é identificado em tecido normal (JEPPSSON et al., 1984). Partindo desta observação, permitiu-se a conclusão de que as isoenzimas tumorais estavam aumentadas devido ao aumento da expressão local de um gen já ativado e presente em tecido normal do mesmo órgão, e não através de reexpressão ectópica de um gen específico da placenta (WAHREN et al., 1979; MILLAN et al., 1982; JEPPSSON et al., 1984; WAHREN et al., 1986).

Em células de tecido seminomatoso existem diferentes moléculas de uma enzima semelhante à PLAP, que apresentam sensibilidade parcial ao calor (MILLAN et al., 1982; HIRANO et al., 1987). Desta forma podem existir lado a lado diferentes fenótipos, isto é, subtipos ou isoenzimas semelhantes à PLAP. Nesta pesquisa as substâncias determinadas foram as isoenzimas da fosfatase alcalina placentária estáveis ao tratamento com calor, pois a atividade catalítica das isoenzimas foi medida após a exposição a este agente físico. Neste estudo elas serão designadas simplesmente como PLAP.

PLAP apresenta semelhança eletroforética e imunológica às fosfatases alcalinas derivadas da placenta. Através de separação eletroforética, reações imunocatalíticas diferentes e inativação com determinados aminoácidos, a PLAP pode ser separada da IAP e AP (KOSHIDA, 1990).

PLAP é estável a temperaturas superiores a 65°C (KOSHIDA, 1990; MANN, 1990). Esta enzima permite ser inativada por L-fenilalanina e outros aminoácidos (MANN, 1990). A isoenzima "Regan" é inativada pelos mesmos aminoácidos que inativam a fosfatase alcalina proveniente da placenta, enquanto que a isoenzima "Nagao" somente é inativada através da L-leucina (JEPPSSON et al., 1984).

### **2.1.2 Métodos de determinação**

Para a detecção da PLAP no soro podem ser utilizados “Radio-immuno-assays” (RIA), “Enzyme-linked-immunosorbent-assays” (ELISA) e mais recentemente “Enzyme-antigen-immuno-assays” (EIA) (POTTEK et al., 1995). Nos casos de métodos enzimáticos imunológicos são empregados mAbs ou anticorpos policlonais (pAbs). KOSHIDA e WAHREN (1990) suportam o ponto de vista de que, quando da utilização de mAbs, a taxa de elevação da concentração sérica é mais alta do que quando do uso de pAbs. Os mesmos autores (KOSHIDA e WAHREN, 1990) também acreditam que, devido à homogeneidade comprovada de cerca de 98 % (MILLAN, 1988) entre as isoenzimas da PLAP originadas da placenta e as do testículo, ambas as isoenzimas podem ser identificadas com o mesmo tipo de mAbs. Estudos imunohistoquímicos demonstram, no entanto, que as enzimas tumorais não são idênticas às isoenzimas da placenta em todos os seus aspectos e, devido a isso, a escolha do anticorpo para a detecção é de fundamental importância (MANN, 1990).

MASLOW et al. (1983) descreveram o método catalítico de determinação da PLAP, no qual se utiliza naftol-AS-MX-fosfato fluorescente {(3-hidroxi-2-ácido naftóico 2,4-dimetilanilida)-fosfato}. Este método foi empregado neste estudo e é descrito na parte 3.2.

### **3 PACIENTES E MÉTODO**

---

### 3 PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 PACIENTES

Entre agosto de 1989 e dezembro de 1994, foi realizada a determinação da atividade sérica da PLAP de 136 pacientes tratados no Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, no sentido de verificar a sensibilidade e especificidade da PLAP como marcador tumoral para TGT. Um total de 480 medições foi efetuado. Os resultados desta pesquisa foram submetidos à análise retrospectiva. A retirada de sangue para a obtenção do soro de pacientes com doenças urológicas benignas ocorreu antes, para pacientes com tumores de testículo ocorreu antes, durante e após o tratamento. No grupo de pacientes com TGT também foram determinados os marcadores AFP e  $\beta$ -hCG.

A média de idade dos homens estudados foi de 35,5 anos (tabela 1).

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO POR IDADE.**

<b>Idade</b>	<b>Idade (Anos)</b>
Mínima	2
Máxima	83
Média	35,5

Setenta e seis pacientes possuíam doença maligna (tabela 2). Em 71 casos tratava-se de tumor de células germinativas, sendo que 3 destes apresentavam processo extragonadal primário, representados por um teratocarcinoma mediastinal, o segundo um seminoma retroperitoneal e o terceiro um carcinoma embrionário retroperitoneal.

TGT foi diagnosticado em 68 pacientes. Cinco pacientes tinham tumor de células de Leydig.

Todos os pacientes com doença maligna foram submetidos, além do exame físico, às seguintes avaliações diagnósticas: exame laboratorial (hemograma, sódio, potássio e cálcio séricos, creatinina, uréia e marcadores tumorais séricos AFP,  $\beta$ -hCG e PLAP), exames de imagem (ultra-sonografia dos órgãos escrotais e rins, exames radiológicos dos órgãos torácicos em dois planos, tomografia computadorizada do abdomen e, se necessário, do tórax).

**TABELA 2 - DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Número de pacientes (n)</b>
<b>Doenças benignas</b>	<b>60</b>
Dor testicular de origem indeterminada	22
Orquiepididimite	15
Tumores adenomatóides	3
Infarto e isquemia testicular	3
Criptorquidismo	3
Litíase urinária	3
Hematoma testicular	2
Necrose testicular	2
Orquite	2
Hidrocele testicular	1
Megaureter	1
Pseudotumor fibroso	1
Adenoma prostático	1
Estenose de uretra	1
<b>Doenças malignas</b>	<b>76</b>
<b>Testiculares</b>	<b>73</b>
Seminoma	33
Tumores mistos	28
Tumores não seminomatosos	7
Tumores de Leydig	5
<b>Tumores de células germinativas extratesticulares primários</b>	<b>3</b>

Sessenta pacientes apresentavam doença urológica benigna (tabela 2). Vinte e dois pacientes tinham dor testicular, portanto deveria-se também pensar - como diagnóstico diferencial - em tumor de testículo. Também nestes pacientes foram realizados os exames acima citados. Trinta e dois pacientes apresentavam, clinicamente ou através de diagnóstico anatomopatológico de peça de biópsia, um processo benigno do testículo ou epidídimo. Seis outros pacientes apresentavam uma doença urológica benigna (megaureter, adenoma prostático, estenose de uretra e litíase urinária).

### **3.2 DETERMINAÇÃO DA PLAP**

A determinação da concentração sérica da PLAP foi realizada no Instituto de Química Oncológica da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf segundo o método enzimático descrito por MASLOW et al. (1983). Neste método naftol-AS-MX-fosfato {(3-hidroxi-2-ácido naftóico 2,4-dimetilanilida)-fosfato} é defosforilado em pH básico (10.2), dando origem a um produto fluorescente. Atividades de outras fosfatases alcalinas foram eliminadas através de tratamento prévio por calor.

Amostras séricas de pacientes e do grupo controle foram armazenadas, no máximo, por 2 meses, a menos 20°C, até a determinação. Como controles positivos foram utilizadas misturas de soros de grávidas que apresentavam valores séricos de  $\beta$ -hCG superiores a 2000 mIU/ml.

Soluções originais: (a) Naftol-AS-MX (3-hidroxi-2-ácido naftóico 2,4-dimetilanilida) (Firma Sigma, número: 4500 - tipo III) foi preparado como padrão como se segue: 21,9mg (0,75 mmol/l) ad 100ml N-N-dimetilformamida (Firma Merck, número: 822275). A preservação a menos 20°C é possível por 6 meses, devendo-se proteger da luz.

(b) Solução tampão (pH = 11,0): 52,5 g dietanolamina (Firma Sigma, número: D 8885) (5 mol/l) ad 100 ml água destilada. A preservação a 4°C é possível por 12 meses.

Soluções de uso: (A) Solução tampão (1:10 com água destilada).

(B) Naftol-AS-MX-fosfato (Firma Sigma, número: N 5000) como substrato: 57,73mg substrato ad 10ml tampão para trabalho. Este era preparado diariamente para uso.

Outros reagentes: (I) Mistura de soro de grávidas e  
(II) de doadores de sangue sadios (10ml).  
(III) Acetona.

Inativação por calor: Cada 1ml de soro foi colocado nos tubos de ensaio correspondentes e incubados durante 7 minutos em banho Maria a 65°C (a quantidade mínima de soro de pacientes era de 600 $\mu$ l). Na seqüência as amostras foram refrigeradas à temperatura ambiente.

Pacientes: Para cada paciente foram realizados determinações de um valor principal (HW) e um branco (LW) (tabela 3). Após uma incubação por 15 minutos a 37°C, a reação foi cessada com 3 ml de acetona.

**TABELA 3 - ESQUEMA DE PIPETAGEM PARA A DETERMINAÇÃO DO LW E HW.**

Branco (LW)	Valor principal (HW)
3ml acetona	-
250 $\mu$ l soro do paciente	250 $\mu$ l soro do paciente
250 $\mu$ l substrato	250 $\mu$ l substrato

Centrifugação: Todos os tubos (padrões e amostras de paciente) foram centrifugados a 2800 rotações por minuto durante 5 minutos (Beckman J6, esfera JS-4.2).

Fluorometria: Em seguida foi realizada a determinação fluorométrica do naftol-AS-MX do sobrenadante decantado. Para tal utilizou-se um espectrômetro luminescente LS-5 da Firma Perkin-Elmer. As ondas de excitação mediram 405 nm e a dimensão de emissão 535 nm (com uma calibragem de escala fixa de 0,5 e uma resposta de 3,0).

Para o cálculo da quantidade de produto utilizou-se de uma curva referencial delineada com naftol-AS-MX em níveis de 3,75 a 82,5  $\mu\text{mol/l}$  (ao todo 9 pontos). A partir dos valores obtidos originava-se uma curva referencial que, na realidade, era linear e a partir da qual os valores séricos dos pacientes eram calculados. Para concentrações acima de 82,5  $\mu\text{mol/l}$  as determinações eram repetidas com amostras diluídas.

Para a produção de uma curva referencial foram obtidas diluições correspondentes da solução de naftol-AS-MX (a): em cada tubo de ensaio foram pipetados 3 ml de acetona. Em cada um foram adicionados 250 $\mu\text{l}$  dos padrões ou das misturas de soros (II) para a definição do valor branco. Em todos os tubos foram adicionados 250 $\mu\text{l}$  de substrato e misturados. Finalmente foram, como descrito acima, centrifugado, decantado e medido.

Definição: A atividade enzimática é definida como a taxa de formação do produto da reação na unidade de tempo (minuto) em relação ao volume (litro):

1 unidade (U) corresponde a 1 $\mu\text{mol/Min.}$ $\Rightarrow$ 1 U/L corresponde a 1 $\mu\text{mol/Min./L}$
---

Valores da PLAP abaixo de 3,75  $\mu\text{mol/l}$  foram considerados como normais.

Determinação de outros marcadores tumorais:

A) Para a determinação quantitativa da AFP no soro foi utilizado um teste imunoenzimétrico fluorescente automatizado - Stratus®AFP (Firma DADE Diagnostik GmbH, Miami, U.S.A.) - com anticorpos monoclonais anti-AFP de ratos.

B) Para a determinação quantitativa do total de  $\beta$ -hCG no soro ou plasma foi utilizado um método imunológico fluorescente - Stratus® hCG+ $\beta$  (Firma DADE Diagnostik GmbH, Miami, U.S.A.) - com

anticorpos monoclonais anti- $\beta$ -hCG de ratos. Este teste compreende a determinação tanto da molécula intacta de hCG como também da subunidade  $\beta$ -hCG livre.

## **4 RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

A classificação histológica dos tumores testiculares dos pacientes acompanhados neste estudo é apresentada na tabela 4. Destes, 5 haviam apresentado, anteriormente, um tumor de testículo contralateral. A média do intervalo de tempo entre o surgimento do primeiro e segundo tumores foi de 79 meses (mínimo de 22 meses e máximo de 17 anos e 5 meses).

Um paciente havia sido submetido, 7 anos antes, a um tratamento cirúrgico devido à presença de um teratocarcinoma retroperitoneal primário.

**TABELA 4 - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA E NÚMERO DE PACIENTES.**

Histologia	Número de pacientes (n)	(%)
Seminoma puro	33	48,5
Tumor misto com elementos seminomatosos	22	32,4
Tumor misto sem elementos seminomatosos	6	8,8
NSGCT*	7	10,3

\*NSGCT = Tumor de células germinativas do testículo de apenas um tipo histológico

### 4.2 ESTÁDIO E DISTRIBUIÇÃO POR LATERALIDADE

61,7 % dos pacientes apresentavam um estágio clínico I (Tabela 5). Somente 11,8 % deles se apresentaram inicialmente em estágio de doença avançada.

A relação entre o tipo histológico e o estágio clínico é demonstrada na tabela 6. A forma de apresentação mais freqüente, ou seja, 33,8 %, foi seminoma puro em estágio clínico I.

**TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM TUMOR DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO RELACIONADA AO ESTÁDIO CLÍNICO (CAVALLI et al., 1980).**

Estádio clínico	N	%
I	42	61,7
II	18	26,5
III	8	11,8

**TABELA 6 - HISTOLOGIA E ESTÁDIO CLÍNICO DE TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO (CAVALLI et al., 1980).**

Histologia\Estádio	n	IA	IB	IC	IX	IIA	IIB	IIC	IID	IIIA	IIIB	IIIC	IIID
Seminoma puro	33	23	1	0	3	1	3	1	0	0	0	1	0
Tumor misto com elementos seminomatosos	22	6	1	0	0	5	4	0	2	1	3	0	0
Tumor misto sem elementos seminomatosos	6	3	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
NSGCT	7	4	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Soma	68	36	2	0	4	6	8	2	2	2	5	1	0

Dos 73 pacientes com tumores testiculares, 53,4 % o tinham do lado esquerdo e 45,2 % do direito.

Um paciente apresentou tumores testiculares bilaterais sincrônicos.

#### 4.3 VALORES SÉRICOS DA PLAP PARA PACIENTES COM TUMORES TESTICULARES

Dos 68 pacientes com TGT avaliados neste estudo, 49 tiveram uma determinação da PLAP antes do início do tratamento. Dezesete dos 49 casos (34,6 %) apresentaram valores elevados da PLAP (valor de referência acima de 3,75  $\mu\text{mol/l}$ ).

Na tabela 7 estão relacionados a taxa percentual dos pacientes com valores pré-operatórios elevados para a PLAP e os seus respectivos tipos histológicos. Dos 27 pacientes com um seminoma puro, 11 tinham valores elevados da PLAP no pré-operatório. Considerando-se apenas estes tumores - os seminomas puros, a sensibilidade foi de 40,7 % (23 a 61 % com um intervalo de confiança de 95 %). Seis dos 16 pacientes (37,5 %) com um tumor misto com elementos seminomatosos apresentavam valores elevados da PLAP. Cinco destes 6 pacientes também apresentavam um aumento dos valores séricos pré-operatórios da AFP e/ou  $\beta$ -hCG. Tumores mistos sem elementos seminomatosos e NSGCT não apresentaram nenhuma elevação pré-operatória da PLAP. Três dos 5 pacientes com tumores testiculares de células de Leydig tiveram uma determinação da PLAP pré-operatória; estes valores foram normais.

Para os seminomas puros, 8 dos 27 pacientes apresentavam exclusivamente um aumento da concentração sérica da PLAP. Três outros pacientes também apresentavam uma elevação da  $\beta$ -hCG.

**TABELA 7 - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL PLAP.**

Histologia	Número de pacientes (n)	Determinação da PLAP no pré-operatório (n)	Valores séricos da PLAP elevados no pré-operatório (n) (%)
Seminoma puro	33	27	(11) 40,7
Tumor misto com elementos seminomatosos	22	16	(6) 37,5
Tumor misto sem elementos seminomatosos	6	4	(0) 0
NSGCT	7	2	(0) 0

Na tabela 8 são apresentados os tipos histológicos dos tumores, os estádios clínicos, as concentrações séricas antes do início do tratamento assim como o valor da PLAP após a orquiectomia inclusive com a indicação do tempo decorrido até a normalização desta concentração, dos 17 pacientes com valores da PLAP elevados no pré-operatório.

**TABELA 8 - VALORES SÉRICOS DA PLAP NO PRÉ- E PÓS-OPERATÓRIO CORRESPONDENDO AO ESTÁDIO CLÍNICO (CAVALLI et al., 1980).**

Histologia e estágio clínico	Número do paciente	Valor sérico da PLAP no pré-op. (μmol/l)	Valor sérico da PLAP (μmol/l) após orquiectomia (dia)	Valor sérico da PLAP em níveis normais (<3,75 μmol/l)
Seminoma - IA	1	12,42	4,49 (1) <3,75 (5)	-
Seminoma - IA	2	17,09	10,43 (1) 4,35 (5)	□
Seminoma - IA	3	7,10	<3,75 (1)	-
Seminoma - IA	4	56,79	<3,75 (5)	-
Seminoma - IA	5	134,15	9,99 (6)	▽
Seminoma - IA	6	6,95	▽	▽
Seminoma - IA	7	60,90	<3,75 (5)	-
Seminoma - IIA	8	4,35	<3,75 (5)	-
Seminoma - IIB	9	57,02	24,32 (1) 5,09 (5)	No 6º dia do primeiro ciclo de PEB
Seminoma - IIIC (HEP*)	10	109,68	32,40 (3)	No 20º dia do primeiro ciclo de PEI
Seminoma clássico com infiltração estromal linfocitária - IA	11	5,40	<3,75 (4)	-
Seminoma e carcinoma embrionário - IB	12	8,52	<3,75 (3)	-
Seminoma e carcinoma embrionário - IIA	13	32,51	<3,75 (6)	-
Seminoma e carcinoma embrionário - IIB	14	8,59	<3,75 (6)	-
Seminoma com teratoma maduro - IID	15	578,34	609,81 (6)	Após 3 ciclos de PEB + 3 ciclos PIV
Seminoma, carcinoma embrionário e tumor do saco vitelínico - IIIB (PUL**)	16	24,87	22,39 (4)	No 20º dia do 1º ciclo de PEB
Seminoma "in situ", carcinoma embrionário, tumor do saco vitelínico e corioepitelial - IA	17	6,78	<3,75 (9)	-

\* HEP = metástases hepáticas; \*\* PUL = metástases pulmonares; - Valores normais dentro do período de tempo até o nono dia pós-orquiectomia; □ Um controle do valor sérico da PLAP foi realizado 4 anos e 2 meses após a orquiectomia inguinal e demonstrou um valor normal; ▽ Sem valores disponíveis; PEB = quimioterapia com cisplatina, etoposide e bleomicina; PEI = quimioterapia com cisplatina, etoposide e ifosfamida; PIV = quimioterapia com cisplatina, ifosfamida e vinblastina.

O valor pré-operatório médio para a PLAP foi de 66,55  $\mu\text{mol/l}$  (3,75 a 578,34). Uma normalização dos valores da PLAP foi verificada para 15 dos 17 pacientes. Devido à falhas na documentação foi possível, em um caso, apenas a observação da queda dos valores da PLAP. Um paciente não apresentava nenhum exame controle referente à PLAP após a orquiectomia.

#### 4.4 AFP PARA TUMORES TESTICULARES

Elevação dos valores séricos da AFP no pré-operatório foi verificada em 16 de 19 (84,2 %) pacientes com tumor misto com elementos seminomatosos (tabela 9). Cinco pacientes com tumor misto sem elementos seminomatosos também apresentavam tal elevação. Em todos os pacientes com elevação dos valores séricos da AFP no pré-operatório pôde ser verificada uma correlação entre a concentração do marcador tumoral com a evolução clínica posterior. Desta forma, 2 pacientes, os quais posteriormente desenvolveram uma recidiva tumoral, apresentaram uma elevação correspondente da AFP.

**TABELA 9 - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL AFP.**

Histologia	Número de pacientes (n)	Determinação da AFP no pré-operatório (n)	Valores séricos da AFP elevados no pré-operatório (n) (%)
Seminoma puro	33	31	(0) 0
Tumor misto com elementos seminomatosos	22	19	(16) 84,2
Tumor misto sem elementos seminomatosos	6	5	(5) 100,0
NSGCT	7	7	(4) 57,1

#### 4.5 $\beta$ -hCG PARA TUMORES TESTICULARES

Um aumento pré-operatório do valor sérico da  $\beta$ -hCG foi verificado em 19,3 % dos pacientes com seminomas (tabela 10). Doze dos 20 pacientes com tumores mistos com elementos seminomatosos (60%) tinham concentrações séricas elevadas de  $\beta$ -hCG, assim como 4 dos 5 pacientes com tumores mistos do testículo sem elementos seminomatosos (80%). Para os NSGCT foram verificadas tais elevações em 2 dos 6 pacientes.

Em todos os pacientes com elevação dos valores séricos da  $\beta$ -hCG no pré-operatório pôde ser verificada uma correlação entre a concentração do marcador tumoral com a evolução clínica posterior. Um paciente com carcinoma embrionário desenvolveu 6 meses após a orquiectomia uma recidiva mediastinal, sem elevação concomitante dos valores de  $\beta$ -hCG. Interessante foi o fato de que este paciente não apresentava, antes de qualquer tratamento, valores patológicos deste marcador.

**TABELA 10 - TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO: HISTOLOGIA, NÚMERO DE PACIENTES E ELEVAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL  $\beta$ -HCG.**

Histologia	Número de pacientes (n)	Determinação da $\beta$ -hCG no pré-operatório (n)	Valores séricos da $\beta$ -hCG elevados no pré-operatório (n) (%)
Seminoma puro	33	31	(6) 19,3
Tumor misto com elementos seminomatosos	22	20	(12) 60
Tumor misto sem elementos seminomatosos	6	5	(4) 80
NSGCT	7	6	(2) 33,3

A tabela 11 demonstra que PLAP apresenta para os seminomas, quando comparada com AFP e  $\beta$ -hCG, a maior sensibilidade, ou seja 40,7 %.

**TABELA 11 - ELEVAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DOS MARCADORES PLAP, AFP E  $\beta$ -HCG PARA TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO TESTÍCULO.**

Histologia	Elevação pré-operatória da PLAP	Elevação pré-operatória da AFP	Elevação pré-operatória da $\beta$ -hCG
	Número de pacientes (%)	Número de pacientes (%)	Número de pacientes (%)
Seminoma puro	11/27 (40,7)	0/31 (0)	6/31 (19,3)
Tumor misto com elementos seminomatosos	6/16 (37,5)	16/19 (84,2)	12/20 (60)
Tumor misto sem elementos seminomatosos	0/4 (0)	5/5 (100)	4/5 (80)
NSGCT	0/2 (0)	4/7 (57,1)	2/6 (33,3)

#### 4.6 TRATAMENTO DE PACIENTES COM VALORES SÉRICOS ELEVADOS DA PLAP NO PRÉ-OPERATÓRIO

Dezessete dos 68 pacientes com TGT apresentaram valores séricos elevados para a PLAP. A doença maligna destes 17 pacientes {de acordo com as classificações de Lugano (CAVALLI et al., 1980) e Indiana (BIRCH et al., 1986)}, a terapia realizada para estes pacientes, as evoluções e o tempo de seguimento são apresentados na tabela 12.

Sete pacientes com seminoma puro no estágio IA, um paciente com seminoma puro no estágio IIA e um paciente com seminoma clássico com infiltração estromal linfocitária (IA) foram submetidos à terapia radioterápica. O tratamento foi realizado na região da cadeia linfática para-aórtica, com ou sem inclusão dos linfáticos ilíacos ipsilaterais, numa dose final de 26 a 30,6 Gy. Um paciente em estágio IIB assim como outro com estágio IIIC receberam 2 ciclos de poliquimioterapia.

Dois pacientes - um em estágio IA e outro IB - com tumores mistos do testículo com elementos seminomatosos foram submetidos a uma linfadenectomia retroperitoneal (RLA) primária. Para pacientes com tumores mistos do testículo com elementos seminomatosos e em estágio II (3 pacientes) ou III (1 paciente), o tratamento foi composto de uma combinação de RLA e quimioterapia.

Num período médio de seguimento de 30 meses (8 a 61 meses) não foi verificada nenhuma recidiva.

**TABELA 12 - PACIENTES COM ELEVAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DOS VALORES SÉRICOS DA PLAP (N = 17), ESTÁDIO CLÍNICO (CAVALLI et al., 1980) E CLASSIFICAÇÃO DE INDIANA (BIRCH et al., 1986), TRATAMENTO E EVOLUÇÃO DA DOENÇA.**

Histologia (número do paciente)	Estádio clínico Lugano	Estádio clínico Indiana	Tratamento	Evolução (Seguimento - meses)
Seminoma (1)	IA	Mínimo	Irradiação	Livre de doença (16)

Seminoma (2)	IA	Mínimo	Irradiação	Livre de doença (27)
Seminoma (3)	IA	Mínimo	Irradiação	Livre de doença (30)
Seminoma (4)	IA	Mínimo	Irradiação	Livre de doença (18)
Seminoma (5)	IA	Mínimo 1	Irradiação	Livre de doença (16)
Seminoma (6)	IA	Mínimo 1	Irradiação	Livre de doença (34)
Seminoma (7)	IA	Mínimo 1	Irradiação	Livre de doença (08)
Seminoma (8)	IIA	Mínimo 2	Irradiação	Livre de doença (42)
Seminoma (9)	IIB	Mínimo 2	2xPEB	Livre de doença (47)
Seminoma (10)	IIIC (HEP)	Avançado 9	2xPEI	Livre de doença (31)
Seminoma clássico com infiltração estromal linfocitária (11)	IA	Mínimo	Irradiação	Livre de doença (61)
Seminoma e carcinoma embrionário (12)	IB	Mínimo	RLA	Livre de doença (31)
Seminoma e carcinoma embrionário (13)	IIA	Mínimo 2	RLA + 2xPEB	Livre de doença (21)
Seminoma e carcinoma embrionário (14)	IIB	Mínimo 2	2xPEB + 2xPEI (alta dose) + RLA	Livre de doença (50)
Seminoma com teratoma maduro (15)	IID	“Moderate” 5	3xPEB + 3xPIV + RLA	Livre de doença (42)
Seminoma, carcinoma embrionário e tumor do saco vitelínico (16)	IIIB (PUL)	Avançado ( <i>bulky disease</i> ) 7	4xPEB + RLA	Livre de doença (09)
Seminoma “in situ”, carcinoma embrionário, tumor do saco vitelínico e corioepitelial (17)	IA	Mínimo 1	RLA	Livre de doença (27)

(Tempo médio = 30)

RLA = linfadenectomia retroperitoneal.

#### 4.7 PLAP E ESTÁDIO PRÉ-OPERATÓRIO

Como pode ser observado na tabela 13, não houve correlação entre a concentração sérica patológica da PLAP no pré-operatório e o estágio tumoral. Assim, o valor médio da PLAP em estágio IA foi de 34,17

$\mu\text{mol/l}$  (5,4 a 134,15), enquanto que pacientes com doença em estágio II ou III apresentaram valores séricos de, p. ex., 8,59 e 24,87  $\mu\text{mol/l}$ .

**TABELA 13 - VALORES SÉRICOS DA PLAP ELEVADOS NO PRÉ-OPERATÓRIO E ESTÁDIO CLÍNICO (CAVALLI et al., 1980).**

Estádio clínico	IA	IB	IC	IX	IIA	IIB	IIC	IID	IIIA	IIIB	IIIC	IIID
Soma (n)	36	2	0	4	6	8	2	2	2	5	1	0
Valores normais (n)	20	1	0	0	3	5	0	1	0	1	0	0
Indefinido (n)	7	0	0	4	1	1	2	0	2	3	0	0
Elevado (n)	9	1	0	0	2	2	0	1	0	1	1	0
Elevado - extremos ( $\mu\text{mol/l}$ )	5,4 134,15	-	-	-	4,35 32,51	8,59 57,02	-	-	-	-	-	-
PLAP elevada - valor médio	34,17	8,52	-	-	18,43	32,80	-	578,34	-	24,87	109,68	-

#### 4.8 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP ENTRE PACIENTES COM PATOLOGIAS UROLÓGICAS BENIGNAS

Dos 60 pacientes com uma doença urológica benigna, 10 (16,7 %) apresentaram um valor sérico elevado para PLAP (tabela 14). O valor mais alto deste grupo foi de 11,99  $\mu\text{mol/l}$ . Deste modo a especificidade foi de 83,3 % (71 a 91,3 % com um intervalo de confiança de 95 %). Considerando-se os valores de sensibilidade para os seminomas puros e a especificidade, os valores preditivos positivo e negativo foram de 52,4 % (30,3 a 73,6 % com um intervalo de confiança de 95 %) e 75,8 % (63,4 e 85,1 % com um intervalo de confiança de 95 %), respectivamente.

Estes 10 pacientes apresentavam as seguintes doenças: uma epididimite, uma orquiepididimite, uma necrose testicular e uma litíase ureteral; os outros 6 pacientes foram submetidos a exames no sentido de excluir a presença de um tumor testicular maligno.

Três dos pacientes com elevações da PLAP fumavam no mínimo 20 cigarros ao dia. Para os outros pacientes não haviam informações disponíveis em relação ao hábito de fumar.

**TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP PARA PACIENTES COM DOENÇA UROLÓGICA BENIGNA.**

Doenças benignas	n	%	Concentração sérica da PLAP ( $\mu\text{mol/l}$ ) - Valor médio (extremos)
Valores elevados da PLAP	10	16,7	7,38 (4,25 a 11,99)
PLAP normal	50	83,3	< 3,75

Total	60	100,0	-
-------	----	-------	---

#### 4.9 VALORES SÉRICOS DA PLAP PARA FUMANTES E NÃO FUMANTES

Nove dos 17 pacientes com TGT com valor sérico da PLAP elevado pré-operatoriamente eram fumantes com consumo médio, diário, de 21,1 (10 a 40) cigarros. Os valores médio e mediano da PLAP foram de, para o grupo dos fumantes, 102,36 e 24,87  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente, enquanto que para os 8 não fumantes estes valores mediram 26,27 e 8,5  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente (tabela 15).

Para 28 dos 32 pacientes com TGT, cujos valores da PLAP eram normais, havia informações sobre o hábito de fumar. Onze pacientes fumavam, em média, 20 cigarros diariamente (10 a 40) (tabela 16). Para 4 pacientes não haviam informações a este respeito.

Foi verificada uma tendência no sentido de que fumantes apresentassem valores mais elevados da PLAP do que não fumantes. No entanto, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes, uma diferença estatisticamente significativa não foi comprovada, seja utilizando-se o teste de 2 amostras de Wilcoxon ( $p=0.2709$ ) ou a análise estatística segundo Kruskal-Wallis ( $p=0.2652$ ).

**TABELA 15 - VALORES SÉRICOS PRÉ-OPERATÓRIOS DA PLAP E HÁBITO DE FUMAR.**

	n	Valor médio pré-operatório da PLAP ( $\mu\text{mol/l}$ ) (extremos)	Hábito de fumar - cigarros/dia (extremos)
Fumantes	9	102,36 (5,4 a 578,34)	21,1 (10 a 40)
Não fumantes	8	26,27 (4,35 a 60,90)	0

**TABELA 16 - VALORES SÉRICOS PRÉ-OPERATÓRIOS NORMAIS DA PLAP E HÁBITO DE FUMAR.**

	n	Valores séricos pré-operatórios da PLAP ( $\mu\text{mol/l}$ )	Hábito de fumar - cigarros/dia (extremos)
Fumantes	11	<3,75	20 (10 a 40)
Não fumantes	17	<3,75	0
Desconhecido	4	<3,75	?

## **5 DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

O alto valor clínico dos marcadores tumorais  $\beta$ -hCG e AFP para o diagnóstico e controle da evolução para TGT não seminomatosos está bem documentado (SCARDINO et al., 1977; JAVADPOUR, 1980; LANGE et al., 1982; MANN, 1990; BARTLETT et al., 1991; KLEPP, 1991). Já a LDH está elevada, em estádios de doença avançada, de 78 % (LIPPERT e JAVADPOUR, 1981) a 91 % (CANAL et al., 1984) dos casos. A especificidade deste marcador é, todavia, baixa (MANN, 1990; BARTLETT et al., 1991; KOSHIDA et al., 1991).

Considerando-se a totalidade dos TGT, cerca de 40 % dos casos são de tumores seminomatosos, mas somente em cerca de 20 % dos seminomas puros valores aumentados de  $\beta$ -hCG podem ser detectados. Em todos os outros casos de seminomas não se dispõe de marcadores sensíveis e específicos. Devido às relações entre a isoenzima placentária da fosfatase alcalina e tumores seminomatosos, existe a possibilidade de, através do emprego deste marcador, reduzir a falta de informações referentes ao diagnóstico por marcadores que estes tumores apresentam.

A isoenzima placentária da fosfatase alcalina pertence, ao contrário das outras isoenzimas da fosfatase alcalina, ao grupo dos antígenos oncofetais (HIRANO et al., 1987). Dentre as várias análises que necessitam ser realizadas antes do seu emprego clínico de rotina, os seguintes aspectos serão apresentados e discutidos:

- 5.1 sensibilidade e especificidade da PLAP em relação ao tipo histológico;
- 5.2 elevação da PLAP na dependência do estágio tumoral;
- 5.3 valores séricos da PLAP na dependência da evolução da doença;
- 5.4 influência do hábito de fumar sobre os valores séricos da PLAP.

### 5.1 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PLAP EM RELAÇÃO AO TIPO HISTOLÓGICO

A sensibilidade de um marcador tumoral é calculada através do número de achados verdadeiro-positivos entre o total do número de doentes. Deste modo foi verificado, no grupo de pacientes estudado, que

17 de 49 apresentavam um aumento da PLAP, e assim a sensibilidade calculada foi de 34,6 %. Este valor se baseia em um valor de referência de 3,75  $\mu\text{mol/l}$ . Para os tumores mistos com elementos seminomatosos a sensibilidade atingiu 37,5 %. Para os seminomas foi de 40,7 %. A especificidade, como expressão dos achados verdadeiro-negativos entre os não doentes, isto é, não portadores de doença maligna, foi de 83,3 %. Uma especificidade de 90 % iria exigir um aumento do valor de referência para 6,00  $\mu\text{mol/l}$ , o que por sua vez teria como consequência uma redução da sensibilidade para 33,3 %.

Como o resumo da tabela 17 demonstra, existem relatos sobre a determinação do valor sérico da PLAP em um total de 1296 pacientes com um seminoma puro através de diferentes métodos de determinação. Os valores para a sensibilidade variam de 36 % (NUSTAD et al., 1984) a 100 % (EPENETOS et al., 1985). As diferenças de sensibilidade são, ao menos em parte, devido a diferenças nos métodos. A favor desta argumentação temos o fato de que as sensibilidades obtidas por meio de métodos enzimáticos são semelhantes, como verificado nesta pesquisa e também no estudo de NIELSEN et al. (1990). Em contrapartida, quase sem exceções, uma sensibilidade mais elevada (40 a 62 %) pôde ser obtida com o emprego de métodos radioimunológicos ou outras técnicas imunológicas com mAbs e/ou pAbs, sensibilidade esta que, em estudos com menor número de pacientes (EPENETOS et al., 1985; HORWICH et al., 1985; TUCKER et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1988), alcançou valores de 87 % (TUCKER et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1988) a 100 % (EPENETOS et al., 1985).

**TABELA 17 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MARCADOR TUMORAL PLAP PARA NEOPLASIAS SEMINOMATOSAS DO TESTÍCULO.**

Autor	Ano	Método de determinação (Anticorpo)	N	Sensibilidade (%)	Especificidade Grupo controle / NED* (%) (Nr. de amostras)
WAHREN et al.	1979	RIA (pAbs)	19	53	73* (7/26)
LANGE et al.	1982	ELISA (pAbs)	28	57	100* (0/33)
JAVADPOUR	1983	ELISA (pAbs)	30	40	88* (6/49)
JEPPSSON et al.	1983	RIA (pAbs)	21	43	87* (9/68)
DASS et al.	1984	RIA (pAbs)	51	61	-
NUSTAD et al.	1984	RIA (pAbs)	413	36	-
COOPER et al.	1985	ELISA (mAbs)	41	61	100* (0/33)
EPENETOS et al.	1985	ELISA (mAbs)	11	100	86* (10/70)
FORD et al.	1985	ELISA (mAbs)	21	52	-
TUCKER et al.	1985	ELISA (mAbs)	16	88	85 (32/213)
HORWICH et al.	1985	ELISA (mAbs)	16	94	65* (16/46)
WAHREN et al.	1986	ELISA (mAbs + pAbs)	73	77	96* (3/68)
DE BROE et al.	1988	EIA (mAbs 327) (INNOTEST PLAP®)	53	72	90,7 (27/291)
YAMAMOTO et al.	1988	ELISA (mAbs)	21	86	-
NIELSEN et al.	1990	Método enzimático cinético	236	45	88*
KOSHIDA et al.	1991	EIA (mAbs)	26	62	100* (0/86)
POTTEK et al.	1995	EIA (mAbs) (INNOTEST PLAP®)	47	55	-
KOSHIDA et al.	1996	EIA (mAbs)	51	51	98,2* (4/679)
WEISSBACH et al.	1998	EIA (mAbs 12X8T) (INNOTEST HPLAP)	95	56	39,3* (83/213)
O presente estudo	1999	Método enzimático cinético	27	40,7	83,3 (10/60)

\* NED = sem sinais da presença de doença ativa (por ocasião do seguimento)

Além das diferenças nos métodos e do tamanho da amostra também devem ser consideradas, para a interpretação dos diferentes valores de sensibilidade, diferenças inerentes ao grupo de pacientes estudados. A amostra correspondeu, com relação ao estágio tumoral, na maioria das publicações analisadas (WAHREN et al., 1979; JEPPSSON et al., 1983; DASS e BAGSHAW, 1984; NUSTAD et al., 1984; HORWICH et al., 1985; WAHREN et al., 1986; NIELSEN et al., 1990; KOSHIDA et al., 1991; POTTEK et al., 1995;

KOSHIDA et al., 1996), ao grupo de pacientes do presente estudo. Entretanto, algumas publicações apresentaram falhas de informações p. ex., os trabalhos de LANGE et al. (1982), JAVADPOUR (1983) e COOPER et al. (1985), não apresentavam nenhuma forma de divisão dos pacientes estudados quanto ao estágio tumoral. Também o trabalho de Epenetos et al. (EPENETOS et al., 1985), o qual demonstrou uma sensibilidade de 100 % tendo somente 11 pacientes com 13 amostras de sangue estudados, não oferecia a informação a respeito do estágio tumoral. O estudo de FORD et al. (1985) tinha apenas 3 pacientes com seminomas puros em estágio I, em comparação com 18 pacientes com doenças em estágio II ou III. Os pacientes estudados por TUCKER et al. (1985) apresentaram, sem exceções, doença com disseminação sistêmica. No estudo de DE BROE e POLLET (1988), o grupo completo de pacientes não foi descrito de modo discriminado. A distribuição foi realizada, somente a título de exemplificação, para um dos 18 centros envolvidos no estudo. Segundo esta distribuição, 9 dos 20 pacientes com seminomas puros pertenciam ao estágio clínico I, 6 ao estágio II e 5 ao estágio III. No estudo de YAMAMOTO et al. (1988) foram estudados 11 pacientes com seminoma puro em estágio I e 10 com doença sistêmica.

A PLAP é detectada, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em 96 % (BURKE e MOSTOFI, 1988) a 100 % (YAMAMOTO et al., 1993) dos TGT seminomatosos. Também em estudos imunohistoquímicos (MANN, 1990; KOSHIDA et al., 1990) foi possível comprovar que a fosfatase alcalina produzida pelo tumor não é, bioquimicamente assim como imunologicamente, totalmente idêntica à fosfatase alcalina placentária. Devido a isso o anticorpo escolhido para a determinação da PLAP é de fundamental importância. WAHREN et al. (1986) demonstraram, com o auxílio de mAbs, 6 diferentes fenótipos da PLAP originados do testículo, sendo que a isoenzima do tipo II se assemelha à fosfatase alcalina da placenta. Na maior parte dos casos a isoenzima produzida pelo tumor foi a do tipo I (WAHREN et al., 1986; JEPPSSON et al., 1984), a qual pode ser detectada pelo mAb H7. Nenhuma das isoenzimas descritas está associada a um pior prognóstico (WAHREN et al., 1986).

De acordo com KOSHIDA et al. (1996), o método utilizado por NIELSEN et al. (1990) poderia ser influenciado pela detecção concomitante de uma isoenzima gastrointestinal (IAP), a qual apresenta uma estabilidade parcial ao calor (HIRANO et al., 1987; SUGIURA, et al., 1990), pode ser verificada tanto em tecido testicular normal como em seminomas (HIRANO et al., 1987) e é responsável por cerca de 10 % da atividade total das fosfatases alcalinas no soro (HIRANO, MATSUMOTO e TANAKA, 1987). Com o método

empregado por KOSHIDA et al. (1996) é possível - evitando-se a desnaturação protéica, a separação eletroforética ou o uso de inibidores - determinar as 3 isoenzimas da fosfatase alcalina a partir de uma amostra (HIRANO, MATSUMOTO e TANAKA, 1987).

O método empregado por NIELSEN et al. (1990) se baseia na estabilidade ao calor que as enzimas possuem a 65°C, em um pH de 9,8 e fenilfosfato como substrato (ANSTISS et al., 1971). Um método semelhante foi empregado neste estudo, porém com outro substrato (naftol-AS-MX-fosfato). MASLOW et al. (1983) criticaram outros procedimentos de determinação (BESSEY et al., 1946; KIND et al., 1954; MOSS e KING, 1962; TSOU e SU, 1965; BODANSKY, 1988), os quais se utilizam do mesmo princípio porém com outros substratos. Como desvantagem se verificou que, devido a uma baixa sensibilidade, nenhuma atividade enzimática foi detectada no soro de pessoas sadias e que, ao menos em parte, apenas uma diferenciação precária entre pessoas sadias e doentes foi possível. O substrato empregado por NIELSEN et al. (1990) pertence ao grupo dos criticados por MASLOW et al. (1983). Outras diferenças constituem o tempo de inativação pelo calor e o valor do pH, os quais foram descritos nos trabalhos de NIELSEN et al. (1990) e ANSTISS et al. (1971), como sendo 5 minutos e o pH 9,8, respectivamente. De acordo com MASLOW et al., o método por eles descrito seria 2 vezes mais sensível do que aquele que se utiliza de fenilfosfato como substrato (CADEAU et al., 1974; KELLEN et al., 1976; MASLOW et al., 1983).

Em geral é possível verificar que os métodos imunológicos com emprego de mAbs apresentam uma sensibilidade e especificidade maiores que os métodos enzimáticos (tabela 17). Medindo-se a PLAP sérica com métodos enzimáticos e com EIA monoclonal em gestantes, os valores são praticamente idênticos, porém os valores da PLAP sérica de pacientes com tumores medidos com EIA monoclonal são praticamente o dobro do que aqueles medidos com método catalítico (HIRANO et al., 1987). O conjunto de PLAP derivado de células seminomatosas compreende moléculas heterogêneas com sensibilidade parcial ao calor (MILLAN et al., 1982; HIRANO et al., 1987) e uma microheterogeneidade à eletroforese quando relacionada à PLAP originada da placenta (HIRANO et al., 1987). Isto pode representar, ao se utilizar diferentes métodos na rotina diária p. ex. por ocasião de controles no seguimento de pacientes com seminoma, um problema (HIRANO et al., 1987), pois diferentes resultados podem ser obtidos. Utilizando-se um método catalítico existe o risco da perda de determinada informação.

Segundo HAIJE et al. (1987) deveria, no entanto, a determinação da atividade enzimática ser mais sensível do que métodos imunológicos. Os autores suportam o ponto de vista de que as controvérsias referentes ao emprego da PLAP como marcador tumoral para TGT e do ovário se devem sobretudo aos diferentes métodos de determinação empregados.

Como demonstrado na tabela 11, PLAP foi o marcador tumoral mais freqüentemente elevado para os seminomas puros (40,7 %), quando comparado com AFP e  $\beta$ -hCG. A sensibilidade da  $\beta$ -hCG atingiu somente 19,3 %. Como a sensibilidade da  $\beta$ -hCG e da PLAP não se apresentam correlacionadas, PLAP é considerado como um marcador independente (COOPER et al., 1985; KOSHIDA et al., 1996).

Quando da determinação concomitante de PLAP,  $\beta$ -hCG e LDH para seminomas pode-se obter uma sensibilidade total de cerca de 82 % (KOSHIDA et al., 1996). No presente estudo também se conseguiu elevar a sensibilidade total devido à inclusão da PLAP, pois 8 pacientes com seminomas puros apresentaram, no pré-operatório, exclusivamente uma elevação deste marcador. Três outros pacientes também apresentaram uma elevação da  $\beta$ -hCG. Segundo KOSHIDA et al. (1996) se pode atingir, com a adição da determinação da PLAP, também para os seminomas uma sensibilidade diagnóstica total dos marcadores comparável àquela obtida para os TGT não seminomatosos.

O valor da PLAP sérica estava elevada em 6 dos 16 (37,5 %) pacientes com TGT mistos que continham componentes seminomatosos. Seis pacientes com tumores mistos sem elementos seminomatosos não apresentaram elevação da PLAP. Considerando-se os TGT não seminomatosos com ou sem elementos de seminoma em conjunto, os outros marcadores, isto é AFP (75 %) e  $\beta$ -hCG (54,5 %), apresentaram sensibilidade mais elevada que a PLAP (27 %), sendo que a determinação da PLAP para estes pacientes não apresenta vantagens. Os valores de sensibilidade para a PLAP referente a tumores não seminomatosos varia de 10 % (COOPER et al., 1985) a 60 % (WAHREN et al., 1979).

## **5.2 ELEVAÇÃO DA PLAP NA DEPENDÊNCIA DO ESTÁDIO TUMORAL**

POTTEK et al. (1995) relataram, ao estudar 104 pacientes, que a elevação do valor sérico da PLAP não foi mais freqüente para estádios avançados (38,4 %) do que para estádios iniciais (41,9 %). Uma relação

entre estágio tumoral e valores positivos não foi confirmada por outros autores (LANGE et al., 1982; JEPPSSON et al., 1983; YAMAMOTO et al., 1988).

DASS e BAGSHAW (1984) descreveram, no entanto, uma elevação mais freqüente da PLAP para estádios avançados (10 de 14 pacientes, 71 %) do que para iniciais (21 de 37 pacientes, 56,7 %). No trabalho de KOSHIDA et al. (1996) foi demonstrado que 40 % (16 de 40) dos pacientes com seminoma do estágio I e 90,1 % (10 de 11) dos estádios II ou III tinham valores elevados da PLAP. Em modelos experimentais foi possível demonstrar, para estes autores, uma relação direta entre a magnitude do valor sérico da PLAP e o peso tumoral (KOSHIDA et al., 1996). Nos pacientes do presente estudo não se verificou diferença significativa: 32,2 % dos pacientes em estágio I e 35,7 % em estágio II apresentaram valores elevados (tabela 13). Como somente 3 pacientes em estágio III foram examinados - dois dos quais com valores elevados da PLAP no pré-operatório, não é possível realizar uma análise com relação à divisão entre estádios iniciais e avançados. A análise a respeito de uma relação entre a concentração sérica e estágio tumoral não se faz possível devido ao pequeno número de pacientes do presente estudo.

Não existem dados de literatura que apresentem uma relação entre a intensidade da PLAP pré-operatória e o prognóstico da doença. Para se realizar tal análise seria necessário um grande número de casos documentados da doença, nas quais houvesse uma recidiva. Como isto é raro para os seminomas, esta pergunta será respondida com muita dificuldade (KOSHIDA et al., 1996). Somado a este fato temos outro, que é a propriedade da PLAP apresentar valores individuais baixos, quando comparado com outros marcadores tumorais (KOSHIDA, et al., 1991; KOSHIDA et al., 1996). Deve-se considerar que a elevação *per se*, e não a intensidade da elevação, seja uma informação importante.

### **5.3 VALORES SÉRICOS DA PLAP NA DEPENDÊNCIA DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA**

A maioria dos casos de seminomas é diagnosticada no estágio I - doença restrita ao testículo (tabelas 5 e 6). Em estudos prospectivos multicêntricos e randomizados em desenvolvimento procura-se estudar se a orquiectomia somente seria uma forma de tratamento suficiente, evitando-se assim a radioterapia adjuvante. Para uma simples conduta expectante um marcador tumoral teria uma importância fundamental. Através da determinação dos marcadores  $\beta$ -hCG e AFP uma conduta de acompanhamento sem terapia adjuvante se

tornou possível para os TGT não seminomatosos em estágio I (PECKHAM et al., 1982). O presente trabalho procura também identificar se a PLAP poderia ocupar esta função para os seminomas. Mesmo que as taxas de cura e sobrevida sejam elevadas, cerca de 10% dos pacientes ainda terão evolução fatal (KOSHIDA, 1990). Como isto é sobretudo verdadeiro para pacientes em estágio II e III, o marcador também deveria ter a função de indicar precocemente a presença de uma recidiva tumoral.

Para TGT não seminomatosos foi estabelecido o valor da queda dos marcadores  $\beta$ -hCG e AFP após a exérese do tumor primário (TONER et al., 1990). De modo semelhante a esta situação para os TGT não seminomatosos, YAMAMOTO et al. (1988) estudaram se, através da determinação da concentração sérica da PLAP antes e após a exérese do tumor primário, assim como antes da radioterapia adjuvante, o estágio clínico da doença pode ser determinado com mais precisão. Os autores (YAMAMOTO et al., 1988) descreveram que 4 de 10 pacientes com seminoma do testículo em estágio clínico I e valores séricos pré-operatórios elevados da PLAP continuaram apresentando, após a orquiectomia e antes da radioterapia, valores séricos elevados da PLAP, os quais possivelmente estariam relacionados à presença de tumor residual. Após a radioterapia, 2 dos 4 pacientes acima referidos ainda apresentavam valores elevados da PLAP. Estes 2 pacientes desenvolveram, posteriormente, uma recidiva da doença.

Estas observações favorecem a utilização da PLAP como parâmetro de seguimento. No presente estudo foi possível verificar que 1 paciente com seminoma puro em estágio IIA (paciente nr. 8, tabela 8) e 3 pacientes com tumores mistos com elementos seminomatosos em estágios IIA e IIB (pacientes nr. 12, 13 e 14, tabela 8) tiveram os valores de PLAP normalizados após a orquiectomia. Interessante é o fato de que o paciente de número 14 também apresentou uma diminuição da PLAP após a orquiectomia, apesar de possuir uma metástase retroperitoneal de cerca de 3,5 x 3 cm de diâmetro. O estudo histopatológico do material obtido pela linfadenectomia retroperitoneal secundária demonstrou um linfonodo de cerca de 4 cm com tumor não seminomatoso. Os outros 48 linfonodos estavam livres de doença. O fato de ser observada uma queda da PLAP a valores normais apesar da presença da doença, limita o valor diagnóstico deste marcador sem, no entanto, torná-lo ineficiente. Tal limitação também foi demonstrada para a  $\beta$ -hCG em estudo experimental (ACKERMANN, 1980). Com o auxílio de teratocarcinomas humanos produtores de  $\beta$ -hCG e xenotransplantados em ratos imunodeprimidos, foi demonstrado que um tumor com volume de 5 ml não necessariamente causa uma elevação sérica do marcador em humanos.

Com a determinação do tempo de meia vida de um marcador é possível identificar – a exemplo da AFP e  $\beta$ -hCG – se uma terapia realizada conduz à eliminação completa ou parcial do tumor. A meia vida da PLAP não foi determinada no presente estudo devido ao pequeno número de pacientes. POTTEK et al. (1995) relataram, por ocasião do estudo de 18 pacientes com seminomas puros em estágio I, um tempo de meia vida de 2,04 (0,52 a 7,3) dias. KOSHIDA et al. (1996) definiram o tempo de meia vida para 16 pacientes com seminoma puro em estágio I como sendo  $2,3 \pm 0,9$ , enquanto que YAMAMOTO et al. (1988), para 11 pacientes, entre 2 e 7 dias. Segundo estes autores (YAMAMOTO et al., 1988) deve-se pressupor que, quando o tempo de meia vida for maior que 7 dias, existe um tumor residual. No estudo de KOSHIDA et al. (1996) foi relatado, ao se estudar 11 pacientes em estágio avançado, sobre uma relação entre a cinética do valor sérico da PLAP e a evolução clínica do paciente.

Uma propriedade importante requerida dos marcadores tumorais é um aumento precoce como consequência de uma recidiva ou progressão da doença. O presente estudo não permite uma avaliação neste sentido, pois nenhum paciente apresentou uma recidiva. Em vários estudos (LANGE et al., 1982; YAMAMOTO et al., 1988; POTTEK et al., 1995; KOSHIDA et al., 1996) foi comprovada a situação em que um aumento sérico da PLAP ocorreu antes da manifestação clínica de uma recidiva do tumor seminomatoso. No trabalho de KOSHIDA et al. (1996) um novo aumento da PLAP indicou a presença de uma recidiva de seminoma em 2 de 3 pacientes com tal evolução.

NIELSEN et al. (1990), os quais criticaram o uso da PLAP como marcador tumoral para os seminomas, relacionaram a sua crítica ao fato de que a determinação da PLAP de rotina, por ocasião do seguimento, estaria associada a poucas vantagens no sentido de um diagnóstico precoce de uma recidiva. Neste estudo (NIELSEN et al., 1990), 15 de 236 pacientes apresentaram uma recidiva. De 97 pacientes que apresentavam um seminoma puro em estágio I e que foram observados durante um esquema de conduta expectante, 11 desenvolveram uma recidiva. Dois destes 11 pacientes tinham uma elevação concomitante da PLAP. De 40 pacientes com seminoma em estágio II que foram submetidos à radioterapia ( $n = 37$ ) ou poliquimioterapia ( $n = 3$ ), 2 desenvolveram uma recidiva. Um destes 2 pacientes apresentou uma elevação da PLAP antes do diagnóstico clínico da recidiva.

Devido aos conhecimentos atuais predomina o conceito de que PLAP não deveria, por não ser importante, ser controlada durante o seguimento de pacientes com TGT não seminomatosos. No entanto isto

deveria ser interpretado com cautela pois, a exemplo do relato de POTTEK et al. (1995), isto pode ser incorreto. Estes autores (POTTEK et al., 1995) descreveram 2 casos de pacientes com TGT não seminomatoso em estágio I, os quais não apresentavam marcadores elevados (AFP e  $\beta$ -hCG) pré-operatoriamente e que desenvolveram metástases pulmonares. Um destes pacientes apresentou elevação da PLAP. Se isto foi determinado por componentes seminomatosos não reconhecidos histologicamente, permanece indefinido.

A questão, até que ponto se permite iniciar medidas terapêuticas para pacientes com novo aumento da PLAP sem comprovação clínica de uma recidiva tumoral, exige o conhecimento exato da taxa de resultados falso-positivos. No estudo de KOSHIDA et al. (1996) verificou-se uma taxa de 1,8 % - para uma análise de 679 amostras - de falso-positivos. Trata-se da determinação de 6 de um total de 116 pacientes, os quais estavam em seguimento após o tratamento para seminoma. Cinco destes 6 pacientes apresentaram uma elevação transitória e inexplicável da PLAP. O sexto paciente era um fumante com um consumo de 30 cigarros ao dia, o qual demonstrou um aumento persistente da PLAP. Segundo os autores KOSHIDA et al. (1996), a taxa de valor falso-positivo da PLAP não foi mais alta do que aquelas da  $\beta$ -hCG e LDH, calculadas com sendo 0,6 e 5,6 %, respectivamente. Estes marcadores não são, no entanto, influenciados pelo hábito de fumar (KOSHIDA et al., 1996).

Os aumentos transitórios da PLAP por ocasião do seguimento relatados por outros autores (WAHREN et al., 1979; JEPPSSON et al., 1983; JAVADPOUR, 1983; COOPER et al., 1985; WAHREN et al., 1986) foram de fato não exclusivos, porém sobretudo verificado em fumantes (EPENETOS et al., 1985; HORWICH et al., 1985; TUCKER et al., 1985; WEISSBACH et al., 1997).

#### **5.4 INFLUÊNCIA DO HÁBITO DE FUMAR SOBRE OS VALORES SÉRICOS DA PLAP**

A questão do aumento da PLAP devido ao hábito de fumar é discutida de maneira controversa.

NIELSEN et al. (1990), que avaliaram a PLAP como marcador de valor limitado para os seminomas, relacionam isto ao fato dos valores medidos serem influenciados pelo hábito de fumar. No estudo por eles realizado (NIELSEN et al., 1990), no qual a PLAP foi determinada por meio de um método catalítico, foi analisada a influência do hábito de fumar sobre 1385 amostras de pacientes sem indícios de atividade de

doença neoplásica. O valor médio da PLAP para fumantes foi de 28,8 U/l (26,7 - 30,9), estatisticamente significativamente maior do que para não fumantes, os quais apresentaram um valor médio de 15,9 U/l (14,6 - 17,2). O valor médio aumentou de acordo com o aumento do número de cigarros consumidos. Assim foi verificada uma relação direta entre o valor médio e o número de cigarros consumidos diariamente. O valor médio calculado para ex-fumantes (um ano sem consumo de cigarros), valor de 16,6 U/l (14,7 - 18,5), não apresentou diferenças para aqueles dos não fumantes. Também o valor mediano para fumantes {22 U/l (3 - 165)} e não fumantes {15 U/l (1 - 103)} apresentou diferenças estatísticas significantes.

Além disso, foram determinados, analisando-se 162 amostras, valores médios de PLAP de fumantes e não fumantes com doença tumoral ativa (NIELSEN et al., 1990). O valor médio da PLAP para fumantes com doença ativa foi de 47,2 U/l (29,1 - 65,3) e assim menor do que a de não fumantes com doença ativa {78,6 U/l (55,6 - 101,6)}.

Comparando-se o valor médio da PLAP entre não fumantes com e sem doença ativa torna-se aparente (NIELSEN et al., 1990) que pacientes com doença ativa, cujo valor foi de 78,6 U/l (55,6 - 101,6), apresentam valor médio mais elevado do que pacientes sem doença ativa {15,9 U/l (14,6 - 17,2)}.

Comparando-se o valor médio da PLAP entre fumantes com e sem doença ativa se verifica (NIELSEN et al., 1990) que pacientes com doença ativa {47,2 U/l (29,1 - 65,3)} apresentam valor mais elevado do que pacientes sem doença ativa {28,8 U/l (26,7 - 30,9)}.

Correspondentemente ao valor médio, os grupos (fumantes e não fumantes com ou sem doença neoplásica ativa) apresentaram diferentes valores medianos de PLAP (NIELSEN et al., 1990). Entre os não fumantes, os pacientes sem doença ativa apresentaram um valor mediano de PLAP de 14 U/l (1 - 409), enquanto que o valor para pacientes com doença ativa mediu 30 U/l (4 - 455). Para fumantes sem doença ativa o valor mediano da PLAP foi de 22 U/l (3 - 165), e com doença ativa de 21 U/l (1 - 569). O valor mediano sérico mais alto foi verificado entre os não fumantes com doença ativa.

Diferenças entre os valores médio e mediano calculados indicam que os valores de PLAP provavelmente não são distribuídos de maneira regular (NIELSEN et al., 1990). Uma outra análise demonstrou que 97 % dos não fumantes sem doença neoplásica ativa apresentaram valores séricos da PLAP menores que 40 U/l. Para os não fumantes com doença ativa e fumantes, os valores da PLAP se distribuem irregularmente sobre uma grande área de concentração. A determinação do valor de referência é, por isso,

problemática. Através da curva "receiver operating characteristic" (ROC) se permite definir um valor de referência confiável apenas para os não fumantes.

Com o valor de referência de 35 U/l definido por NIELSEN et al. (1990), foram determinados valores de sensibilidade e especificidade para todos os pacientes de 45 % e 88 %, respectivamente, e para os não fumantes isoladamente de 47 % e 96 %, respectivamente. Os autores (NIELSEN et al., 1990) concluem que a determinação do valor sérico da PLAP tem valor somente para os não fumantes e, neste grupo, os valores preditivos positivos somente seriam altos se um valor de referência correspondentemente elevado fosse escolhido.

MASLOW et al. (1983) relataram sobre uma atividade elevada da PLAP no soro de fumantes sadios. No seu estudo (MASLOW et al., 1983) foram analisados os valores séricos da PLAP de 76 voluntários sadios - 51 não fumantes e 25 fumantes. O valor médio da PLAP para fumantes foi de 0,44 (0 - 1,17) U/l e para não fumantes de 0,068 (0 - 0,144) U/l.

Em concordância com as observações de NIELSEN et al. (1990) também MASLOW et al. (1983) verificaram uma distribuição mais ampla dos valores da PLAP entre os fumantes. Comparando-se fumantes com não fumantes sadios foram definidos valores até 10 vezes mais elevados para os primeiros (MASLOW et al., 1983).

No seu trabalho, MUENSCH et al. (1986) estudaram a atividade catalítica da PLAP com o método enzimático descrito por MASLOW et al. (1983), dentre outros, em 98 não fumantes sadios e 65 fumantes. Para os não fumantes foi calculado um valor médio de 0,068 U/l (0 - 0,144), em comparação com um valor médio para fumantes de 0,378 U/l (0 - 1,02).

Em consonância com os achados de MASLOW et al. (1983), também foi verificada no presente estudo uma tendência, segundo a qual os fumantes apresentam valores mais elevados da PLAP. Esta diferença não pôde ser confirmada estatisticamente possivelmente devido ao pequeno número de pacientes (ver tabelas 15 e 16).

Na análise da influência do hábito de fumar sobre os valores séricos da PLAP, também os aspectos relacionados aos métodos de determinação precisam ser considerados.

DE BROE e POLLET (1988) calcularam, ao estudar 85 não fumantes sadios (1 ano sem fumar) e 128 fumantes (consumo de mais de 15 cigarros diariamente) valores médios da PLAP de 19 (0 - 53) mU/l e 50 (0 -

390) mU/l, respectivamente. Neste estudo multicêntrico as concentrações séricas da PLAP foram determinadas com o auxílio de mAbs. Dezenove por cento dos fumantes apresentaram valores elevados da PLAP sem que existisse uma doença neoplásica concomitante, enquanto que no grupo dos não fumantes nenhum valor falso-positivo de PLAP foi verificado. Os dados obtidos neste estudo (DE BROE e POLLET, 1988) permitiram as seguintes reflexões: para os não fumantes um valor de referência de 60 mU/l seria adequado, o qual ao se incluir os fumantes deveria ser aumentado para 200 mU/l, para que uma especificidade satisfatória fosse alcançada. Para um valor de referência de 60 mU/l a sensibilidade do estudo aumentaria correspondentemente. Como os autores não dispunham de informações a respeito do hábito de fumar dos pacientes com doença neoplásica, o valor de referência foi dado como sendo de 100 mU/l.

Valores da PLAP mais elevados após o término do tratamento para tumor testicular foram relatados por POTTEK et al. (1995) para fumantes. Segundo os autores, os valores médios da PLAP nesta condição foram de 46,3 U/l (0,1 - 251) para 44 fumantes e de 8,5 U/l (0,1 - 49) para 66 não fumantes. Análises estatísticas resultaram numa diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Também no pré-operatório os valores séricos da PLAP foram mais freqüentemente elevados para fumantes (59 %) do que para não fumantes (30 %). Relevante foi a cinética da diminuição do marcador, a qual pareceu ser independente do hábito de fumar. Os autores concluem que a determinação da PLAP sérica, considerando-se o tempo de meia vida biológico, oferece importantes informações a respeito da extensão tumoral e a evolução da doença para pacientes com TGT (POTTEK et al., 1995).

KOSHIDA et al. (1996), no entanto, sem apresentar precisamente os resultados do seu estudo, relataram que, ao comparar os valores séricos da PLAP de 39 pacientes com seminoma puro e consumo de cigarros definido (fumante e não fumante), não encontraram nenhuma diferença em relação à sensibilidade e especificidade da PLAP destes dois grupos. No seu estudo o valor sérico da PLAP foi determinado com um método imunocatalítico monoclonal.

A expressão da PLAP foi estudada com o auxílio de mAbs (H317 e E6) em material fixado em parafina originado de tecido pulmonar de 16 indivíduos (NOUWEN et al., 1986). Esta enzima foi identificada em células alveolares tipo I e células epiteliais dos bronquíolos. A atividade da PLAP se origina, em fumantes, de células alveolares tipo I, as quais liberam a enzima devido à lesão celular (PRIOR et al., 1986). PLAP também foi detectada em 5 de 10 amostras de carcinomas pulmonares (NOUWEN et al., 1986). Células

alveolares hiperplásicas tipo II não demonstraram uma expressão da PLAP. Os autores (NOUWEN et al., 1986) suportam o conceito de que a detecção da PLAP em tecido pulmonar não é um sinal da presença de doença das células deste órgão.

Devido aos dados apresentados, alguns autores (HORWICH et al., 1985; MUENSCH et al., 1986; NIELSEN et al., 1990) sugerem uma determinação do valor sérico da PLAP de rotina para pacientes com TGT somente quando os fumantes sejam excluídos. Ainda está para ser estudado se, através de informação simultânea obtida por anamnese a respeito do hábito de fumar de um determinado paciente, uma falha de interpretação dos resultados pode ser, se não completamente excluída, ao menos reduzida.

Em estudo imunohistoquímico, HAMILTON et al. (1990) examinaram a expressão da fosfatase alcalina originada da placenta e da PLAP em 254 amostras de congelação de diferentes tecidos humanos, normais e neoplásicos, com os anticorpos mAbs H317, H17E2 e H315. Ambas as enzimas foram identificadas em tecido normal do timo, em tecido testicular fetal e de recém-natos, assim como tecidos endocervical e tubário normais. As enzimas foram detectadas em 21 de 22 TGT e 28 de 167 tumores de outras origens. Dentre estes houve reação positiva para 8 de 17 carcinomas de ovário (47 %) e para 9 de 17 tumores do trato intestinal proximal (52 %). Os autores interpretaram os resultados no sentido de que a PLAP, em pacientes com TGT, é produzida através de um aumento da expressão normalmente presente no tecido germinativo.

Uma análise crítica entre pacientes com doenças malignas não testiculares e não originadas de tecido germinativo masculino demonstra que PLAP pode ser considerado como possível marcador tumoral somente para os seminomas. Os achados também demonstram que ainda está para ser determinado se a PLAP apresenta um valor clínico para os tumores ovarianos (COOPER et al., 1985; MUENSCH et al., 1986; FISHMAN, 1987; HAIJE et al., 1987; DE BROE e POLLET, 1988; NEWLANDS et al., 1988; FISKEN et al., 1989; GARGANO et al., 1990; HORDING et al., 1990; KOSHIDA, 1990; NOZAWA et al., 1990; THOLANDER et al., 1990; STIGBRAND et al., 1990; BAST et al., 1991; TOFTAGER et al., 1992; VERGOTE et al., 1992).

No presente estudo, 10 dos 60 pacientes com doença benigna (16,7 %) apresentaram uma elevação dos valores séricos da PLAP. Uma relação entre o tipo de doença benigna e a elevação da PLAP sérica não foi

verificada. Com o emprego de um método imunocatalítico monoclonal, HIRANO et al. (1987) observaram que a concentração da PLAP em tecido testicular não estava elevada em 3 pacientes com doença testicular benigna (hidrocele, orquite e hemangioma).

Sem apresentar os resultados detalhadamente, ANSTISS et al. (1971) demonstraram, com o auxílio de um método enzimático, que uma discreta elevação dos valores séricos da enzima Regan estava presente em um número significativo de voluntários com dependência do álcool.

MUENSCH et al. (1986) detectaram, em 7 de 58 pacientes com doenças benignas, uma elevação dos valores séricos da PLAP: 3 pacientes apresentavam uma doença hepática por alcoolismo, 2 uma hepatite do tipo B, 1 uma doença pulmonar obstrutiva crônica e 1 uma insuficiência cardíaca crônica. Não foi verificado, neste estudo, nenhum aumento dos valores séricos da PLAP em associação com determinada doença benigna (MUENSCH et al., 1986).

À semelhança dos marcadores AFP,  $\beta$ -hCG e LDH, não há nenhuma necessidade cientificamente comprovada de utilizar a PLAP por ocasião de um programa de *screening* para a detecção precoce de tumores testiculares. Um valor diagnóstico pode ser obtido, no entanto, quando da determinação sérica da PLAP em conjunto com  $\beta$ -hCG e AFP para pacientes com tumores testiculares por ocasião do diagnóstico diferencial (KOSHIDA, 1990). Devido à especificidade de 83,3 % descrita no presente estudo, um valor normal da PLAP não tem a propriedade de alterar a indicação de uma exploração cirúrgica quando da dúvida diagnóstica. Quando da presença de um valor superior a 12  $\mu\text{mol/l}$  e dúvida diagnóstica deve-se considerar, como possibilidade maior, a presença de um TGT, pois valores de tal magnitude não foram detectados para pacientes com doenças benignas.

Devido aos conhecimentos adquiridos com este estudo, PLAP pode ser considerada, com uma sensibilidade de 41 % e uma especificidade de 83,3 %, um marcador potencial no diagnóstico e seguimento de pacientes com seminomas puros ou tumores mistos com elementos seminomatosos. Apesar das limitações de especificidade (NIELSEN et al., 1990) muitos estudos publicados até a presente data favorecem o emprego (LANGE et al., 1982; JAVADPOUR, 1983; JEPPSSON et al., 1983; COOPER et al., 1985; EPENETOS et al., 1985; FORD et al., 1985; HORWICH et al., 1985; TUCKER et al., 1985; WAHREN et al., 1986; DE BROE e POLLET, 1988; YAMAMOTO et al., 1988; KOSHIDA et al., 1991; POTTEK et al., 1995; KOSHIDA et al.,

1996; WEISSBACH et al., 1997) da PLAP para seminomas, tumores estes sem outros marcadores mais sensíveis.

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

- Considerando-se um valor de referência de 3,75  $\mu\text{mol/l}$ , a maior sensibilidade do método enzimático empregado neste estudo para determinar os valores séricos da PLAP (isoenzimas da fosfatase alcalina placentária) foi verificada para pacientes com seminomas puros (40,7 %), seguido de uma sensibilidade de 37,5 % para os tumores mistos com elementos seminomatosos. O marcador tumoral para seminomas puros com maior sensibilidade foi PLAP: a  $\beta$ -hCG estava elevada em somente 19,3 % dos casos. A especificidade da PLAP foi de 83,3 %. O método empregado para determinar a PLAP pode influenciar os valores de sensibilidade e especificidade.
- Não se verificou nenhuma correlação entre a magnitude dos valores séricos da PLAP e o estágio tumoral.
- Todos os pacientes com níveis séricos da PLAP elevados no pré-operatório e com seguimento demonstraram uma diminuição destes correspondente à evolução da doença. A cinética de diminuição deste marcador é relevante.
- Caso PLAP seja utilizada como controle no seguimento após terapia primária, o hábito de fumar do paciente necessita ser considerado para evitar erros de interpretação. Este hábito pode determinar valores falso-positivos.
- PLAP pode ser considerada como potencial marcador no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com seminomas puros ou tumores mistos com componentes seminomatosos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ACKERMANN, R. (1980) **Die klinische Bedeutung der Tumorummunologie bei Malignomen des Urogenitaltraktes (Zusammenfassung).** 352-355.
- 2 ACKERMANN, R. AND WIRTH, M. (1979) **Probleme der radioimmunologischen Alpha-Fetoprotein- und Beta-HCG-Bestimmung.** 69-70.
- 3 ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. (1995), **Protein-Funktion.** In: *Molekularbiologie der Zelle.* pp. 225-258. Editors: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim - New York - Basel - Cambridge - Tokyo.
- 4 ANSTISS, C.L., GREEN, S. AND FISHMAN, W.H. (1971) An automated technique for segregating populations with a high incidence of Regan isoenzyme in serum. **Clin. Chim. Acta**, 33, 279-286.
- 5 BARTLETT, N.L., FREIHA, F.S. AND TORTI, F.M. (1991) Serum markers in germ cell neoplasms. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** 5, 1245-1260.
- 6 BAST, R.C., JR., KNAUF, S., EPENETOS, A., DHOKIA, B., DALY, L., TANNER, M., SOPER, J., CREASMAN, W., GALL, S., KNAPP, R.C. ET AL (1991) Coordinate elevation of serum markers in ovarian cancer but not in benign disease. **Cancer**, 68, 1758-1763.
- 7 BENDHACK, D.A. (1996) Cancer de testiculo: proposta terapeutica. **Urol. Contemp.** 2, 28-33.
- 8 BERNDT, H. AND BERNDT, R. (1982) Inzidenz und Mortalität an bosartigen Neubildungen der Harnorgane und männlichen Geschlechtsorgane in der DDR. **Urologe [A]**, 21, 185-189.
- 9 BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. AND BROCK, M.J. (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **J. Biol. Chem.** 164, 321-327.
- 10 BIRCH, R., WILLIAMS, S., CONE, A., EINHORN, L., ROARK, P., TURNER, S. AND GRECO, F.A. (1986) Prognostic factors for favorable outcome in disseminated germ cell tumors. **J. Clin. Oncol.** 4, 400-407.
- 11 BODANSKY, A. (1933) Phosphatase studies II; Determination of serum phosphatase factors influencing the accuracy of the determination. **J. Biol. Chem.** 101, 93-109.
- 12 BURKE, A.P. AND MOSTOFI, F.K. (1988) Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. **Hum. Pathol.** 19, 663-670.
- 13 BURT, M.E. AND JAVADPOUR, N. (1981) Germ-cell tumors in patients with apparently normal testes. **Cancer**, 47, 1911-1915.
- 14 CADEAU, B.J., BLACKSTEIN, M.E. AND MALKIN, A. (1974) Increased incidence of placenta-like alkaline phosphatase activity in breast and genitourinary cancer. **Cancer Res.** 34, 729-732.
- 15 CANAL, P., VILLENEUVE, G., BUGAT, R., ARMAND, J.P. AND SOULA, G. (1984) [Plasma lactate dehydrogenase and its isoenzymes in nonseminomatous germ cell tumors of the testis] La lactate deshydrogenase plasmatique et ses isoenzymes dans les tumeurs germinales non seminomateuses du testicule. **Pathol. Biol. Paris.** 32, 245-250.
- 16 CARTER, H.B.; PARTIN, A.W. **Diagnosis and staging of prostate cancer.** In: *Campbell's Urology.* P.2519-2537. Editors: P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan jr. and A.J. Wein. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998.

- 17 CAVALLI, F., MONFARDINI, S. AND PIZZOCARO, G. (1980) Report on the international workshop on staging and treatment of testicular cancer. **Eur. J. Cancer**, 16, 1367-1372.
- 18 CHANG, C.H., ANGELLIS, D. AND FISHMAN, D.H. (1980) Presence of the rare D-variant heat-stable, placental-type alkaline phosphatase in normal human testis. **Cancer Res.** 40, 1506-1510.
- 19 COOPER, E.H., PIDCOCK, N.B., JONES, W.G. AND WARD, A.M. (1985) Evaluation of an amplified enzyme-linked immunoassay of placental alkaline phosphatase in testicular cancer. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** 21, 525-530.
- 20 DASS, S. AND BAGSHAW, K.D. (1984), **A sensitive, specific radioimmunoassay for placental alkaline phosphatase.** In: Human alkaline phosphatases. pp. 49-58. Editors: T. Stigbrand and W.H. Fishman. Alan R. Liss, New York.
- 21 DE BROE, M.E. AND POLLET, D.E. (1988) Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. **Clin. Chem.** 34, 1995-1999.
- 22 DE GROOTE, G., DA WALE, P., VAN DER VORDE, A., DE BROE, M. AND FIERS, W. (1983) Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. **Clin. Chem.** 29, 115-119.
- 23 EPENETOS, A.A., MUNRO, A.J., TUCKER, D.F., GREGORY, W., DUNCAN, W., MACDOUGALL, R.H., FAUX, M., TRAVERS, P. AND BODMER, W.F. (1985) Monoclonal antibody assay of serum placental alkaline phosphatase in the monitoring of testicular tumours. **Br. J. Cancer**, 51, 641-644.
- 24 FISHMAN, W.H. (1974) Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. **Am. J. Med.** 56, 617-619.
- 25 FISHMAN, W.H. (1987) Clinical and biological significance of an isozyme tumor marker - PLAP. **Clin. Biochem.** 20, 387-392.
- 26 FISHMAN, W.H., INGLIS, N.I., STOLBACH, L.L. AND KRANT, M.S. (1968) A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. **Cancer Res.** 28, 150-154.
- 27 FISKEN, J., LEONARD, R.C., SHAW, G., BOWMAN, A. AND ROULSTON, J.E. (1989) Serum placental-like alkaline phosphatase (PLAP): a novel combined enzyme linked immunoassay for monitoring ovarian cancer. **J. Clin. Pathol.** 42, 40-45.
- 28 FORD, T.F., BUTCHER, D.N., SAMUELL, C.T., MASTERS, J.R., PARKINSON, M.C. AND OLIVER, R.T. (1985) Serum and tissue tumour markers in seminomas. **Br. J. Urol.** 57, 750-754.
- 29 GARGANO, G., CORREALE, M., ABBATE, I., FALCO, G., DE FRENZA, N., LORUSSO, V., DE LENA, M. AND DE LEONARDIS, A. (1990) The role of tumour markers in ovarian cancer. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol.** 17, 23-29.
- 30 GOLDSTEIN, D.J., ROGERS, C. AND HARRIS, H. (1982) A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung. **Clin. Chim. Acta**, 125, 63-75.
- 31 HAIJE, W.G., VAN DRIEL, J. AND VAN DER BURG, M.E. (1987) Catalytic and immunologic activities of placental-like alkaline phosphatase in clinical studies. The value of PLAP in follow-up of ovarian cancer. **Clin. Chim. Acta**, 165, 165-175.
- 32 HAMILTON D.S.J., LOU, H. AND PALLESEN, G. (1990) The expression of placental alkaline phosphatase (PLAP) and PLAP-like enzymes in normal and neoplastic human tissues. An immunohistological survey using monoclonal antibodies. **APMIS**, 98, 797-811.

- 33 HEISE, J., DIZIOL, P. AND ZIERGOBEL, R. (1994) **Tumormarker - Praktischer Einsatz und klinische Bedeutung.** 6-85.
- 34 HIRANO, K., DOMAR, U.M., YAMAMOTO, H., BREHMER ANDERSSON, E.E., WAHREN, B.E. AND STIGBRAND, T.I. (1987) Levels of alkaline phosphatase isozymes in human seminoma tissue. **Cancer Res.** 47, 2543-2546.
- 35 HIRANO, K., MATSUMOTO, H. AND TANAKA, T. (1987) Specific assays for human alkaline phosphatase isozymes. **Clin. Chim. Acta**, 166, 265-273.
- 36 HORDING, U., TOFTAGER LARSEN, K., DREISLER, A., LUND, B., DAUGAARD, S., LUNDEVALL, F., ARENDS, J., WINKEL, P. AND RORTH, M. (1990) CA 125, placental alkaline phosphatase, and tissue polypeptide antigen in the monitoring of ovarian carcinoma. A comparative study of three different tumor markers. **Gynecol. Obstet. Invest.** 30, 178-183.
- 37 HORWICH, A., TUCKER, D.F. AND PECKHAM, M.J. (1985) Placental alkaline phosphatase as a tumour marker in seminoma using the H17 E2 monoclonal antibody assay. **Br. J. Cancer**, 51, 625-629.
- 38 JAVADPOUR, N. (1980) Improved staging for testicular cancer using biologic tumor markers: a prospective study. **J. Urol.** 124, 58-59.
- 39 JAVADPOUR, N. (1980) The role of biologic tumor markers in testicular cancer. **Cancer**, 45, 1755-1761.
- 40 JAVADPOUR, N. (1983) Multiple biochemical tumor markers in seminoma. A double-blind study. **Cancer**, 52, 887-889.
- 41 JEPPSSON, A., WAHREN, B., BREHMER ANDERSSON, E., SILFVERSWARD, C., STIGBRAND, T. AND MILLAN, J.L. (1984) Eutopic expression of placental-like alkaline phosphatase in testicular tumors. **Int. J. Cancer**, 34, 757-761.
- 42 JEPPSSON, A., WAHREN, B., STIGBRAND, T., EDSMYR, F. AND ANDERSSON, L. (1983) A clinical evaluation of serum placental alkaline phosphatase in seminoma patients. **Br. J. Urol.** 55, 73-78.
- 43 KELLEN, J.A., BUSH, R.S. AND MALKIN, A. (1976) Placenta-like alkaline phosphatase in gynecological cancers. **Cancer Res.** 36, 269-271.
- 44 KIND, P.R.N. AND KING, E.J. (1954) Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with amino antipyrine. **J. Clin. Pathol.** 7, 322-332.
- 45 KLEPP, O. (1991) Serum tumour markers in testicular and extragonadal germ cell malignancies. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.** 206.
- 46 KOSHIDA, K., NISHINO, A., YAMAMOTO, H., UCHIBAYASHI, T., NAITO, K., HISAZUMI, H., HIRANO, K., HAYASHI, Y., WAHREN, B. AND ANDERSSON, L. (1991) The role of alkaline phosphatase isoenzymes as tumor markers for testicular germ cell tumors. **J. Urol.** 146, 57-60.
- 47 KOSHIDA, K., STIGBRAND, T., MUNCK WIKLAND, E., HISAZUMI, H. AND WAHREN, B. (1990) Analysis of serum placental alkaline phosphatase activity in testicular cancer and cigarette smokers. **Urol. Res.** 18, 169-173.
- 48 KOSHIDA, K., UCHIBAYASHI, T., YAMAMOTO, H. AND HIRANO, K. (1996) Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. **Br. J. Urol.** 77, 138-142.
- 49 KOSHIDA, K., UCHIBAYASHI, T., YAMAMOTO, H., YOKOYAMA, K. AND HIRANO, K. (1996) A potential use of a monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastases of seminoma. **J. Urol.** 155, 337-341.

- 50 KOSHIDA, K. AND WAHREN, B. (1990) Placental-like alkaline phosphatase in seminoma. **Urol. Res.** 18, 87-92.
- 51 LANGE, P.H., MILLAN, J.L., STIGBRAND, T., VESSELLA, R.L., RUOSLATHI, E. AND FISHMAN, W.H. (1982) Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for seminoma. **Cancer Res.** 42, 3244-3247.
- 52 LANGE, P.H., VOGELZANG, N.J., GOLDMAN, A., KENNEDY, B.J. AND FRALEY, E.E. (1982) Marker half-life analysis as a prognostic tool in testicular cancer. **J. Urol.** 28, 708-711.
- 53 LIPPERT, M.C. AND JAVADPOUR, N. (1981) Lactic dehydrogenase in the monitoring and prognosis of testicular cancer. **Cancer**, 48, 2274-2278.
- 54 MANN, K. (1988), **Tumormarker - Humanes Choriongonadotropin (hCG)**. In: Labor und Diagnose, pp. 991-998. Editor: L. THOMAS. Med. Verl.-Ges. Marburg.
- 55 MANN, K. (1990) [Tumor markers in testicular cancer] Tumormarker beim Hodenkarzinom. **Urologe. A.** 29, 77-86.
- 56 MANN, K., LAMERZ, R., HELLMANN, T., KUMPER, H.J., STAEHLER, G. AND KARL, H.J. (1980) Use of human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein radioimmunoassays: specificity and apparent half-life determination after delivery and in patients with germ cell tumors. **Oncodev. Biol. Med.** 1, 301-312.
- 57 MASLOW, W.C., MUENSCH, H.A., AZAMA, F. AND SCHNEIDER, A.S. (1983) Sensitive fluorometry of heat-stable alkaline phosphatase (Regan enzyme) activity in Serum from Smokers and Nonsmokers. **Clin. Chem.** 29, 260-263.
- 58 MILLAN, J.L. (1986) Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase [published erratum appears in *J Biol Chem* 1991 Feb 25;266(6):4023]. **J. Biol. Chem.** 261, 3112-3115.
- 59 MILLAN, J.L. (1988) Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 85, 3024-3028.
- 60 MILLAN, J.L. AND STIGBRAND, T. (1983) Antigenic determinants of human placental and testicular placental-like alkaline phosphatases as mapped by monoclonal antibodies. **Eur. J. Biochem.** 136, 1-7.
- 61 MILLAN, J.L., STIGBRAND, T., RUOSLAHTI, E. AND FISHMAN, W.H. (1982) Characterization and use of an allotype-specific monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase in the study of cancer-related phosphatase polymorphism. **Cancer Res.** 42, 2444-2449.
- 62 MOSS, D.W. AND KING, E.J. (1962) Properties of alkaline phosphatase fraction separated by starch gel electrophoresis. **Biochem. J.** 85, 192-199.
- 63 MUENSCH, H.A., MASLOW, W.C., AZAMA, F., BERTRAND, M., DEWHURST, P. AND HARTMAN, B. (1986) Placental-like alkaline phosphatase. Re-evaluation of the tumor marker with exclusion of smokers. **Cancer**, 58, 1689-1694.
- 64 NAKAYAMA, T., YOSHIDA, M. AND KITAMURA, M. (1970) L-Leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa. **Clin. Chim. Acta**, 30, 546-548.
- 65 NEWLANDS, E.S., HOLDEN, L. AND BAGSHAW, K.D. (1988) Tumour markers and POMB/ACE chemotherapy in the management of ovarian germ cell tumours (GCTs). **Int. J. Biol. Markers**, 3, 185-192.
- 66 NIELSEN, O.S., MUNRO, A.J., DUNCAN, W., STURGEON, J., GOSPODAROWICZ, M.K., JEWETT, M.A., MALKIN, A. AND THOMAS, G.M. (1990) Is placental alkaline phosphatase (PLAP) a useful marker for seminoma? **Eur. J. Cancer**, 26, 1049-1054.

- 67 NOUWEN, E.J., POLLET, D.E., EERDEKENS, M.W., HENDRIX, P.G., BRIERS, T.W. AND DE BROE, M.E. (1986) Immunohistochemical localization of placental alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, and cancer antigen 125 in normal and neoplastic human lung. **Cancer Res.** 46, 866-876.
- 68 NOZAWA, S., UDAGAWA, Y., OHKURA, H., NEGISHI, Y., AKIYA, K., INABA, N., TAKAMIZAWA, H., KIMURA, E. AND TERASHIMA, Y. (1990) Serum placental alkaline phosphatase (PLAP) in gynecologic malignancies--with special reference to the combination of PLAP and CA54/61 assay. **Clin. Chim. Acta**, 186, 275-284.
- 69 NUSTAD, K., MONRAD-HANSEN, H.P., PAUS, E., MILLAN, J.L. AND NORGAARD-PEDERSEN, B. (1984), Evaluation of a new, sensitive radioimmunoassay for placental alkaline phosphatase in pre- and postoperative sera from the danish testicular cancer material. In: Human alkaline phosphatases. pp. 337-348. Editors: T. STIGBRAND AND W.H. FISHMAN. ALAN R. LISS, New York.
- 70 PECKHAM, M.J., HUSBAND, J.E. AND BARRETT, A. (1982) Orchidectomy alone in testicular stage I non-seminomatous germ cell tumors. **Lancet**, ii, 678-680.
- 71 POTTEK, T., MULLER, M., LUTGEHAUS, M. AND HARTMANN, M. (1995) Die humane plazentarische alkalische Phosphatase (hPLAP) als Marker bei Hodentumoren. **Urologe [A]**, 34, 114. (Abstract)
- 72 PRIOR, W.A., DOOLEY, M.M. AND CHURCH, D.F. (1986) The mechanisms of the inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gasphase cigarette smoke. **Adv. Free Radical Biol. Med.** 2, 161-188.
- 73 SCARDINO, P.T., COX, H.D., WALDMANN, T.A., MCINTIRE, K.R., MITTMEYER, B. AND JAVADPOUR, N. (1977) The value of serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. **J. Urol.** 118, 994-999.
- 74 STIGBRAND, T., RIKLUND, K., THOLANDER, B., HIRANO, K., LALOS, O. AND STENDAHL, U. (1990) Placental alkaline phosphatase (PLAP)/PLAP-like alkaline phosphatase as tumour marker in relation to CA 125 and TPA for ovarian epithelial tumours. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.** 11, 351-360.
- 75 SUGIURA, M., ISOBE, M., HIRANO, K., IINO, S., SUSUKI, H. AND ODA, T. (1975) Comparison of properties of human intestinal and placental alkaline phosphatase. **Chem. Pharm. Bull.** Tokyo, 23, 1542-1546.
- 76 THOLANDER, B., TAUBE, A., LINDGREN, A., SJOBERG, O., STENDAHL, U., KIVIRANTA, A., HALLMAN, K., HOLM, L., WEINER, E. AND TAMSEN, L. (1990) Pretreatment serum levels of CA-125, carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, and placental alkaline phosphatase, in patients with ovarian carcinoma, borderline tumors, or benign adnexal masses: relevance for differential diagnosis. **Gynecol. Oncol.** 39, 16-25.
- 77 TOFTAGER LARSEN, K., HORDING, U., DREISLER, A., DAUGAARD, S., LUND, B., BOCK, J., LUNDVALL, F., FREDERIKSEN, K. AND NORGAARD PEDERSEN, B. (1992) CA-125, placental alkaline phosphatase and tissue polypeptide antigen as preoperative serum markers in ovarian carcinoma. **Gynecol. Obstet. Invest.** 33, 177-182.
- 78 TONER, G.C., GELLER, N.L., TAN, C., NISSELBAUM, J. AND BOSL, G.L. (1990) Serum tumor marker half-life during chemotherapy allows early prediction of complete response and survival in nonseminomatous germ cell tumors. **Cancer Res.** 50, 5904-5910.
- 79 TSOU, K.C. AND SU, H.C.F. (1965) A new colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase with indoxyl phosphate. **Anal. Biochem.** 11, 54-64.

- 80 TUCKER, D.F., OLIVER, R.T., TRAVERS, P. AND BODMER, W.F. (1985) Serum marker potential of placental alkaline phosphatase-like activity in testicular germ cell tumours evaluated by H17E2 monoclonal antibody assay. **Br. J. Cancer**, 51, 631-639.
- 81 UCHIDA, T., SHIMODA, T., MIYATA, H., SHYKATA, T., IINO, S., SIZUKI, H., ODA, T., HIRANO, K. AND SUGIURA, M. (1981) Immunoperoxidase study of alkaline phosphatase in testicular tumor. **Cancer**, 48, 1455-1462.
- 82 VERGOTE, I.B., ABELER, V.M., BORMER, O.P., STIGBRAND, T., TROPE, C. AND NUSTAD, K. (1992) CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. **Tumour. Biol.** 13, 168-174.
- 83 WAHREN, B., HINKULA, J., STIGBRAND, T., JEPPSSON, A., ANDERSSON, L., ESPOSTI, P.L., EDSMYR, F. AND MILLAN, J.L. (1986) Phenotypes of placental-type alkaline phosphatase in seminoma sera as defined by monoclonal antibodies. **Int. J. Cancer**, 37, 595-600.
- 84 WAHREN, B., HOLMGREN, P.A. AND STIGBRAND, T. (1979) Placental alkaline phosphatase, alphafetoprotein and carcinoembryonic antigen in testicular tumors. Tissue typing by means of cytologic smears. **Int. J. Cancer**, 24, 749-753.
- 85 WEISSBACH, L., BUSSAR-MAATZ, R.; MANN, K. (1997) The value of tumor markers in testicular seminomas. **Eur. Urol.**, v.32,p.16-22.
- 86 WENNBERG, C., KIRELA, A. AND HOLMGREN, P.A. (1995) Placental and germ cell alkaline phosphatases RFLPs and haplotypes associated with spontaneous abortion. **Hum. Hered.** 45, 272-277.
- 87 YAMAMOTO, H., RUDEN, U., ESPOSTI, P., HIRANO, K., STIGBRAND, T., ANDERSSON, L., HISAZUMI, H. AND WAHREN, B. (1988) Profiles of epitope-defined markers in sera from patients with testicular germ cell tumors. **Urol. Res.** 16, 31-36.
- 88 YAMAMOTO, H., UCHIBAYASHI, T., KOSHIDA, K., HIRANO, K. AND HISAZUMI, H. (1993) Immunopathology of alkaline phosphatase isozymes in seminoma. **Urol. Int.** 50, 33-35.