



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA,
OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

Estudio Clinicopatológico e
Inmunohistoquímico de Tumores
Testiculares Germinales

D. Pablo Luis Guzmán Martínez-Valls

2015

UNIVERSIDAD DE MURCIA

**Departamento de Oftalmología,
Optometría, Otorrinolaringología y
Anatomía Patológica**

**“ESTUDIO CLINICOPATOLOGICO
E INMUNOHISTOQUIMICO DE
TUMORES TESTICULARES
GERMINALES”**

PABLO LUIS GUZMÁN MARTINEZ-VALLS
Licenciado en Medicina y Cirugía

Directores:

Prof. Dr. Francisco Martínez Díaz
Prof. Dra. Matilde Campos Aranda

2015

... a mis padres, Ginés y Vicenta, ejemplo de vida y a mis hijos, Marta y Pablo, futuro asegurado...

INDICE

I. INTRODUCCION	8
II. OBJETIVOS	10
III. ANTECEDENTES	16
IV. MATERIAL Y METODOS	92
V. RESULTADOS	138
VI. DISCUSION	208
VII. CONCLUSIONES	232
VIII. ANEXOS	236
IX. BIBLIOGRAFIA	246

I. INTRODUCCION

Los Tumores de Células Germinales (TCG) del testículo representan el 1% de los tumores malignos del varón (1) y es el tipo de cáncer más frecuente entre los 15 y 34 años, constituyendo el 28% del total de tumores (2). Su diagnóstico es de gran importancia ya que dejado a su evolución natural lleva a la muerte al 85% de los enfermos en el curso de 2 a 5 años. Sin embargo, en la actualidad, es uno de los tumores malignos con una supervivencia mayor, que ronda el 95% y ello es debido al éxito del tratamiento multimodal que combinan la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia utilizando uno o varios de ellos (3).

Para el diagnóstico, junto con la exploración física se utiliza la ecografía escrotal que es el método por excelencia con una sensibilidad cercana al 100% aunque tiene una especificidad menor, limitada por condicionantes de la técnica que es muy explorador dependiente (4). Los tumores de testículo además pertenecen al grupo de neoplasias capaces de producir los llamados “*marcadores testiculares*” que pueden ser detectadas fácilmente mediante analítica de sangre.

El tratamiento inicial para todos los tumores testiculares de células germinales es la Orquiectomía Radical vía inguinal, con ligadura alta del cordón espermático. Los hallazgos histológicos determinan el tratamiento posterior, bien vigilancia, radioterapia, quimioterapia o una combinación de ellos. (5,6,7)

Hasta la fecha no hay una teoría definitiva que explique la etiología y patogenia de los TCG del testículo, sin embargo, los datos clínicos y experimentales disponibles en la literatura apoyan la hipótesis de la intervención de *factores congénitos* en la carcinogénesis y también durante el desarrollo de la célula germinal primordial, de *factores ambientales o adquiridos* que pueden alterar el proceso de su diferenciación normal. Existe una teoría que defiende que la atrofia testicular puede ser el paso común final de la cadena etiopatogénica, al que conducen los distintos factores etiológicos implicados en este tipo de tumor.

La patología molecular del tipo de alteraciones cromosómicas, factores de proliferación celular, oncogenes, etc., permiten acercarnos a un mayor entendimiento de la fisiopatología de este tipo de tumores, pudiendo en un futuro cercano dejar de ser meros datos de aproximación para ser datos verídicos de diagnóstico y pronóstico de estos tipos de tumores. (8)

A pesar de seguir siendo imprescindible el estudio histopatológico de los TCG, tanto macroscópico de la pieza de extirpación quirúrgica y su clasificación histológica, se ha hecho imprescindible actualmente la inmunopatología, ya que gracias a la utilización de técnicas de inmunohistoquímica nos permite conocer características antigénicas tumorales que definen clones y subclones de células neoplásicas con distinto significado histogénico e incluso con distinto

comportamiento clínico y biológico y nos permite ayudar a diferenciar los distintos tipos de TCG (9).

Por lo que se podría pensar que el uso racional de un panel de anticuerpos en estrecha relación con un contexto clínico-patológico puede ser de valor en la interpretación de estos tumores.

II. OBJETIVOS

- Estudiar las características anatomopatológicas de los tumores testiculares tanto macroscópicas como microscópicas.
- Valorar el grado de expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos: β HCG, α FP, C-Kit, Ki-67, C-erb-B2, EGFR, AE1/AE3 en tumores de células germinales.
- Valorar el grado de expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos: β HCG, α FP, C-Kit, Ki-67, C-erb-B2, EGFR, AE1/AE3 en tejido peritumoral.
- Estudiar la relación entre el grado de expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos: β HCG, α FP, C-Kit, Ki-67, C-erb-B2, EGFR, AE1/AE3 en tumores de células germinales y en el tejido peritumoral a los mismos.

III. ANTECEDENTES

1. EMBRIOLOGÍA DEL APARATO GENITAL MASCULINO

Genitales Internos

Tanto el sistema reproductor masculino como el femenino proceden de la porción media de la *cresta genital* situada en la superficie posterior de la cavidad embrionaria. La diferenciación de esta cresta germinal en órganos masculinos o femeninos se establece, para cada embrión, en el momento en que se unen el espermatozoide y el ovocito.

En el embrión de 4 a 6 semanas hace su aparición el *mesonefros*. La pareja inicial de mesonefros está formada por una serie de túbulos primordiales que rápidamente establecen conexión con *el conducto mesonéfrico (wolffiano)* elongado, que se extiende hacia abajo hasta un orificio situado en la porción cloacal del intestino primitivo. Los orificios de los conductos mesonéfricos se dirigen hacia adelante para abrirse en el *seno urogenital* en ambos sexos, como resultado del desarrollo del pliegue uorrectal a nivel de la *raíz cloacal* primitiva. Este pliegue divide la cloaca primitiva en una sección anterior urogenital y una sección posterior intestinal.

Algunos de los túbulos mesonéfricos establecen conexiones con las gónadas, formando así el *glóbulo mayor (cabeza) del epidídimo* para el transporte de los espermatozoides. Otros grupos de túbulos mesonéfricos se convierten en estructuras vestigiales, ductos aberrantes y paradídimos (*órgano de Giralde*s). Eventualmente, el conducto mesonéfrico formará el cuerpo y cola del *epidídimo*. *Las vesículas seminales* se forman a partir de evaginaciones de la pared de la porción terminal de los conductos mesonéfricos. En el embrión masculino totalmente desarrollado, la localización terminal del orificio del conducto mesonéfrico (*conducto deferente*) se sitúa a nivel del colículo seminal en la base de la uretra prostática. La gónada indiferenciada, que, eventualmente, se convertirá en un testículo, utiliza así el mesonefros y el conducto mesonéfrico como estructura excretora. (10). *Lámina I*

Genitales Externos

Los genitales externos de ambos sexos se originan a partir de una zona común (*eminencia genital*), localizada en la superficie ventral media del cuerpo, y en sentido cefálico en relación a la depresión proctodeal (utrículo anal) situada entre el ombligo y la cola. Esta eminencia se convierte en el *tubérculo genital*, que, eventualmente, dará lugar al clítoris en la hembra y al *pene* en el varón. A las 5 semanas, una invaginación ectodérmica de la membrana cloacal a nivel del proctodeo forma una depresión vertical (*depresión uretral*), que se halla limitada

en su extremo distal por un pliegue epitelial. El seno urogenital se abre en la extremidad caudal de esta depresión, lugar donde el endodermo y el ectodermo se ponen en contacto. A lo largo de la cara inferior del tubérculo genital aparecen dos pliegues (*uretrales*) laterales y paralelos a la depresión uretral. Posteriormente, y en situación lateral y cefálica al tubérculo genital, aparecen dos elevaciones paralelas que reciben el nombre de *tubérculos labioescrotales*. Estos tubérculos formarán los labios mayores en la hembra y el escroto en el varón. La depresión uretral se halla separada del utrículo anal por un puente transversal de tejido (septo uorrectal), que forma el perineo primitivo. La línea de cierre es el *rafe perineal*. (11). *Lámina II*

Descenso Testicular

La cresta genital, situada en la pared posterior de la cavidad celómica, contiene el testículo primordial, y se extiende desde el VI segmento torácico hasta el 11 segmento sacro. A la edad de 8 semanas, el testículo, situado por debajo del mesotelio (peritoneo primitivo), presenta un aspecto elongado y fusiforme, y se halla en la cavidad celómica (futura cavidad abdominal).

El mesotelio forma dos pliegues: *el superior o ligamento diafragmático*, que se extiende hasta el diafragma, y el inferior o *ligamento inguinal*, que termina en la pared abdominal inferior en el punto en que se desarrollará la *bolsa inguinal* (futuro conducto inguinal). Esta evaginación peritoneal de la pared abdominal (*proceso vaginal*) no aparece hasta los 6 meses. En este momento, dicha evaginación crece hasta formar la bolsa inguinal, la cual, al final del séptimo mes, ha adquirido el tamaño necesario para poder incluir el testículo. Mientras tanto, como resultado de la involución o atrofia de la porción craneal y del mesonefros adyacente, el testículo se ha movilizado y permanece suspendido del epidídimo por el mesorquio, que no es otra cosa que un pliegue de peritoneo primitivo.

Al final del séptimo mes, el testículo atraviesa el conducto inguinal, aunque no es raro que en el momento del nacimiento los testículos se encuentren aún en dicho conducto, terminando su descenso durante el período posnatal. *Lámina III*

El gubernaculum, conecta la extremidad superior del conducto de Wolf (epidídimo), y en consecuencia el testículo, con la pared abdominal inferior. La inserción distal del gubernaculum se extiende hasta la región de la bolsa inguinal.(12)

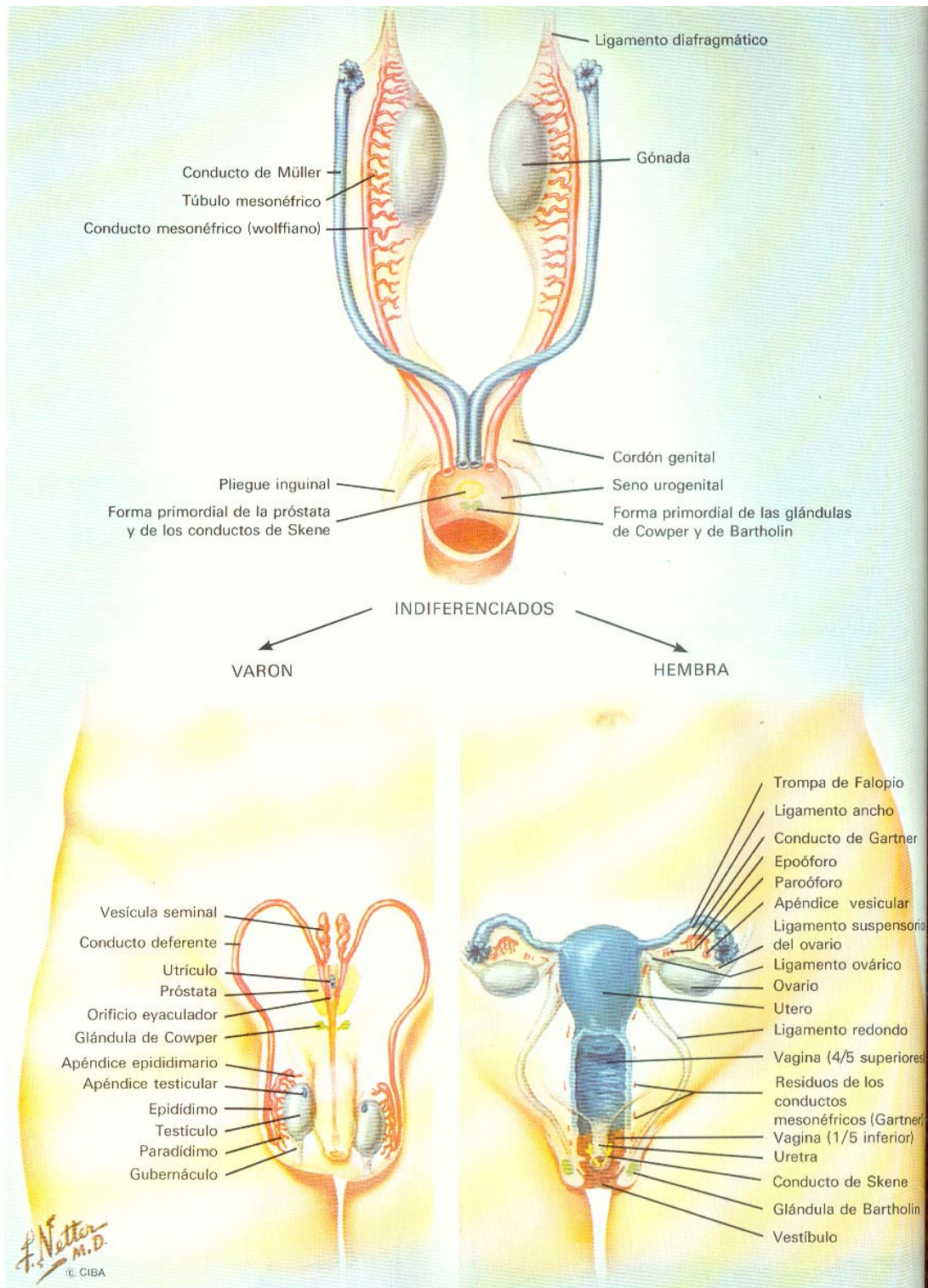
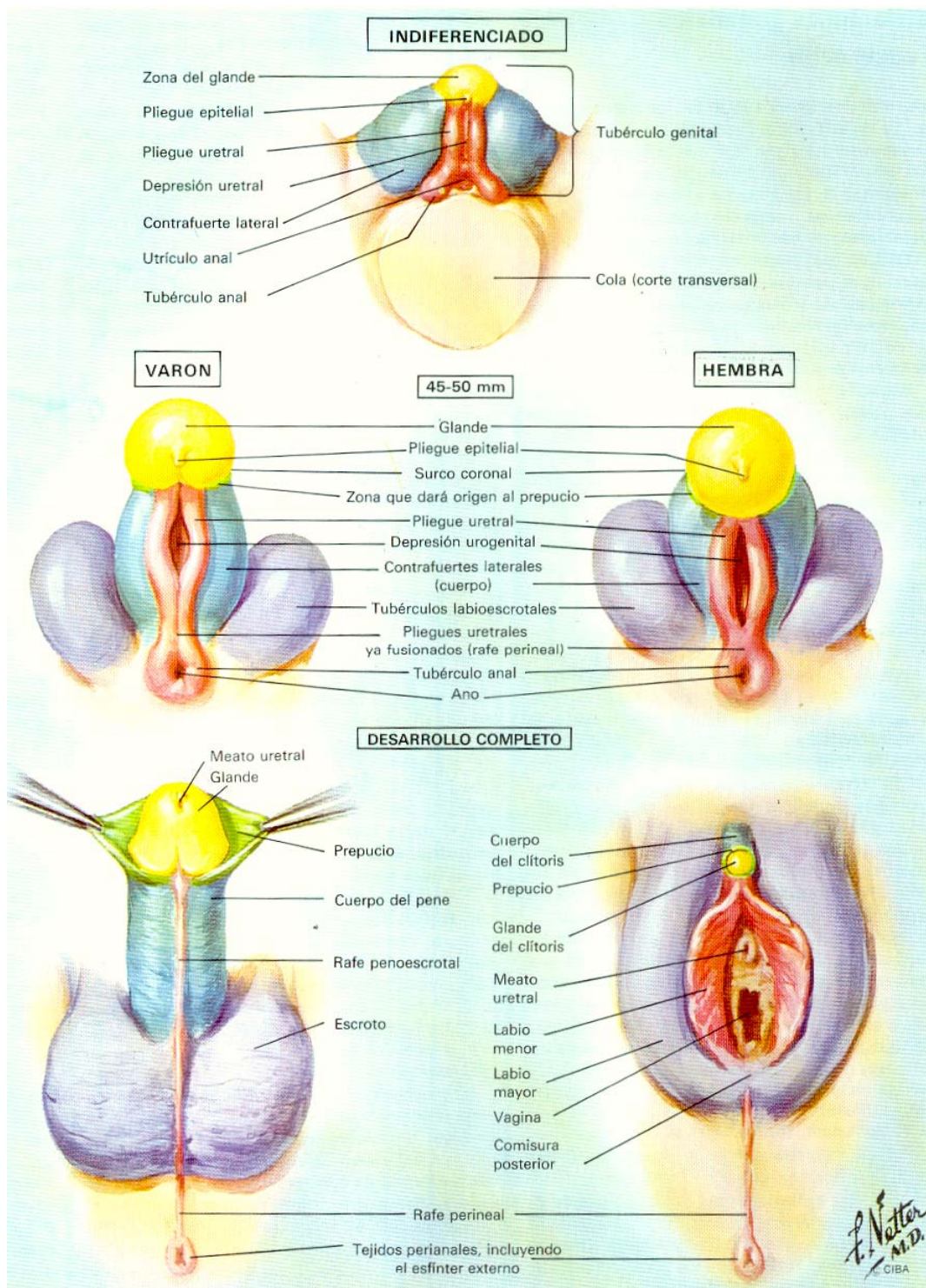


Lámina I. Tomada de Sistema Reproductor .Tomo II. Netter. Colección Ciba de ilustraciones médicas. .Masson-Salvat Medicina.



Lamina II. Tomada de Sistema Reproductor. Tomo II. Netter. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Masson-Salvat Medicina.

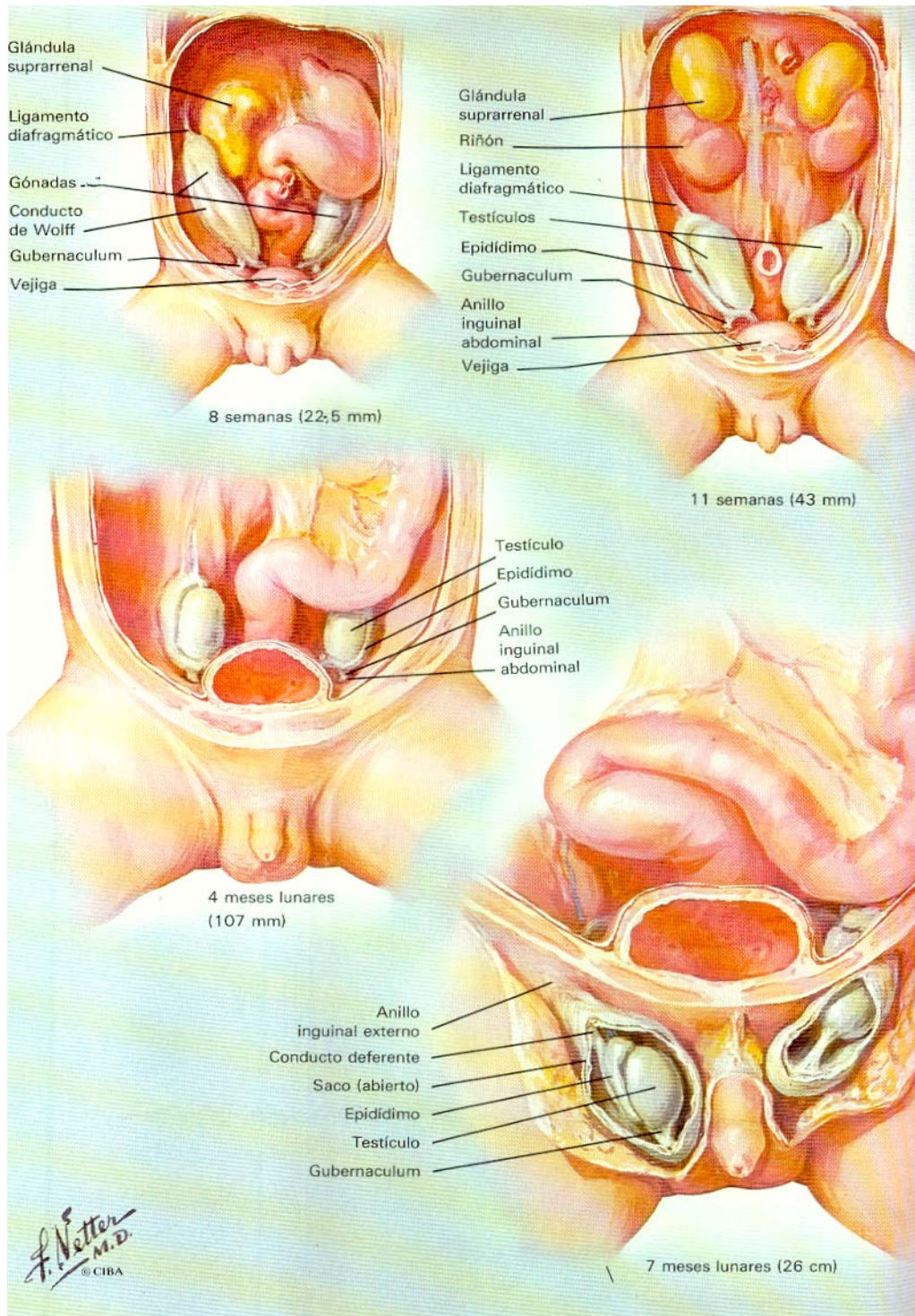


Lámina III. Tomada de Sistema Reprodutor .Tomo II. Netter. Colección Ciba de ilustraciones médicas. .Masson-Salvat Medicina.

2. ANATOMIA DE LOS ORGANOS REPRODUCTORES MASCULINOS

Sólo describiremos los testículos, epidídimos, vesículas seminales y conductos eyaculadores, conductos deferentes y el escroto, sin referirnos al pene, próstata y glándulas periuretrales. (13)

Testículos

Los testículos, órganos primarios de la reproducción o gónadas, están suspendidos en el escroto por los tejidos escrotales (especialmente los músculos dartos, de fibra lisa), y por las estructuras que forman los cordones espermáticos, estando habitualmente el testículo izquierdo algo más descendido (alrededor de 1 cm) que el del otro lado. El promedio de las dimensiones de los testículos es de 4 a 5 cm de longitud, 2,5 cm de anchura y 3 cm de diámetro anteroposterior; su peso varía entre 10,5 a 14 g. Cada testículo tiene una forma elipsoidea, aplastada lateralmente, y presenta una situación oblicua en el escroto; el extremo superior está inclinado en sentido anterolateral, el extremo inferior en sentido posteromedial. El borde anterior es convexo, el borde posterior casi recto y el cordón espermático está adherido a este último. El borde anterior, las caras interna y externa y los extremos de los testículos, son convexos, lisos y están cubiertos por la capa visceral de la túnica vaginal, por medio de la cual están aislados de la capa parietal y, por tanto, de los tejidos escrotales que están por fuera. El borde posterior está recubierto sólo parcialmente por esta membrana. El epidídimo está situado a lo largo de la parte externa del borde posterior. *Lámina IV*

Epidídimo

Está constituido esencialmente por un conducto tortuoso que forma la primera parte de la ruta eferente del testículo. Este conducto está plegado sobre sí mismo muy apretadamente bajo la forma de un cuerpo largo, delgado y aplanado, adherido a la cara posteroexterna del testículo. Está constituido por una región central o *cuerpo*, una parte superior agrandada o *cabeza* y una parte inferior que termina en punta o *cola*. La cabeza está conectada directamente con el polo craneal del testículo por los *conductillos eferentes* de la glándula; la cola está unida al polo caudal por tejido areolar y por un repliegue de la túnica vaginal. Las caras externas de la cabeza y cola del epidídimo están recubiertas por la túnica vaginal y son por tanto "libres"; el cuerpo está también recubierto por dicha túnica excepto a lo largo de su borde posterior. Un fondo de saco de la túnica vaginal, el *seno del epidídimo*, está situado entre el cuerpo del epidídimo y la cara externa del testículo. *Lámina V*

Hidátides

Sésiles y pediculadas. En el extremo superior del testículo, inmediatamente por debajo de la cabeza del epidídimo, existe un cuerpo minúsculo, oval y sésil, denominado *apéndice del testículo o hidátide sésil*, es un residuo del extremo superior del conducto paramesonéfrico. En la cabeza del epidídimo existe un apéndice pequeño con su pedículo (a veces duplicado), *el apéndice del epidídimo o hidátide pediculada*, que se considera generalmente como un vestigio del mesonefros.

El testículo está envuelto por la túnica vaginal, la túnica albugínea y la túnica vascular.

Túnica vaginal

Es la extremidad inferior del proceso vaginal del peritoneo que, en el feto, precede al descenso del testículo desde el abdomen al interior del escroto. Después de que el testículo haya alcanzado el escroto, la parte craneal del proceso vaginal, desde el anillo inguinal interno y hasta una corta distancia del testículo, se contrae y acaba obliterándose. La parte distal queda como un saco cerrado, dentro del cual se invagina el testículo.

Túnica albugínea

Constituye una cubierta fibrosa para el testículo. Es una membrana densa, de un color blanco azulado, compuesta por haces entrecruzados de tejido fibroso blanco.

Túnica vascular

Es la capa vascular del testículo, constituida por un plexo de vasos sanguíneos unidos entre sí por un delicado tejido areolar. Se extiende sobre la cara interna de la túnica albugínea y cubre los tabiques testiculares y, por consiguiente, forma un revestimiento para todos los lobulillos del testículo.

Conductillos eferentes y epidídimo

Los hechos descritos en la sección precedente tienen lugar en la parte más arrollada de los túbulos seminíferos. Cuando éstos alcanzan los vértices de sus lobulillos, están menos contorneados, adquieren una dirección casi rectilínea y se unen formando de 20 a 30 conductos rectos más anchos, de aproximadamente 0,5 mm de diámetro. Los túbulos seminíferos rectos penetran en el tejido fibroso del

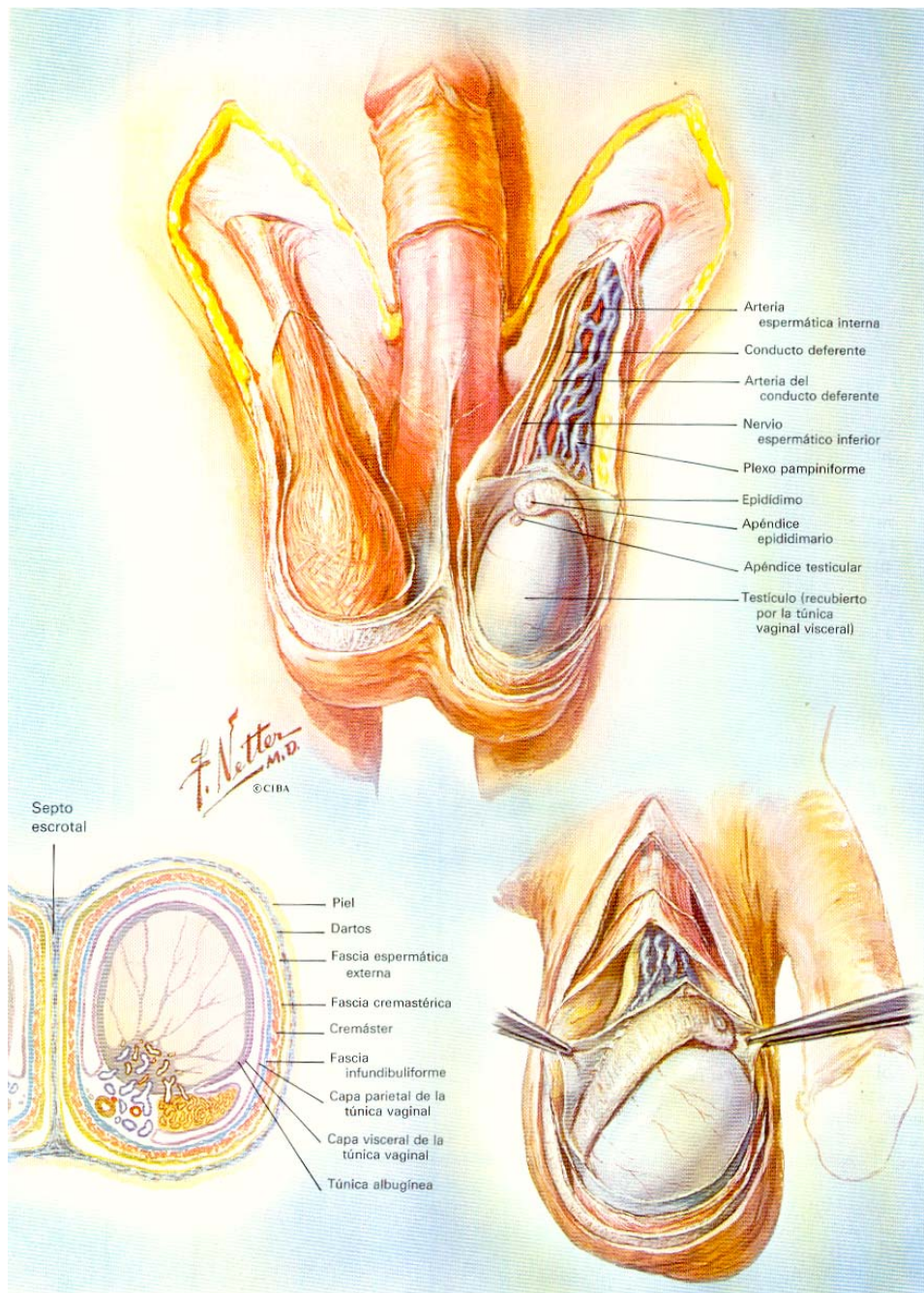


Lámina IV. Tomada de Sistema Reproductor .Tomo II. Netter. Colección Ciba de ilustraciones médicas. .Masson-Salvat Medicina.

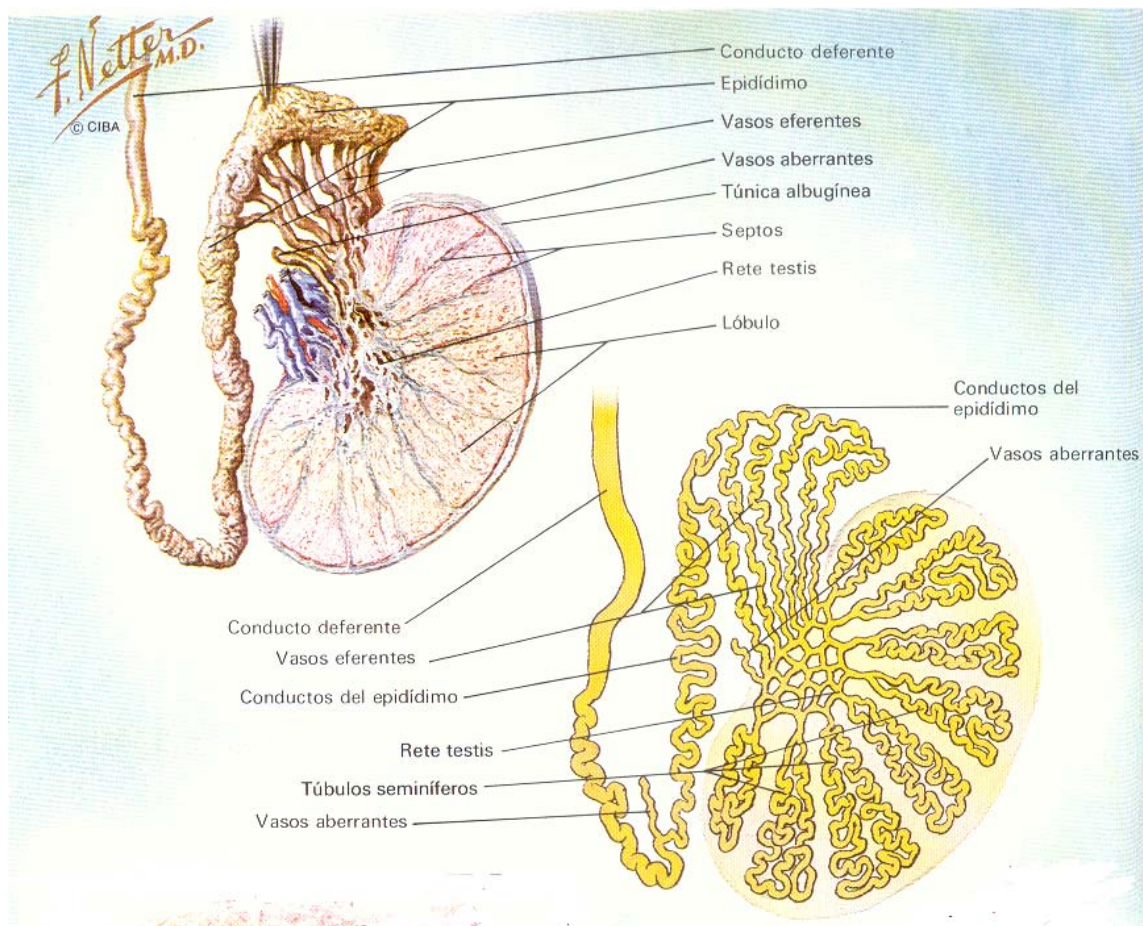


Lámina V. Tomada de Sistema Reproductor .Tomo II. Netter. Colección Ciba de ilustraciones médicas. .Masson-Salvat Medicina.

Cuerpo de Highmoro y pasan hacia arriba y hacia atrás formando en su ascenso una espesa red de tubos anastomosados revestida por epitelio aplanado; esta red es denominada *red de Haller (rete testis)*. En el extremo superior del Cuerpo de Highmoro estos tubos terminan en unos doce o veinte conductos, llamados *conductillos eferentes*; perforan la túnica albugínea y pasan del testículo al epidídimo. Su trayecto es al principio rectilíneo; después se alargan y sumamente arrollados forman una serie de masas cónicas, conocidas como los *lobulillos epididimarios*, los cuales unidos forman la cabeza del epidídimo. Cada lobulillo está constituido por un único conducto, arrollado sobre sí mismo, de unos 15 a 20 cm de longitud. Por el contrario, en la base de los lobulillos los conductos desembocan en un conducto único, el *conducto epididimario*, cuyos complejos arrollamientos forman el cuerpo y la cola del epidídimo. Cuando estos

arrollamientos son estirados, este conducto mide algo más de 6 m de longitud; va aumentando de diámetro y grosor conforme se acerca a la cola del epidídimo donde se convierte en conducto deferente. Los arrollamientos están unidos entre sí por un tejido areolar fino y por bandas de tejido fibroso. Debe tenerse en cuenta que el cuerpo y la cola del epidídimo están constituidos por un solo conducto.

Cápsula Testicular

Las cubiertas del testículo citándolas por orden desde la superficie hacia la profundidad son: *piel, el músculo dartos, la aponeurosis perineal superficial, las fascias espermáticas externa e interna con la fascia cremastérica interpuesta, la hoja parietal de la túnica vaginal, entre ésta y la hoja visceral, un espacio capilar, la túnica albugínea y la túnica vascular*. Las tres últimas capas constituyen lo que se denomina *cápsula testicular*, concepto que ha alcanzado un considerable significado como resultado de la reciente demostración de un elemento contráctil en lo que habitualmente era considerado como una estructura inerte y en gran parte de tejido fibroso. En la túnica albugínea se han descrito abundantes terminaciones nerviosas vegetativas en relación con los vasos sanguíneos y, asimismo, se ha demostrado la presencia en el hombre de células musculares lisas.

Vasos y nervios

Las arterias testiculares. Son dos largos y finos vasos que se originan en la cara anterior de la aorta, algo más abajo de las arterias renales

Las venas testiculares surgen del dorso de los testículos y reciben tributarios del epidídimo; se unen para formar una masa convoluta, el *plexo pampiniforme*, que es el principal constituyente del cordón espermático y que asciende en el mismo por delante del conducto deferente. Por debajo del anillo inguinal externo. Las venas del plexo están drenadas por tres o cuatro vasos que pasan a lo largo del conducto inguinal, entran en el abdomen a través del anillo inguinal interno y convergen en dos venas que se dirigen hacia arriba por delante del psoas mayor y del uréter y por detrás del peritoneo, una a cada lado de la arteria testicular. Estas dos venas se convierten en un vaso único, que en el lado derecho desemboca en la cava inferior formando un ángulo agudo un poco por debajo del nivel de las venas renales, y en el izquierdo finaliza en la vena renal izquierda formando un ángulo recto.

Los vasos linfáticos del testículo desembocan en los ganglios linfáticos pre y lateroaórticos

Conducto Deferente

El *conducto deferente* es la continuación del conducto epididimario. Comienza en la cola del epidídimo, siendo muy tortuoso al principio, pero gradualmente se hace más rectilíneo, ascendiendo a lo largo del borde posterior del testículo y de la cara interna del epidídimo. A partir del polo superior del testículo se dirige en sentido ascendente por la parte posterior del cordón espermático y discurre por el conducto inguinal hasta el anillo inguinal profundo. Al llegar aquí se separa de las otras estructuras del cordón espermático, se incurva alrededor de la cara externa de la arteria epigástrica inferior y asciende unos 2,5 cm por la cara anterior de la arteria iliaca externa. Seguidamente, se dirige hacia atrás y ligeramente hacia abajo y cruzando oblicuamente los vasos iliacos externos, penetra en la pelvis menor, donde prosigue en dirección posterior entre el peritoneo y la pared externa de la pelvis y por la cara interna de la arteria umbilical obliterada, el nervio y vasos obturadores y los vasos vesicales. Entonces cruza el uréter y, alcanzando la cara medial de este conducto, se incurva en ángulo y discurre interna y ligeramente hacia delante entre la superficie posterior de la vejiga y el extremo superior de la vesícula seminal, se dirige hacia abajo y hacia la línea media en contacto con ella y gradualmente se aproxima al otro conducto deferente. En este punto está situado entre la base de la vejiga y el recto, del cual está separado por la fascia rectovesical. Finalmente, se dirige hacia abajo, hacia la base de la próstata y se une en ángulo agudo con el conducto de la vesícula seminal para formar el *conducto eyaculador*.

Vesículas seminales y Conductos Eyaculadores

Las *vesículas seminales* son dos tubos retorcidos y saculados, situados entre la cara posterior de la vejiga y el recto. Cada vesícula tiene alrededor de unos 5 cm de longitud y tiene una forma más o menos piramidal, con la base dirigida hacia atrás, hacia arriba y externamente. Está constituida por un tubo único, arrollado sobre sí mismo, dando lugar a diversos divertículos irregulares; los distintos arrollamientos, así como los divertículos, están unidos entre sí por tejido fibroso. El conducto tiene un diámetro de 3 a 4 mm y su longitud, una vez desenrollado, varía de 10 a 15 cm; su extremo superior acaba en fondo de saco; su extremo inferior va disminuyendo de calibre hasta formar un conducto estrecho y rectilíneo que se une con el correspondiente conducto deferente para formar el *conducto eyaculador*. La cara anterior está en contacto con la cara posterior de la vejiga, extendiéndose desde las proximidades de la terminación del uréter hasta la base de la próstata. La cara posterior está en contacto con el recto, del cual está separada por la fascia rectovesical. Las vesículas por su extremo superior divergen una de la otra y están en relación con los conductos deferentes y las terminaciones de los uréteres, y están recubiertas en parte por el peritoneo. Cada una de ellas está

envuelta en una vaina densa fibromuscular. A lo largo del borde medial de cada vesícula discurre la ampolla de un conducto deferente. Externamente a las vesículas pasan las venas del plexo venoso prostático para unirse posteriormente a la vena iliaca interna. *Lámina VI*

Las arterias que irrigan las vesículas seminales proceden de las arterias vesical inferior y hemorroidal media. Las *venas y vasos linfáticos* acompañan a las arterias. Los *nervios* proceden de los plexos pélvicos.

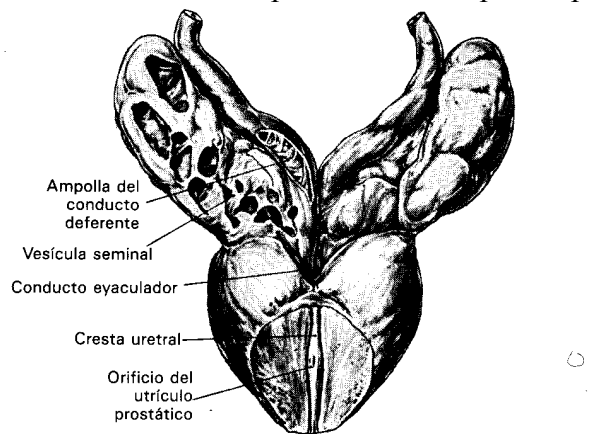


Lámina VI. Tomado de Gray Anatomy. Williams & Warwick. Tomo II

Los *conductos eyaculadores*, uno a cada lado del plano medio están constituidos por la unión del conducto de la vesícula seminal con la parte terminal del conducto deferente y tienen una longitud aproximada de 2 cm. Se inician en la base de la próstata, discurren en sentido anteroinferior entre el lóbulo medio y el derecho (o izquierdo) de la misma, pasan a lo largo de los lados del utrículo prostático y terminan en el colículo seminal, en unos orificios como hendiduras, o justamente dentro de los bordes de apertura del utrículo. Los conductos disminuyen de tamaño y, asimismo, sus terminaciones convergen hacia delante.

Cordón espermático y sus cubiertas

Cuando el testículo desciende a través de la pared abdominal hasta el escroto, arrastra consigo sus vasos y nervios y el conducto deferente. Estas estructuras coinciden en el anillo inguinal profundo y todas juntas constituyen el *cordón espermático*, que mantiene suspendido el testículo en el escroto y se extiende desde el anillo inguinal profundo hasta el borde posterior del testículo; el cordón espermático izquierdo es un poco más largo que el derecho. Entre el anillo inguinal superficial y el testículo, el cordón es anterior al tendón redondeado del adductor mediano y aquí es cruzado ventralmente por la arteria pudenda externa superficial y dorsalmente por la arteria pudenda externa profunda. El cordón espermático atraviesa el conducto inguinal teniendo como relaciones las paredes

del mismo y el nervio abdominogenital menor que pasa por debajo de él. Al pasar a través del conducto inguinal adquiere unas cubiertas procedentes de las capas de la pared abdominal. Estas cubiertas se extienden hacia abajo dentro de la pared del escroto y se denominan *fascias espermática interna, cremastérica y espermática externa*.

Las arterias del cordón espermático son la espermática, la cremastérica y la deferente. Las venas testiculares y los vasos linfáticos del testículo se corresponden a las arterias. Los nervios son el ramo genital del nervio genitofemoral, el nervio cremastérico y el plexo testicular del simpático, unidos por ramificaciones procedentes del plexo pélvico que acompañan a la arteria deferente.

Escroto

El escroto es un saco cutáneo y fibromuscular que contiene los testículos y la parte inferior de los cordones espermáticos, que está colgando debajo de la sínfisis púbica y por delante de la parte superior de los muslos. Su superficie dividida en dos mitades, derecha e izquierda, por un saliente cutáneo o *rafe*, que se continúa anteriormente con la superficie inferior del pene, y dorsalmente a lo largo de la línea media del periné hasta el ano. La *piel escrotal* es muy delgada, de un color oscuro y muchas veces formando pliegues o arrugas. Está poblada de pelos rizados distribuidos regularmente, cuyas raíces son visibles a través de la piel; está provista de glándulas sebáceas, cuya secreción tiene un olor peculiar. También posee numerosas glándulas sudoríparas, células pigmentarias y terminaciones nerviosas que responden a la estimulación mecánica de los pelos y de la piel y a las variaciones de la temperatura ambiental. Carece de tejido adiposo subcutáneo.

El músculo dartos es una delgada capa de fibras musculares lisas, que se continúa alrededor de la base del escroto con la fascia superficial de la ingle y del periné. Envía dentro y en sentido sagital el *tabique del escroto*, que conecta el rafe con la superficie inferior de la raíz del pene y divide al escroto en dos cavidades para los testículos. El tabique escrotal está formado por todas las capas de la pared escrotal, a excepción de la piel que constituye una cubierta continua para todo el escroto. El músculo dartos está íntimamente unido a la piel, pero está conectado con las partes subyacentes por un delicado tejido areolar, por medio del cual le es posible moverse con gran independencia. *Lámina VII*

Las arterias que irrigan el escroto son las pudendas externas, ramas de la arteria femoral las ramas escrotales de la arteria pudenda interna, y la cremastérica, rama de la arteria epigástrica inferior. El plexo subcutáneo de los vasos escrotales es denso y aporta un abundante flujo sanguíneo que lleva a cabo

una pérdida de calor. Las anastomosis arteriovenosas del tipo sencillo pero de gran calibre son notables.

Las *venas siguen* el curso de las correspondientes arterias. Los *vasos linfáticos* desembocan en los ganglios linfáticos inguinales.

Los *nervios son el* *abdominogenital menor* y *el ramo genital del genitofemoral*, los dos ramos escrotales posteriores del nervio perineal y el ramo perineal del nervio cutáneo posterior del muslo.

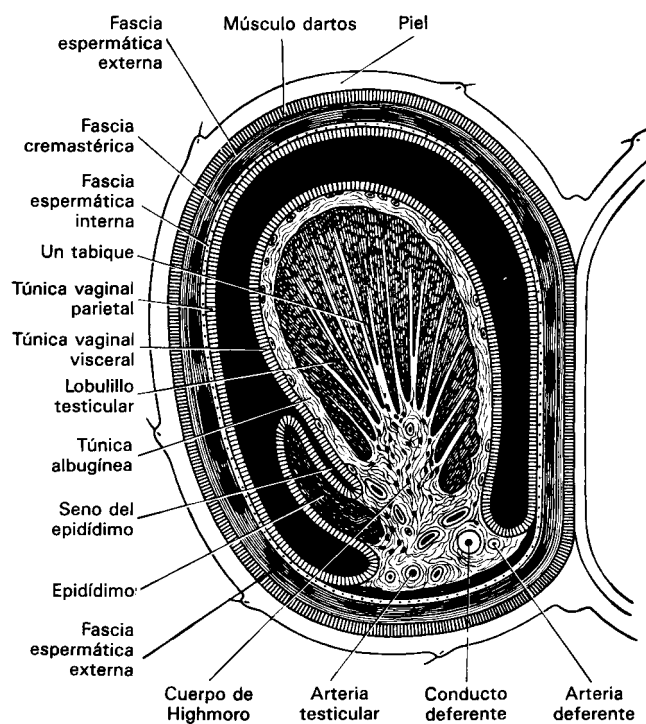


Lámina VII. Tomado de Gray Anatomy. Williams & Warwick. Tomo II

3. HISTOLOGIA DEL TESTICULO

Estructura del testículo

La cubierta superficial del testículo es una capa de células mesoteliales planas similar a la que recubre la cavidad peritoneal. Algunos autores consideran estas células mesoteliales como remanentes del epitelio "germinal". La estructura glandular interna está formada por los *lobulillos del testículo*. Su número, en el testículo humano, se calcula entre 200 y 300. Estos lobulillos difieren de tamaño de acuerdo con su posición, siendo los del centro del testículo más grandes y más largos. Cada lobulillo contiene de uno a tres, o más *túbulos seminíferos, contorneados* diminutos. Cuando estos últimos son aislados por medio de una cuidadosa disección bajo el agua, unos se ven comenzar con extremos ciegos libres y otros con anastomosis entre ellos. Actualmente se acepta de modo general esta descripción. Están inmersos en un tejido conjuntiva laxo que contiene grupos dispersos de *células intesticiales de Leydig* que contienen gránulos de pigmento amarillo. El número total de túbulos en cada testículo se calcula entre 400 y 600, y la longitud de cada uno de ellos es de 70 a 80 cm. Su diámetro varía de 0,12 a 0,3 mm. Los túbulos son de color pálido en la juventud, pero en los ancianos contienen mucha materia grasa, por lo que adquieren un tinte amarillo oscuro.

Cada túbulo está constituido por una membrana basal formada por tejido conjuntivo laminar que contienen numerosas fibras elásticas, con células aplanadas entre las capas y recubierto externamente por una capa de células epitelioides aplanadas.

Conforme se avanza en edad la membrana basal se hace más gruesa y densa. Por dentro de la membrana basal está el epitelio del túbulo seminífero, que está constituido por dos elementos, uno *espermatogénico* y el otro de *sostén*, en el más amplio sentido de la palabra y no solamente en sentido mecánico. El primer grupo incluye, en el testículo activo, unas células ordenadas desde la espermatogonia y sus formas derivadas, espermatoцитos y espermátides hasta su último producto, los espermatozoides maduros.

Entre las espermátides puede haber también *cuerpos residuales*. Estos son estructuras esféricas derivadas de las espermátides, de las cuales se han separado los cuerpos que contienen residuos membranosos y mitocondriales, así como numerosos ribosomas libres. Su papel exacto en la espermatogénesis no está clarificado todavía, a pesar de los intensos estudios, pero parece ser están involucrados en la regulación de la espermatogénesis; sufren una autólisis y quizás una fagocitosis por las células de sostén, a medida que los espermatozoides maduros son liberados. (14)

Las *espermatogonias* son las células base de las que derivan todos los espermatozoides, y ellas mismas descienden de aquellas células germinales primordiales que llegan y se multiplican en los cordones genitales del testículo en desarrollo, donde a veces son denominadas *gonocitos*. En el testículo completamente diferenciado están situadas a lo largo de la membrana basal de los túbulos seminíferos.

Los *espermatoцитos primarios*, conteniendo un contenido cromosómico diploide, se dividen para formar *espermatoцитos secundarios* con un contenido haploide de cromosomas; ello constituye la división nuclear denominada meiosis. A su vez, los espermatoцитos secundarios sufren la segunda división meiótica para formar *espermátides*. Ambos tipos de espermatoцитos y espermátides sufren una serie de cambios, reconocidos principalmente por las actividades nucleares, aunque por supuesto en esto último le acompañan profundas modificaciones en el soma de cada espermátide hasta llegar a ser los *espermatozoides maduros flagelados*.

Los espermatoцитos primarios pasan por un estadio final o *proleptoténico*, seguido por los estadios leptoténico, cigoténico, paquiténico y diploténico, los cuales pueden ser identificados. Los espermatoцитos secundarios se dividen mucho más rápidamente en espermátides.

Las *espermátides* maduran gradualmente y se convierten en *espermatozoides* a través de una serie de modificaciones nucleares y citoplásmicas, habiendo sido identificados los distintos estadios de acuerdo con la forma del núcleo, pudiendo reconocerse generalmente espermátides "redondas" y "alargadas". Con su desarrollo la multiplicación espermatogénica es habitualmente considerada como dirigida hacia un fin. Así, se puede ahora apreciar que el espectro de tipos de células identificables en el epitelio seminífero es de una gran complejidad, debiendo añadirse a éstos los elementos de sostén del epitelio.

Las células de sostén o soporte (de Sertoli), son los únicos elementos no germinales de la compleja población de los túbulos seminíferos. Son células algo polimórficas, tanto en sus características nucleares como somáticas. Han sido el sujeto de muchas controversias, y en los túbulos seminíferos en desarrollo han sido identificados una variedad de tipos de células de sostén, que no entran en la categoría de las de Sertoli. Sin embargo, se da por sentado que la mayor parte de las células no germinales de los túbulos del testículo funcionante de los mamíferos adultos están limitadas a este tipo. Estas células de sostén están situadas en la membrana limitante de los túbulos, ocupándola casi toda, con exclusión de alguna espermatogonia ocasional. En cortes tangenciales son células poligonales; en cortes transversales son casi irregulares, pero aproximadamente cilíndricas. Sus

perfiles apicales son, sin embargo, más complicados por presentar recesos en los que las espermátides y espermatozoides se acomodan hasta que estos últimos están lo suficientemente maduros como para liberarse; también se extienden prolongaciones citoplásmicas entre las espermatogonias y espermatocitos. Esta disposición sugiere marcadamente que las células de sostén mantienen una cohesión estructural entre los variados elementos del epitelio. La microscopía electrónica ha refutado el antiguo punto de vista de que estas células formaban un sincitio, revelando que sus superficies contiguas de hecho están unidas entre sí por una variedad de contactos especializados parecidos, ligeramente, a las uniones celulares "apretadas". El núcleo es irregular, a veces dentado, y débilmente positivo a la tinción de Feulgen. Contiene uno o dos nucléolos pironinofílicos, pudiendo ser tres, y constituyendo un nucleolo y dos cuerpos electrodensos. El citoplasma contiene abundantes organelas, particularmente mitocondrias, retículo endoplásmico, gránulos de secreción, complejos de Golgi, ribosomas, microfilamentos y microtúbulos. Esta última formación, presumiblemente un tipo de citosqueleto, podría ser también un factor en el efecto de cohesión de las células de sustentación en otros epitelios unidos. Este y otros detalles sugieren también que estas células ejercen una influencia metabólica en relación con los elementos germinales; se consideran, en suma, como fagocitos y quizá para ejercer una influencia endocrina. Estos mismos sufren cambios considerables durante el ciclo espermatogénico y están influidos por las hormonas hipofisarias LH y FSH. Juegan también cierto papel en el mecanismo de la *barrera testículo-hemática*. (15)

Conductillos eferentes

Los conductillos eferentes están revestidos por epitelio cilíndrico ciliado y tienen dispuestas circularmente en sus paredes una delgada capa de fibras musculares. En el conducto epididimario la capa muscular se hace más gruesa y el epitelio es cilíndrico pseudostratificado. Las células superficiales (15 μm) tienen largas microvellosidades, regulares, con un diámetro aproximado de 0,2 μm . Debido a su semejanza aparente a los cilios, estas estructuras son a menudo denominadas *estereocilios*, pero carecen de la morfología ultraestructural característica de los cilios móviles.

Tejido intersticial testicular

Las células intersticiales del testículo, habitualmente denominadas **células de Leydig** incluyen también otras variadas células, algunas del tipo del tejido conjuntivo, junto con los vasos y nervios situados entre los túbulos seminíferos. El origen de las células intersticiales específicas (de Leydig) es probablemente mesenquimatoso, pero también se ha señalado que pueden proceder del blastema

mesonéfrico. Estas células aisladas o agrupadas existen en el tejido intertubular de muchos vertebrados incluido el hombre. Son células grandes, poliédricas, con un núcleo excéntrico que contiene de uno a tres nucléolos y poseen un citoplasma escaso que forma mal los colorantes. Contienen abundante retículo endoplásmico liso (rico en ácido ascórbico), vacuolas conteniendo grasas, fosfolípidos y colesterol, pareciéndose en muchos aspectos a las células intersticiales del ovario, a las células amarillas del cuerpo lúteo, y a las células de la corteza suprarrenal. Su efecto masculinizante fue demostrado hace casi unos cien años, pero las dudas sobre si son la única fuente de andrógenos testiculares todavía no han sido completamente eliminadas. La mayoría de las evidencias experimentales han demostrado la carencia de funciones endocrinas de este tipo en los túbulos en vez de probar que las células intersticiales son el origen de los andrógenos. Sin embargo, se acepta de modo general que secretan andrógenos, no pudiendo en la actualidad atribuírselas ninguna otra función. Estas células son autoestimuladas en su actividad por la hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH, idéntica a la *LH*) y posiblemente por la hormona foliculoestimulante (FSH) del lóbulo anterior de la hipófisis cerebral. En las criptorquidias, donde los testículos están retenidos en el conducto inguinal y por tanto sujetos a un ambiente de mayor temperatura, el nivel de producción de andrógenos, así como de espermatozoides, está deprimido, sin que, a pesar de ello, se hayan apreciado cambios morfológicos en las células intersticiales. Los andrógenos estimulan el crecimiento y actividad de las glándulas accesorias del aparato genital masculino (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales) y asimismo los cambios sexuales secundarios en la pubertad, crecimiento del vello facial, axilar y pubiano, agrandamiento de la laringe y de los senos aéreos paranasales y el crecimiento adicional característico del esqueleto del varón. La mayoría de estos cambios son inhibidos por estrógenos (cuando se encuentran en cantidad suficiente), especialmente cuando la secreción androgénica está disminuida, como ocurre en algunos casos de eunucoïdes. La proporción de células intersticiales (de Leydig) respecto a los otros componentes del tejido intertubular sufre variaciones de acuerdo con las diferentes edades y en ciertas condiciones clínicas. Tras un período inicial de multiplicación en el inicio de la vida fetal, parecen atrofiarse en la época del nacimiento, aunque hay algún desacuerdo en si en ese momento desaparecen o están simplemente disminuidas en número en el período posnatal inmediato. Generalmente se está de acuerdo en que reaparecen en el período prepuberal y desarrollándose quizás a partir de células mesenquimatosas.

Conducto Deferente

La pared del conducto deferente tiene las capas habituales de tales conductos, *areolar* externa, *muscular* intermedia y *mucosa* interna. La capa muscular es gruesa y de fibras lisas, dispuesta en un estrato longitudinal externo y

otro circular interno. Existe también una capa longitudinal interna en el inicio del conducto. Todos los estratos musculares están entremezclados en una notable extensión. La túnica mucosa interna está dispuesta en pliegues longitudinales. El epitelio es cilíndrico, sin cilios en la mayor parte del conducto; una porción variable hacia el final del conducto posee un epitelio bilaminar de células cilíndricas, mostrando la parte superficial estereocilios inmóviles. Muchas de las células epiteliales cilíndricas son secretoras por naturaleza;

Vesículas seminales

Las vesículas seminales poseen tres capas: una *areolar* externa, una *muscular* media, más delgada que la del conducto deferente y dispuesta en dos estratos (una externa longitudinal y otra interna circular), y una capa *mucosa* interna que tiene una estructura reticular. El epitelio es cilíndrico y en los divertículos se encuentran células caliciformes, cuya secreción constituye una gran parte del líquido seminal. La secreción es ligeramente alcalina y contiene fructosa (que abastece los requerimientos energéticos de los espermatozoides) y una enzima coagulante (vesiculasa). Las vesículas seminales no constituyen un reservorio para los espermatozoides, los cuales saliendo del testículo quedan almacenados en el epidídimo (y posiblemente en la ampolla del conducto deferente). Las vesículas se contraen durante la eyaculación y su secreción constituye la mayor parte del volumen del líquido eyaculado. La microscopía electrónica de la mucosa de la vesícula seminal humana ha revelado un segundo tipo de células epiteliales entre las células cilíndricas. Se trata de unas pequeñas células estrelladas, situadas generalmente entre las porciones basales de las células cilíndricas, las cuales contienen pocas organelas citoplasmáticas. Las células cilíndricas tienen microvellosidades en la superficie que limita la luz del conducto, contienen numerosas mitocondrias, un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y un aparato de Golgi caracterizado por sus numerosas vacuolas secretoras.

Conductos eyaculadores

Las paredes de los conductos eyaculadores son delgadas. Están constituidas por: una *capa fibrosa externa*, la cual desaparece casi completamente más allá de la entrada de los conductos en la próstata, una capa de células *musculares* lisas consistente en una capa externa circular delgada y otra capa interna longitudinal, y una *mucosa* cubierta de epitelio cilíndrico

Cordón espermático

El cordón espermático está compuesto por arterias, venas, vasos linfáticos, nervios y el conducto deferente, unidos entre ellos por tejido areolar.

4. NEOPLASIAS TESTICULARES O TUMORES DE CELULAS GERMINALES

Los tumores de células germinales (TCG) del testículo representan el 1% de los tumores malignos del varón (1) y es el tipo de cáncer mas frecuente entre los 15 y 34 años, constituyendo el 28% del total de tumores (2). Su diagnóstico es de gran importancia ya que dejado a su evolución natural lleva a la muerte al 85% de los enfermos en el curso de 2 a 5 años. Sin embargo, en la actualidad, es uno de los tumores malignos con una supervivencia mayor, que ronda el 95% y ello es debido al éxito del tratamiento multimodal que combinan la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia utilizando uno o varios de ellos (3).

Las neoplasias de células germinales predominan en jóvenes (35-45 años), con excepción del *seminoma espermatocítico*. Su incidencia aumentó progresivamente en el siglo XX; presentan variaciones raciales (EEUU: menor incidencia en población no blanca) y son más frecuentes en clases sociales altas y profesionales. En España su incidencia se sitúa entre 0,5 y 1,9 casos por cada 100.000 habitantes/año. (16)

Diagnóstico

Para el diagnóstico, junto con la exploración física se utiliza la ecografía escrotal que es el método por excelencia con una sensibilidad cercana al 100% aunque tiene una especificidad menor, limitada por condicionantes de la técnica que es muy explorador dependiente (4). Los tumores de testículo pertenecen al grupo de neoplasias capaces de producir los llamados “*marcadores testiculares*”, que son proteínas fácilmente medibles por Radioinmunoensayo (RIA) y que presentan una elevada sensibilidad y una relativa especificidad, siendo éstos de dos tipos: sustancias oncofetales que se producen tan sólo durante el desarrollo embrionario (*alfafetoproteína* y *gonadotropina coriónica*) y enzimas celulares (*lactatodeshidrogenasa*, *fosfatasa alcalina placentaria* y *gammaglutamil transpeptidasa*), aunque éstos últimos no han contribuido de forma significativa al manejo de los pacientes con tumor testicular (17).

Etiopatogenia

Hasta la fecha no hay una teoría definitiva que explique la etiología y patogenia de los TCG del testículo; sin embargo, los datos clínicos y experimentales disponibles en la literatura apoyan la hipótesis de la intervención de *factores congénitos* en la carcinogénesis y también durante el desarrollo de la célula germinal primordial de *factores ambientales o adquiridos* que pueden alterar el proceso de su diferenciación normal. Se han propuestos *factores*

congénitos: criptorquidia, historia familiar de TCG, ciertos haplotipos HLA, el síndrome de Marfan, síndrome de Down, síndrome de nevus displásicos, probablemente el síndrome de Li-Fraumeni, factores raciales y *factores adquiridos*: estrógenos, agentes infecciosos (Parvovirus B19, infección herpética,...), agentes químicos, infertilidad, traumatismos, atrofia testicular.

Existen situaciones bien definidas de aumento de riesgo de tumores testiculares de células germinales. Entre ellos la *criptorquidia* es el factor mejor establecido, encontrándose un 10% de tumores de células germinales con un antecedente de criptorquidia. A su vez la criptorquidia implica de 10 a 14 veces mayor riesgo de padecer un tumor de células germinales. Este mayor riesgo parece deberse a la situación de disgenesia en testículos criptorquídicos e implica unas medidas de prevención, realizando biopsias testiculares bilaterales en pacientes criptorquídicos entre los 18-20 años.

Otro factor de aumento de riesgo es la existencia de un tumor *germinal testicular previo*, con mayor riesgo incluso si el testículo residual es atrófico o criptorquídico o existen antecedentes en la historia familiar. Por tanto, es preceptiva la realización de biopsia del testículo contralateral indicada al tiempo de la orquiectomía inicial.

Una *historia familiar* de tumores testiculares de células germinales también constituye un mayor riesgo, así como, ciertos *síndromes intersexuales* (disgenesia gonadal con cromosoma Y, insensibilidad a los andrógenos y feminización testicular) y la *infertilidad oligozoospermica* que es el menos establecido de los cinco factores de riesgo.

Multifocalidad

A pesar de no ser tan habitual como en otros órganos urológicos, los tumores germinales testiculares también pueden ser múltiples. Lo más frecuente es la bilateralidad, entre el 1 y el 4% y se presentan de forma metacrónica en más del 75% y del mismo tipo histológico, salvo aisladas excepciones (18,19,20). Esta prevalencia sigue incrementándose desde la introducción de la quimioterapia sistémica con Cis-platino.

Existe la teoría de que la atrofia testicular puede ser el paso común final de la cadena etiopatogénica, al que conducen los distintos factores etiológicos implicados en este tipo de tumor. La atrofia testicular reduciría la inhibición feedback que normalmente produce el testículo sobre el hipotálamo, debido a la falta de producción de inhibina, originando un incremento de la liberación de gonadotropinas a nivel hipotalámico e hipofisario, particularmente la FSH. Esta

hormona acelera la proliferación celular de las espermatogonias residuales y, por tanto, incrementa el riesgo de pérdida cromosómica a partir de células tetraploídicas inestables de una NICG. Con un menor tiempo para reparar la lesión del DNA causado por mutágenos ambientales, las gonadotropinas promueven la evolución clonal de estas células y la transformación de una NICG en un carcinoma testicular invasivo. Este hecho suele suceder en el 50-70% de los casos a los 5 años. La pérdida inicial de cromosomas (material genético) convertiría una NICG inestable (tetraploide, 4,2,N) en un seminoma invasivo (3,6,N) y las pérdidas sucesivas en un tumor no seminomatoso (2,8,N). Estos datos apoyarían la **teoría de la histogénesis común** del tumor germinal propuesta por Ewing y Friedman, quienes defendieron que todos los tumores germinales pasaban por una fase de seminoma. De la célula germinal se desarrollaría la NICG, de ésta el seminoma, después tipos combinados seminoma-no seminoma (como el teratoma maligno) y con último escalón se desarrollaría el tumor seminomatoso. El único tumor no explicable por esta hipótesis es el seminoma espermatocítico.

Una segunda teoría citogenética fue la propuesta por Pierce y Abell, según la cual, seminoma y no seminoma se desarrollaban independientemente de la célula primordial germinal y se denominó **teoría dualista**. (21)

Mostofi afirmó que todos los tipos celulares pueden provenir directamente de la célula germinal, sin necesidad de un paso obligado por un tipo específico previo, aunque no niegue tal posibilidad y esto estaría apoyado por el hallazgo de NICG en la mayoría de tipos de tumores de células germinales (22).

Ulbright presenta el esquema (Figura 1) de la patogénesis de los tumores a partir de NICG que es el de mayor aceptación (23,24)

Los TCG son pluripotenciales mostrando una diferenciación a tejidos embrionarios y extraembrionarios (25). Histológicamente, y de manera sencilla se clasifican en *seminomas* y tumores *no seminomatosos*, derivando ambos de un estadio preinvasivo llamado neoplasia intratubular de células germinales (26). Este término se refiere a la lesión iniciamente descrita por Skakkebaek (27) como “carcinoma in situ” o formas “diferenciadas” de neoplasia intratubular de células germinales (NICG) y sirve como paradigma para el concepto de progresión desde neoplasia incipiente o preinvasiva. Es claro que la NICG es la lesión precursora de todos los tipos de TCG, al menos aquellos derivados de las gónadas en la época postpuberal. Fueron un grupo de patólogos entre los que se encontraban los Dres. Scully, Juan Rosai, FKK Mostofi y Robert Lurman los que establecieron que la nomenclatura correcta era en ese tipo de lesión la de Neoplasia Intratubular de Células Germinales (NICG) inclasificado porque no procedía de diferenciación

epitelial y estaba asociada a todos los tipos de TCG con la excepción de seminoma espermatocítico.(28)

FIGURA 1 . Patogénesis de las neoplasias testiculares germinales.(Ulbricht, 1999)

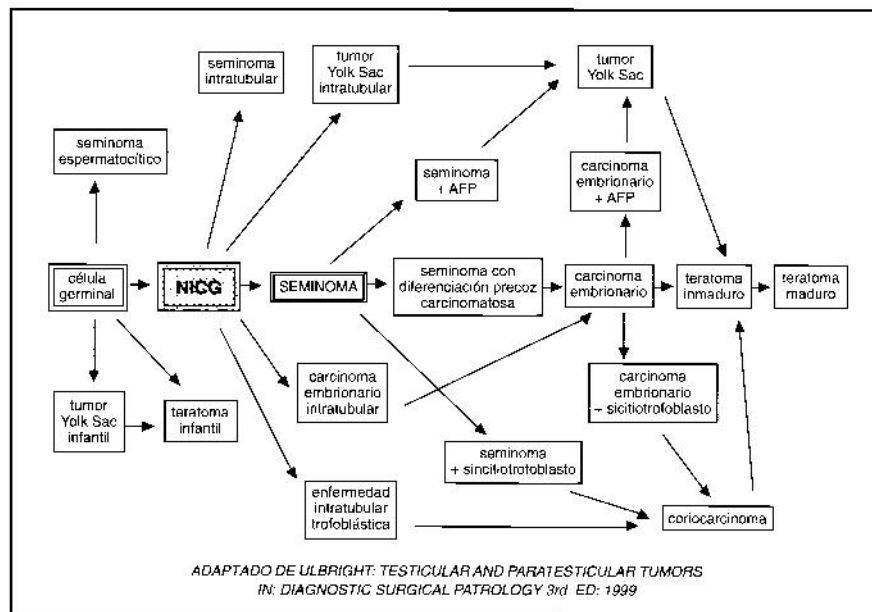


Figura 1

Los TCG han sido los tumores urológicos menos estudiados desde el punto de vista de la patología molecular e inmunohistoquímica, tal vez por su baja incidencia y por el gran impacto que ha representado la poliquimioterapia en los protocolos terapéuticos actuales, con cifras de curación cercanas al 95%.

Existen sin embargo, ciertos elementos que hacen sospechar la importancia de las bases moleculares y genéticas en la etiología de estos tumores (8,29), entre ellos encontramos:

- Diferencias raciales en su incidencia, siendo mas frecuente en países del norte de Europa.
- La aparición de casos bilaterales y familiares.
- Elevada incidencia en individuos con malformaciones genitales (disgenesia gonadal).
- El probable origen del tumor a partir de una célula totipotencial.
- La convivencia de diferentes tipos celulares en un mismo tumor.

- La existencia de una pequeña proporción de pacientes que muestran una resistencia a la quimioterapia.

Todo esto implica que el estudio de la patología molecular de los tumores de células germinales es importante, para caracterizar la patogenia de los diversos tumores y alcanzar una mayor comprensión en su desarrollo y diagnóstico precoz.

Incidencia familiar y cáncer de testículo

Numerosos estudios apoyan el origen de factores genéticos en la predisposición familiar de los TCG. Así Forman et al (30) refieren que el riesgo de desarrollar cáncer testicular en hermanos de un paciente diagnosticado de TCG es 10 veces superior que el resto de la población y 4 veces más, en la transmisión padre a hijo, apareciendo en estos últimos la neoplasia mucho más tempranamente que su progenitor.

También se ha demostrado que un hombre con TCG tiene un alto riesgo de desarrollar un cáncer contralateral. La presencia de enfermedad bilateral junto a la incidencia familiar apoya la predisposición genética de este tipo de tumor, o bien una mayor susceptibilidad a la exposición común de agentes carcinogénicos.

Patología molecular

Los estudios experimentales demuestran que en general los TCG pasan por diversos estadios de desarrollo, distinguiéndose tres fases (31):

- Iniciación.
- Promoción.
- Progresión.

La *fase de iniciación* representa un simple evento, que puede ser achacable a la exposición a un carcinógeno, virus, mutación genética, en la mayoría de los casos "aletargada" y solo estímulos repetidos provocan una expansión clonal de células tumorales.

La *promoción* puede ser activada tras un periodo de latencia prolongado después de la iniciación, y sus efectos son reversibles incluso después de haber cesado el tratamiento.

La *progresión* representa el estadio final del desarrollo de la neoplasia y es previo al crecimiento invasivo del tumor. Ocurre al azar, es irreversible y está

asociada con cambios en el cariotipo. Una vez que esto ocurre las células se hacen independientes no respondiendo a factores reguladores y de crecimiento externos.

Las nuevas técnicas de análisis genético molecular así como la investigación realizada para conocer la diferenciación y la expresión de los genes en las células neoplásicas han permitido conocer mejor la posible etiología del TCG y mediante ese estudio, el descubrimiento de nuevos marcadores. Los marcadores moleculares, como los oncogenes y los genes supresores de tumores, se estudian a partir de ADN y ARN procedentes de tumores y se comparan con el ADN o el ARN normales. Los oncogenes son protooncogenes mutados que codifican diversas proteínas, capaces de actuar como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, reguladores de la síntesis de ADN, etc. La expresión de los oncogenes o la pérdida de expresión de los genes supresores de los tumores puede ser consecuencia de alteraciones cromosómicas que, a su vez, pueden estudiarse mediante diferentes técnicas citogenéticas: cariotipo, citometría de flujo, estudios de oncogenes y mecanismo de expresión génica (32).

Análisis citogenético

La alteración citogenética observada con mayor frecuencia en los TCG es la presencia de un isocromosoma en el brazo corto del *cromosoma 12* [i(12p)] en el 80% de los casos. En el 20% restante existen reordenaciones en el cromosoma 12, afectando 12p13 y además copias extras de 12p. La presencia en las células del isocromosoma produce alteración en el contenido de ADN celular y alteraciones en el genotipo. El [i(12p)] también se ha detectado en la NICG lo cual refuerza la hipótesis del origen común de los TCG y la importancia de dicha alteración en la génesis de estos tumores.

Las biopsias de estos tumores estudiadas por FISH (fluorescencia in situ) han corroborado la presencia de un alto número de copias de [i(12p)] en tumores no seminomatosos (75%) comparados con los seminomas (7%). La importancia clínica de estos hallazgos todavía no ha sido determinada, algunos autores piensan que tiene una gran importancia con el pronóstico del tumor, pero en otras series, esto no ha sido corroborado. Comparando entre los tumores testiculares con o sin [i(12p)] no se han demostrado diferencias histológicas, clínicas, tipo de tumor, metástasis, invasión vascular, etc (33). Otro cromosoma afectado en los TCG es el *cromosoma 1*, en este cromosoma se encuentra los oncogenes N-ras, L-myc y C-src-2.

Ploidía

La fracción de células tumorales que están en fase de síntesis de ADN comparadas con el total de la población celular tumoral determina la agresividad y potencial maligno de la neoplasia. Los datos de cinética celular indican que el índice de proliferación de una neoplasia está fuertemente ligado con su pronóstico. De Reise (34) encontró correlación entre el estadio patológico y la población de células aneuplóides en fase S y G2M. En contraste Fossa et al (35) no encuentran diferencias significativas en la correlación entre el índice de ADN y la fase S con el estadio patológico final.

Marcadores de proliferación celular

La medición de la capacidad proliferativa de un tumor se pueden realizar con técnicas de inmunohistoquímica tales como el MIB-1 (Ki67) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). La expresión de ambos ha mostrado su importancia como factor pronóstico en los TCG. En un estudio de Fernández et al (36) se analizó la expresión de PCNA y hallazgos histológicos como la invasión vascular y presencia de carcinoma embrionario en tumores de células germinales testiculares no seminomatosos en los estadios I y II. Siguiendo un algoritmo basado en criterios histológicos (volumen de carcinoma embrionario), radiológicos (tamaño de ganglios linfáticos en las zonas de drenaje), e inmunohistológicos (porcentaje de células que expresan MIB-1), se establecen grupos de tumores de células germinales no seminomatosos en estadio 1 de alto y bajo riesgo para presentar metástasis ocultas.

Proto-oncogenes y factores de crecimiento

Las alteraciones en los cromosomas 12, 1 y 15 y su correlación con los TCG han provocado la búsqueda de oncogenes en estos cromosomas y su relación con estas tumoraciones. Se localizan abundantes proto-oncogenes en los siguientes cromosomas:

Cromosoma 1: *C-N-ras*, *L-myc* y *c-src-2*.

Cromosoma 11: *C-Ha-ras*, *receptor de insulina*, *factor de crecimiento insulina-like*.

Cromosoma 12: *C-K-ras-2*.

Genes supresores tumorales

Los genes supresores más estudiados en los TCG han sido *el p53* y *el gen del retinoblastoma*. Varios autores han demostrado por técnicas de

inmunohistoquímica que la expresión de la proteína p53, está aumentada en 84-95% de los TCG (37,38). Lewis et al (39) detectaron expresión de p53 en el 90% de los seminomas y en el 94% de los tumores no seminomatosos.

La expresión del gen del retinoblastoma en los TCG es baja tanto en los tumores seminomatosos como en los no seminomatosos. Con técnicas de inmunohistoquímica no se ha detectado expresión de proteína de retinoblastoma en tumores indiferenciados (seminomas, carcinomas embrionarios, coriocarcinomas), mientras que los tumores mas diferenciados (teratoma, teratocarcinoma) si mostraban una alta expresión.

Tratamiento (5,6,7)

El tratamiento inicial para todos los tumores testiculares de células germinales es la Orquiectomía Radical, esto es vía inguinal, con ligadura alta del cordón espermático. Los hallazgos histológicos y estudios de extensión y marcadores determinan el tratamiento posterior.

Los pacientes con Seminoma clásico pueden recibir irradiación del retroperitoneo, tanto si existe o no evidencia clínica o de imagen de extensión linfática (metástasis), o recibir quimioterapia si presentan enfermedad avanzada. Existe controversia sobre si el seminoma espermatocítico debe ser tratado con orquiectomía con o sin radioterapia posterior.

El tratamiento de los NSGCT en estadios I y II es controvertido y está en constante cambio. Tras la Orquiectomía puede seguir linfadenectomía retroperitoneal, radioterapia y/o quimioterapia dependiendo de diferentes aspectos. El protocolo de "surveillance only" (sólo vigilancia), no está indicado en casos con predominio de carcinoma embrionario o tumor con invasión vascular, por la alta probabilidad de metástasis a distancia en estos casos. (5,6,7)

Los tumores del saco vitelino puros en niños, así como los teratomas maduros, son tratados habitualmente únicamente con orquiectomía.

Se ha descrito una alta incidencia de sarcomas en pacientes con tumores de células germinales tratados con radioterapia.

Pronóstico

Varía según estadio clínico y tipo de tumor. Es excelente para el seminoma clásico. A diferencia de otros carcinomas, en los tumores germinales testiculares no se utiliza el concepto de grado para evaluar su pronóstico, sino que se ha relacionado mucho más con el tipo celular, por lo que se considera primordial reconocerlo.

Datos morfológicos que influyen adversamente en el pronóstico son: el tipo y la extensión del tumor a través de la túnica vaginal y en el cordón espermático, la hiperplasia de las células de Leydig en el testículo no tumoral y la invasión vascular. El avance más importante en la monitorización de los tumores testiculares de células germinales ha sido el uso de marcadores séricos: β HCG y α FP y LDH. (5,6,7)

4.1. CLASIFICACION DE TUMORES TESTICULARES

Existe una pérdida de uniformidad en la clasificación de los tumores de células germinales del testículo entre los dos sistemas de clasificación actualmente en uso, uno formulado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) y el otro propuesto por la British Testicular Tumor Panel (BTTP). (40)

La clasificación de los TCG, que se expone a continuación (*Clasificación 1*), es una modificación de la clasificación de la WHO, que se deriva de los trabajos de Friedman y Moore (41), Dixon y Moore (42,43), Melicow (44) y Mostofi y Price (45). El punto de partida de esta clasificación es que todos los distintos tipos morfológicos de tumores de células germinales derivan de células germinales neoplásicas que se diferencian en diversos sentidos. Esta hipótesis se apoya en la virtual relación de todos los tipos morfológicos de neoplasias de células germinales (excepto el seminoma espermatocítico) con la neoplasia germinal inclasificada de células germinales.

El sistema de clasificación de la BTTP (46) deriva de la propuesta original de Collins y Plugh (47). También se incluye una tabla comparativa (*Clasificación 2*) entre alguna de las entidades de la clasificación de la WHO y su equivalente en la nomenclatura británica. En el sistema británico las neoplasias testiculares se clasifican como seminomas o teratomas, subdividiendo estos últimos en indiferenciados, intermedios y trofoblásticos. Estas dos categorías básicas están basadas en el concepto de Willis (48) de que los seminomas se originan en células germinales pero que, los otros tipos tumorales se derivan de blastómeros embrionarios que escapan al desarrollo madurativo normal. La asociación de la neoplasia intratubular de células germinales tanto con el seminoma como con "el teratoma" de la clasificación británica, contradice la teoría histogenética del blastómero de este sistema (BTTP).

Mostofi (49) señala que con el uso de la BTTP existe una pérdida de información en la correlación de determinados tipos histológicos con la presencia de marcadores serológicos y cierta confusión entre entidades que pueden tener diferentes comportamientos biológicos. Por ejemplo, en el sistema británico, el teratoma maligno intermedio engloba carcinoma compuesto por carcinoma embrionario y teratoma, así como aquellos compuestos por tumor del seno endodérmico y teratoma. Estas precisiones diversas en la clasificación tiene repercusiones en el abordaje terapéutico, por tanto, se incluye el sistema modificado de la WHO recomendado por el Instituto de las Fuerzas Armadas de los EEUU, y ampliamente aceptado por urólogos y oncólogos de todo el mundo.(50)

Clasificación de tumores testiculares (Clasificación 1)

I. Neoplasias de células germinales (90-95 %) (ver Clasificación 2)

II. Neoplasias del estroma de los cordones sexuales (4%)

- A. Tumores de células de Leydig (3%)
- B. Tumores de células de Sertoli (1%)
 - Variante: tumores de células de Sertoli esclerosante
 - Variante: tumores de células de Sertoli calcificante de célula grande
- C. Tumores de Sertoli-Leydig
- D. Tumores de células de la granulosa (<1%)
 - Variante tipo adulto (rara)
 - Variante tipo juvenil
- E. Tumores de los cordones sexuales mixtos e indeterminados (inclasificables) (< 1%)

III. Neoplasias mixtas de células germinales y del estroma de los cordones sexuales (< 1%)

- A. Gonadoblastoma (<5%)
- B. Otros tumores mixtos de células germinales y del estroma de las células sexuales (raros)

IV. Tumores de la rete-testis

- Adenoma/Adenofibroma/ Cistadenoma
- Carcinoma

V. Miscelánea (incluyendo tumores inclasificados y tumores de tipo celular incierto)

VI. Tumores paratesticulares (incluyendo tumores del cordón espermático. Alguno de estos tumores son muy raros como primarios en testículo)

- Tumores de epitelio de tipo ovárico
- Tumor adenomatoide
- Mesotelioma maligno
- Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas
- Cistadenoma epididimario
- Carcinoma epididimario
- Tumor melanótico neuroectodérmico (retinal anlage tumor)
- Tumores de tejidos blandos benignos o localmente agresivos:
 - Tumores fibromatosos

- Tumores vasculares
- Angiomixoma agresivo
- Pseudotumor fibroso calcificante
- Otros
- Tumores malignos de tejidos blandos:
 - Rabdomiosarcoma:
 - Embrionario (variante de células fusiformes)
 - Alveolar
 - Otros
- Liposarcoma:
 - Bien diferenciado
 - Pleomórfico/de células redondas
 - Otros
- Miscelánea

VII. Tumores hematopoyéticos.

- A. Linfoma (1 % como neoplasia primaria verdadera)
- B. Plasmocitoma (raro)
- B. Infiltrados leucémicos (raros como manifestación primaria)

VIII. Tumores secundarios

IX. Lesiones no neoplásicas testiculares y paratesticulares

- Hiperplasia de células de Leydig
- Nódulos de células de Sertoli
- Tumor testicular del síndrome adrenogenital
- Nódulos de células esteroideas de otros desórdenes
- Restos de cortical de glándula suprarrenal
- Torsión/infarto (testículo, de apéndices testiculares, de apéndice epididimario) Hematoma/Hematocele
- Apéndices testiculares y nidos de Walthard
- Orquitis/Epididimitis:
 - Infecciosas (bacterianas, virales, granulomatosas)
 - Granulomatosas idiopáticas
 - Epididimitis granulomatosa
 - Sarcoidosis
 - Malacoplaquia
 - Enfermedad de Rosai-Dorfman (histiocitosis sinusal con linfadenopafia masiva)
 - Cambios relacionados con hidrocele
 - Pseudotumor inflamatorio (funiculitis proliferativa)
 - Pseudotumor fibroso

Periorquitis meconal
Hiperplasia mesotelial
Lipogranuloma esclerosante
Anomalías relacionadas con la precocidad sexual
Hipertrofia idipática
Hiperplasia de la rete testis
Quiste epidermoide
Otros quistes (parenquimatosos, de la rete, de túnica albugínea, epididimarios)
Displasia quística
Microlitiasis
Espermatocelo
Granuloma espermático
Vasitis nodosa
Fusión espleno-gonadal
Otros

Clasificación de los tumores de células germinales. (Modific. de la WHO)
(Clasificación 2)

1. Lesión precursora:

- Neoplasia intratubular de células germinales (tipo inclasificado, equivalente a "carcinoma in situ")
- Neoplasia intratubular de células germinales de tipo específico

2. Tumores de un solo tipo histológico

- Seminoma
 - Variante: seminoma con células de sincitiotrofoblasto
- Seminoma espermatocítico
 - Variante: seminoma espermatocítico con un componente sarcomatoso
- Tumor del saco vitelino o del seno endodérmico.
- Tumores trofoblásticos:
 - Coriocarcinoma
 - Tumor del sitio placentario
 - Inclasificado
- Teratoma
 - Teratoma maduro (Variante: quiste dermoide)
 - Teratoma inmaduro
 - Teratoma con un componente secundario maligno
 - Variantes monodérmicas:
 - Carcinoide (puro y con elementos teratomatosos)
 - Tumor neuroectodérmico primitivo
 - Otros

3. Tumores de más de un tipo histológico

- Tumores mixtos de células germinales
- Poliembrioma
- Embrioma difuso

4. T. de células germinales en regresión ("burnt out")

- Sólo cicatriz
- Cicatriz con neoplasia intratubular de células germinales
- Cicatriz con escasas células germinales neoplásicas residuales (teratoma, seminoma, otros)

4.2. ESTADIAJE DE LAS NEOPLASIAS TESTICULARES

Datos relevantes del examen y descripción macroscópica son, aparte de la descripción habitual de cualquier lesión: su relación con la túnica albugínea, las estructuras hiliares y el epidídimo.

Se debe incluir un bloque por cada cm de la dimensión máxima del tumor, reseñando e incluyendo zonas de hemorragia y necrosis. Se recomiendan 10 bloques mínimo o la totalidad del tumor si puede incluirse en menos de 10 en casos de tumores con apariencia de seminoma, con el fin de descartar la existencia de un componente no seminomatoso, que cambiaría el tratamiento.

No existe un único sistema de estadiaje totalmente satisfactorio, y están en uso varios. La mayoría de ellos reconocen: un estadio temprano del tumor (designado como I ó A): confinado al testículo; un estadio de diseminación temprana (II o B): metástasis en retroperitoneo; un estadio de metástasis avanzadas (III o C): sobre el diafragma IIIb. (5,6,7,51,52,53,54)

Comparación de las nomenclaturas del sistema basado en la WHO y BTTP (Tabla 3) (45,46,48,49,51)

<i>Clasificación modificada de la WHO</i>	<i>Clasificación de BTTP</i>
1. Tumores de un solo tipo histológico	
Seminoma	Seminoma
Seminoma espermatocítico	Seminoma espermatocítico
Carcinoma embrionario indiferenciado	Teratoma maligno
Tumor del seno endodérmico	T.del seno endodérmico (sólo neoplasias puras)
Teratoma:	
Maduro	Teratoma, diferenciado (TD)
Inmaduro	TD
Componente carcino o sarcomatoso intermedio(MTI)	Teratoma maligno,
Coriocarcinoma trofoblástico(MTT)	Teratoma maligno
2. Tumores mixtos de células germinales	
Ca embrionario y terat. mad. e inmaduro	MTI
T.del seno endodér. y terat. mad. e inmad	MTI
Seminoma y teratoma	T.combinado (seminoma y
TD) Seminoma y ca.embrionario	T.combinado
(seminoma y MTU) Coriocarcinoma y ca.embrionario	MTT
Coriocarcinoma y teratoma	MTT
Coriocarcinoma y seminoma	T.combinado (MTT y
seminoma)	

4.3. ANATOMIA PATOLÓGICA DE LAS NEOPLASIAS TESTICULARES

1. TUMORES DE CELULAS GERMINALES

Histogénesis

El modelo tradicional de histogénesis de los tumores testiculares se basaba en la hipótesis de que el seminoma y el carcinoma embrionario constituían dos vías divergentes y que los otros tipos de tumores de células germinales derivaban del carcinoma embrionario.

En el nuevo modelo de histogénesis de los tumores de células germinales, la neoplasia intratubular inclasificada de células germinales (NICGi- IGCNU- intratubular germ cell neoplasia unclassified) representa el precursor común de la gran mayoría de neoplasias de células germinales (*Imagen 1*) (excluyendo el seminoma espermatocítico y quizá las formas pediátricas del tumor del saco vitelino y del teratoma).

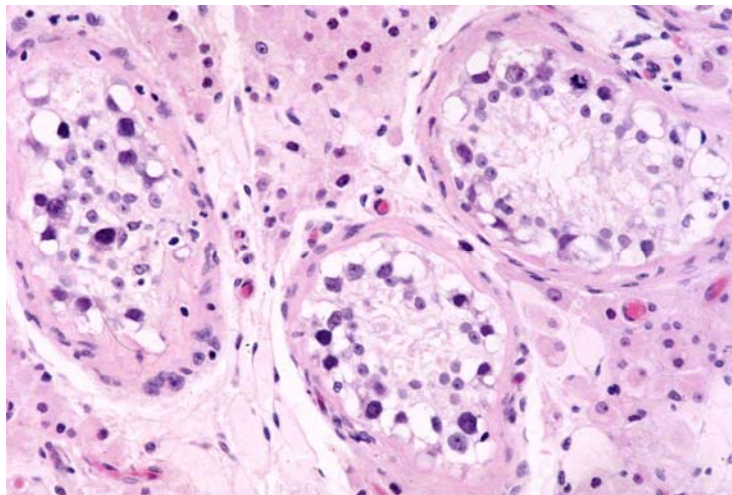


Imagen 1. NICG

La invasión de NICGi resulta en seminoma (*Imagen 2*), que puede, entonces, transformarse en una variedad de otros tipos de tumores de células germinales, con fases intermedias reconocidas. En algunas circunstancias se produce una transformación intratubular de NICGi en formas no seminomatosas, que pueden, posteriormente, invadir el intersticio (51,52)

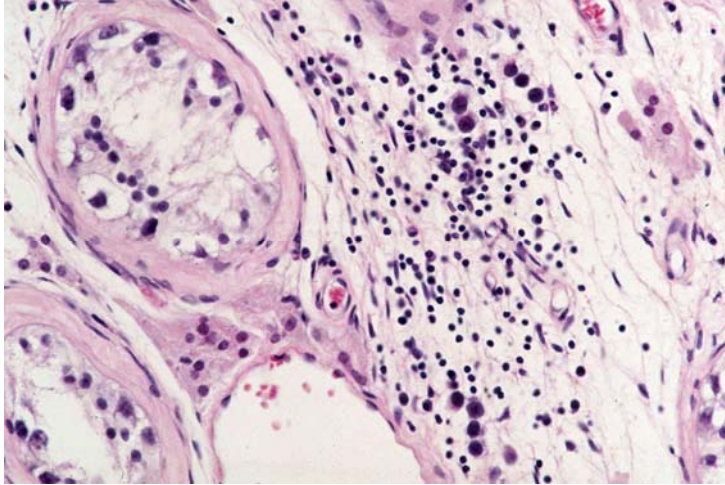


Imagen 2. Seminoma microinfiltrante con NICG

1. Neoplasia intratubular de células germinales indiferenciada (NICGi)

La NICGi se asocia con el amplio espectro morfológico de los tumores germinales, con la excepción del seminoma espermatocítico. El término "carcinoma in situ" es inaceptable, porque no tiene las características de una neoplasia epitelial. (23,26,27,28,50,51)

Pacientes con NICGi desarrollan tumores de células germinales en un 50 % de casos en 5 años y se identifica NICGi en pacientes con alto riesgo de tumores de células germinales (criptorquidia, etc). La asociación de NICGi con las formas de tumores de células germinales en la infancia -*tumor del saco vitelino y teratoma*- no está tan claramente establecida. En pacientes postpuberales se reconoce histológicamente como células germinales, espermatogonias, con núcleos hiper cromáticos y citoplasmas claros, alineadas a lo largo de la porción basal del tubo seminífero. Se identifica el nucleolo y pueden verse mitosis. Las células de Sertoli están, con frecuencia, desplazadas hacia la luz y la espermatogénesis está, casi siempre, ausente aunque puede reconocerse en tubos vecinos. Los tubos afectados suelen tener una pared engrosada. Puede verse extensión pagetoide de la NICGi a la rete testis. En niños la NICGi no tiene tan clara localización basal dentro del tubo seminífero. Son PAS positiva-diestasa-sensible. La fosfatasa alcalina placentaria positivas (PLAP) -más específica que la anterior (no aparece en espermatogonias no neoplásicas). Presenta una tinción más intensa en membranas. Puede detectarse en biopsias testiculares bilaterales en pacientes de alto riesgo. El tratamiento es controvertido: la NICGi unilateral es tratada con

orquiectomía y la bilateral con radiación. En ocasiones se ha observado respuesta a la quimioterapia recibida por una neoplasia de células germinales contralateral.

2. Neoplasias de un solo tipo histológico

Seminoma

Supone el 50 % de todos los tumores de células germinales testiculares. La edad media de presentación es 40 años (5 a 10 años más elevada que en el caso de tumores no seminomatosos). Es raro en niños. En un 80 a 90 % de casos los síntomas iniciales son anomalías en la palpación. Hay una mayor proporción de seminomas entre los pacientes con criptorquidia y TCG que en la población general con los mismos tumores.

La presencia de β HCG sérica elevada se correlaciona con la presencia de células trofoblásticas en el tumor. La elevación sérica de alfafetoproteína (α FP) en un paciente con un seminoma, aparentemente puro, es generalmente indicativo de la presencia de un componente no seminomatoso (o de metástasis hepática, si la elevación es moderada). La fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) también está elevada en un 50% de los pacientes con seminoma.

El examen macroscópico muestra un aumento testicular simétrico, observándose al corte una tumoración beig-marrón-rosada y lobulada o multinodular, de consistencia elástica y que protruye sobre el resto del parénquima sano, con focos puntuales de hemorragia que pueden reflejar la presencia de trofoblasto. La necrosis extensa y la hemorragia son infrecuentes. Si se observan áreas hemorrágicas o quísticas, debe sospecharse un componente no seminomatoso. La extensión a la túnica albugínea o al epidídimo ocurre en menos del 10 % de los casos. (*Imagen 3*)

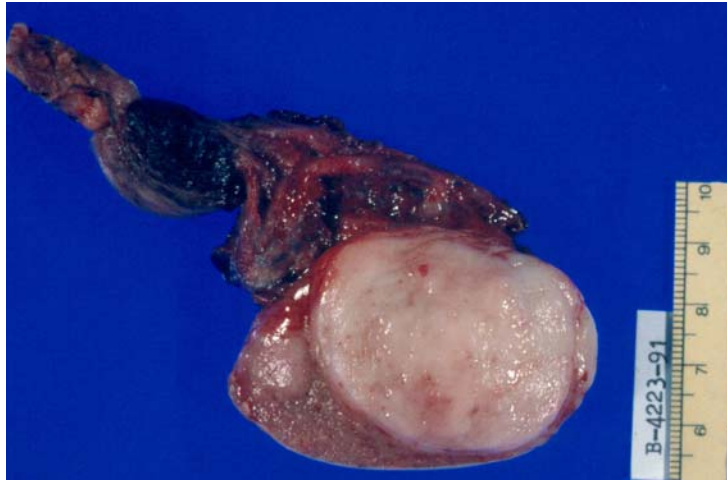


Imagen 3. Seminoma Clásico

Con microscopio óptico se observa un patrón difuso, en sábana, o un patrón confluyente multinodular. Suelen verse túbulos seminíferos preservados en el interior del tumor, las trabéculas fibrosas son frecuentes. Si son muy abundantes dan lugar a un patrón de seudotúbulos sólidos, que debe diferenciarse de un tumor de células de Sertoli. Las células tienen citoplasma claro o ligeramente eosinófilo, núcleo redondo central, con uno o dos grandes nucleolos centrales y bordes citoplasmáticos definidos. Se aprecia infiltrado linfocitario frecuente en y sobre las trabéculas fibrosas. En algunos casos se observan centros germinales.

Los marcadores corresponden a linfocitos T. La reacción granulomatosa observada en más del 50 % de los casos, parece una reacción del huésped al tumor, incluso con células gigantes tipo Langhans (si es extensa, debe diferenciarse de orquitis granulomatosa, siendo útil la tinción con PLAP en algunos casos). Los seminomas con células gigantes trofoblásticas plantean diagnóstico diferencial con la reacción granulomatosa y los seminomas con células pleomórficas. La excesiva fibrosis o la extensión a la rete testis, también pueden dificultar el diagnóstico. *(Imagen 4)*

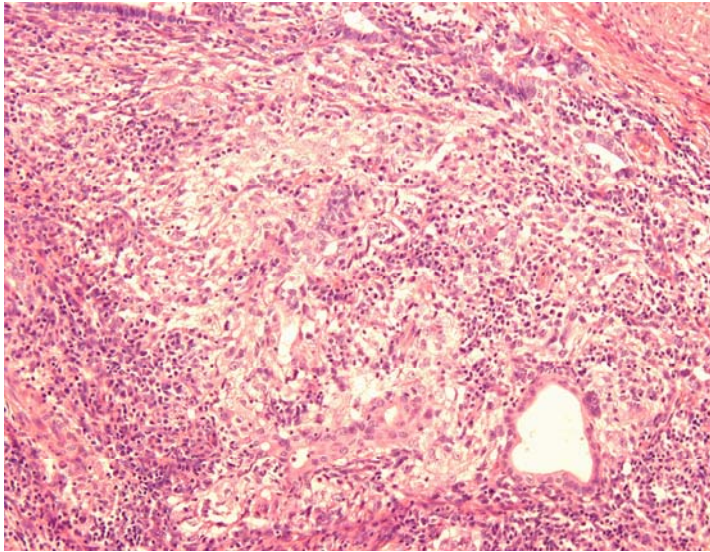


Imagen 4. Seminoma

Puede verse, en otros casos, edema y formación de pequeños espacios quísticos (implica diferenciar del tumor del saco vitelino con patrón microquístico por la apariencia seminomatosa del tumor circundante y la apariencia más irregular de los espacios quísticos en el seminoma edematoso, con fluido edematoso y células seminomatosas exfoliadas).

En 20 % de los seminomas se identifican grandes células trofoblásticas (diferenciar del coriocarcinoma por la pérdida de la proliferación nodular de las células trofoblásticas y la ausencia de citotrofoblasto).

La mayoría de los seminomas presentan PAS positivo por la existencia de glucógeno citoplasmático. La PLAP es positiva en 98% (tinción acentuada en membranas) y se detecta elevación sérica en 40 % de los casos. Las citoqueratinas 8 y 18 (CAM 5.2) son positivas, pero otras como AE1/AE3 han resultado negativas. Se detecta asimismo ferritina y enzima convertidor de la angiotensina 1.

El microscopio electrónico revela el carácter de células primitivas que presenta el tumor y el análisis de ploidia muestra un valor de 1.66 veces la cantidad normal de DNA diploide (más alta que en tumores no seminomatosos). En análisis del cariotipo se identifica isocromosoma 12. (33)

El diagnóstico diferencial, ya parcialmente mencionado, se plantea con el patrón sólido del carcinoma embrionario. Este último tiene bordes citoplasmáticos mal definidos, solapamiento, irregularidad y pleomorfismo nuclear, que no se observan en el seminoma bien fijado. Además, no tiene las trabéculas fibrosas del

seminoma. Las citoqueratinas (CTK AE1/AE3) pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial.

También con el patrón sólido del tumor del saco vitelino en el que habitualmente se observa la presencia de los otros patrones de este tumor en áreas próximas. En el caso del seminoma con edema, ya se ha señalado la diferenciación. Además las CTK AE1/AE3 son habitualmente positivas así como α FP. Los glóbulos hialinos y el material intercelular como membrana basal, son frecuentes en el tumor del saco vitelino, como rasgos específicos y diferenciadores.

Los linfomas, especialmente en casos de afectación bilateral en paciente mayor favorece el diagnóstico de linfoma sobre seminoma. Aparte de las diferencias citológicas, los linfomas no están asociados con NICGi y son negativos para PLAP.

Los tumores de células de Sertoli pueden plantear diagnóstico diferencial con los seminomas de patrón tubular.

Respecto al tratamiento y pronóstico señalar que son neoplasias muy sensibles a la radiación y a la quimioterapia, post-orquiectomía. El factor pronóstico más importante es el estadio del tumor. Se describe peor pronóstico si la β HCG está marcadamente elevada y mejor con la presencia de infiltrado linfóide y de reacción granulomatosa prominente.

La existencia del "seminoma anaplásico" es controvertida: con frecuencia se trata de seminomas mal fijados o carcinomas embrionarios con patrón sólido, aunque también se postula como una neoplasia situada entre el seminoma clásico y el carcinoma embrionario. (40)

Seminoma espermatocítico

1-2% de todos los tumores testiculares (25-40 veces menos frecuente que el seminoma clásico). 4-7 % de todos los seminomas. Con tratamiento distinto al seminoma. Más frecuente en pacientes mayores que el resto de tumores de células germinales, con una media de 50-60 años. (55)

Suele presentarse con un aumento doloroso del testículo de varios años de evolución. No se ha descrito en localización extratesticular (sí el seminoma clásico: germinoma). No está asociado a la criptorquidia ni comparte otras características epidemiológicas y los marcadores serológicos son negativos.

El examen macroscópico muestra lesión multinodular o multilobular, con variaciones morfológicas, desde elástico blanquecino-grisáceo a focos quísticos con cambios mucoides y consistencia gelatinosa. Puede verse hemorragia y necrosis, así como extensión extratesticular.

El examen microscópico corresponde a un patrón difuso con espacios ocupados por edema, sin los septos fibrosos regulares del seminoma clásico, ni tampoco reacción granulomatosa. Sí existe el infiltrado linfoide en posición perivascular. Puede verse ocasionalmente invasión vascular.

Lo más característico es el polimorfismo nuclear con tres poblaciones celulares: células como linfocitos pequeños, células de tamaño intermedio (las más frecuentes, con cromatina semejante a los espermatozoides primarios) y células gigantes. El índice mitótico es alto. No está asociado con NICG, ni se observa combinación con tumores no seminomatosos de células germinales (TNSCG).

La inmunexpresión de PLAP, β HCG y CTK es negativa. Con microscopía electrónica se observan uniones primitivas, Golgi, ribosomas, mitocondrias y capa periférica de membrana basal. El glucógeno citoplasmático está ausente o es escaso (abundante en el seminoma clásico).

El diagnóstico diferencial se plantea principalmente con el seminoma clásico. Las metástasis son excepcionales, a pesar de su apariencia microscópica. El tratamiento de elección es la orquiectomía radical.

El seminoma espermatozoario combinado con sarcoma es propio de hombres mayores pero con historia de crecimiento reciente acelerado. Al corte es más necrótico y hemorrágico, con aspecto arremolinado. Son agresivos en el 50% de los pacientes, con metástasis (componente sarcomatoso) y muerte. (40)

Carcinoma embrionario

Raro como neoplasia "pura": supone el 2 % de los tumores de células germinales, pero alcanza el 87 % como "componente" de neoplasias testiculares no seminomatosas. Está constituido por células epiteliales primitivas con un patrón sólido, papilar o glandular. La edad media de presentación es de 31 años (10 años más jóvenes que los afectados por seminomas). (*Imagen 5*)



Imagen 5. Carcinoma Embrionario + Seminoma

En 66 % de los casos es ya metastásico en el momento del diagnóstico (dolor de espalda, disnea, tos, hemoptisis, hematemesis o síntomas neurológicos) a diferencia del seminoma, que está limitado al testículo en 70% de los casos en el momento del diagnóstico.

Presenta diversos marcadores séricos: α FP elevada, que refleja asociación con tumor del saco vitelino; β HCG elevada, refleja diferenciación trofoblástica (puede asociarse a ginecomastia); LDH elevada, en estadios avanzados. La PLAP está elevada en 96 % (mucho más focal que en el seminoma).

El examen macroscópico corresponde a una tumoración de color gris pálido, pobremente demarcada, asociada a hemorragia y necrosis con extensión extratesticular en 20 % de los casos. (*Imagen 6*)



Imagen 6. Carcinoma Embrionario + Seno Endodermico

El examen microscópico revela nódulos de extensiones difusas de células con amplias zonas eosinófilas de necrosis coagulativa, observándose variedad de patrones (papilar, glandular y sólido). Con frecuencia se observan células entremezcladas de núcleo oscuro, que también pueden verse en otros carcinomas pobremente diferenciados y que deben diferenciarse de los elementos trofoblásticos del coriocarcinoma (β HCG).

Presenta células poligonales con citoplasma anfófilo o levemente basófilo y bordes citoplasmáticos mal definidos, de núcleo grande, irregular con cromatina vesiculosa y nucleolo grande, observándose imágenes de solapamiento nuclear. El índice mitótico es elevado.

Se ha descrito un patrón en doble capa donde los procesos papilares de células del carcinoma embrionario se acompañan de un anillo interno de células más pequeñas, aplanadas α FP-positivas. Se trataría de un tumor mixto de células germinales, con componente de tumor del saco vitelino. (*Imagen 7*)

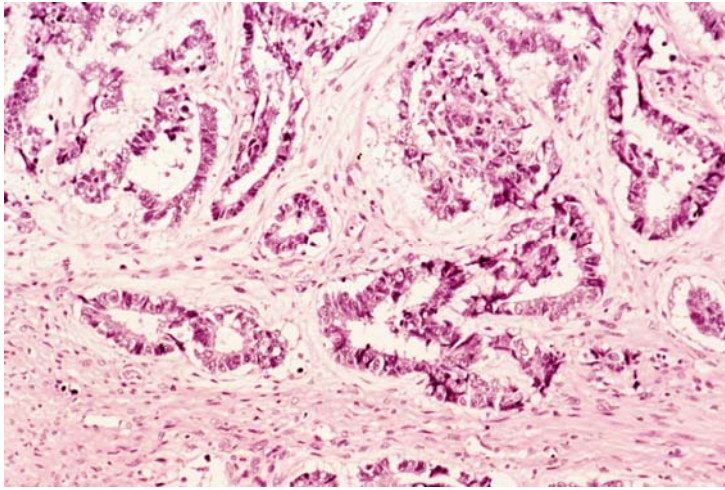


Imagen 7. Carcinoma Embrionario

Es frecuente identificar carcinoma embrionario intratubular en las proximidades de la lesión, que puede calcificarse y, en algunos casos es la única evidencia de la regresión de un carcinoma embrionario previo. Se han descrito casos de asociación con estroma indiferenciado que se consideran carcinomas embrionarios, a no ser que este componente sea el predominante, o bien que presente zonas de diferenciación, en estos casos se denominaría tumor mixto de células germinales -carcinoma embrionario y teratoma inmaduro.

Es importante identificar la presencia de invasión vascular o extensión extratesticular (que debe distinguirse de restos del carcinoma, extendidos al cortar la pieza o de la neoplasia intratubular).

La α FP es positiva en 0-33 % de casos, con PLAP positiva en 86-97 % y CTK positiva en 95-100 % de casos. Aunque en el testículo es fácil la identificación, resulta más compleja en metástasis. En estos casos, la presencia de positividad para PLAP y negatividad para EMA, puede ser muy útil. Hay que tener en cuenta que el carcinoma embrionario puede ser positivo para CD30 (C-kit) y por tanto esta técnica no es útil para diferenciar del linfoma anaplásico de célula grande. Otras tinciones que pueden ser positivas en el carcinoma embrionario son: alfa-1-antitripsina, Leu7, vimentina, LDH, ferritina y lactógeno placentario humano.

La microscopía electrónica corresponde a adenocarcinomas pobremente diferenciados con complejos de uniones estrechas y lámina basal periférico. Las células se parecen a las del preblastocisto, por lo que, junto a la frecuencia de su

combinación con otros tipos celulares, se ha considerado con capacidad para la diferenciación tanto hacia estructuras *embrionarias como extraembrionarias*.

El análisis citogénico muestra un marcador cromosómico i 12p, que, según el número de copias se correlaciona con la agresividad del tumor, así como expresión de varios protooncogenes.

El diagnóstico diferencial se plantea con el seminoma; el patrón sólido del tumor del saco vitelino, por la presencia de otros patrones, menor tamaño de las células y del núcleo y menor pleomorfismo y los glóbulos hialinos de material como membrana basal. A veces focos periféricos de tumor del saco vitelino, con células pequeñas, estrelladas o fusiformes, con patrón reticular mixoide. Los linfomas de célula grande surgen en pacientes de más edad y con enfermedad extratesticular; presentan patrón intersticial y no se reconoce NICGi, mostrando negatividad para PLAP y CTK. En el caso del carcinoma indiferenciado metastásico extragonadal la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica pueden ser útiles. (*Imagen 8*)

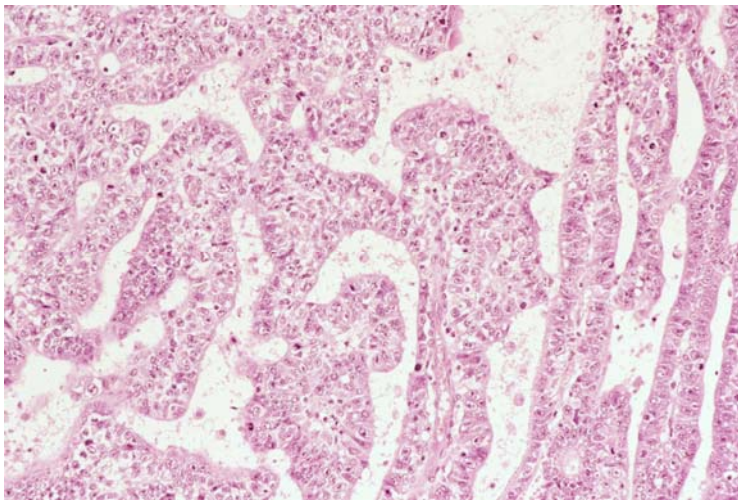


Imagen 8. Carcinoma Embrionario

La forma de tratamiento postorquiectomía, depende del estadio del tumor. Los datos de interés que deben reseñarse en un informe de una pieza de orquiectomía de un tumor en estadio I: invasión vascular y linfática, estadio local avanzado -rete testis o extratesticular-, si se trata de carcinoma embrionario puro, predominante o no, asociado con teratoma, la ausencia de elementos de tumor del saco vitelino y la presencia de coriocarcinoma. (40).

Teratoma

El teratoma maduro constituye el 5-10 % de todas las neoplasias testiculares. Predomina en pacientes prepuberales, como neoplasias puras (14 % de los tumores testiculares de células germinales) entre 20 meses y 4 años. Asociados con anomalías congénitas como Síndrome de Down, de Klinefelter, hernia, hemihipertrofia, xeroderma pigmentoso, espina bífida y uréter retrocavo.

En pacientes adultos los teratomas testiculares son un componente de un tumor mixto de células germinales presentando la sintomatología de los otros componentes. En adultos, un teratoma testicular, aparentemente puro, puede desarrollar metástasis de los elementos de células germinales no teratomatosos. Este hallazgo está en consonancia con la presencia de NICG en teratomas de adultos, no en los niños. Hay que tener en cuenta que un teratoma maduro en un paciente adulto no equivale a un tumor benigno. (*Imagen 9*)

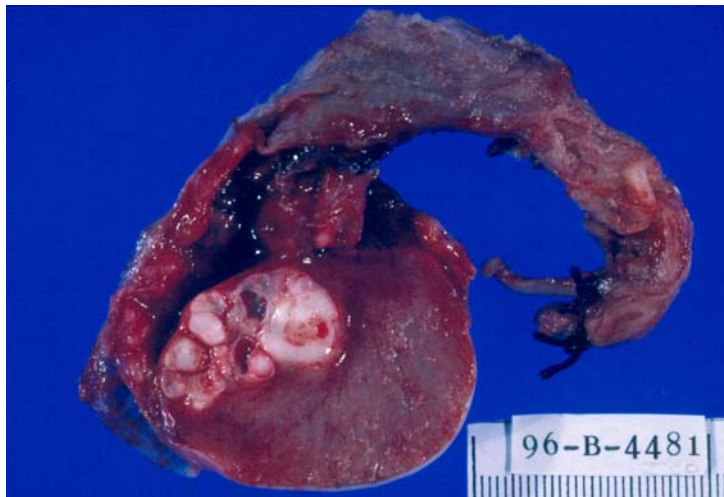


Imagen 9. Teratoma Maduro

Los marcadores serológicos son negativos en el teratoma puro (hay que recordar que en niños muy pequeños la AFP puede estar fisiológicamente elevada).

El examen macroscópico corresponde a lesiones multinodulares y su superficie de corte varía de sólido a multiquistico. La existencia de pelos es rara excepto en el quiste dermoide, que es infrecuente.

El examen microscópico de los teratomas puros revela tejidos semejantes a los tejidos somáticos adultos. Es el caso de teratomas en niños. (*Imagen 10*)

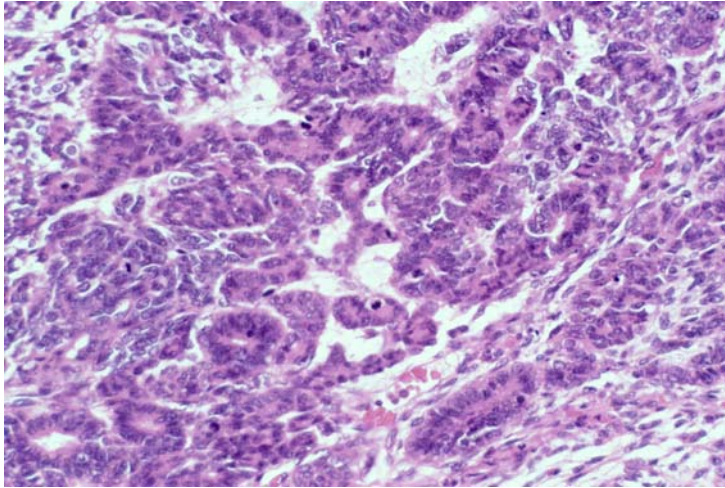


Imagen 10. Areas neurales en Teratoma

En pacientes postpuberales se identifica un componente de atipia que refleja su potencial maligno. Esta atipia no clasifica al teratoma como inmaduro (denominación que se reserva para el caso en que los tejidos reproduzcan estructuras embrionarias o fetales). (*Imagen 10*)

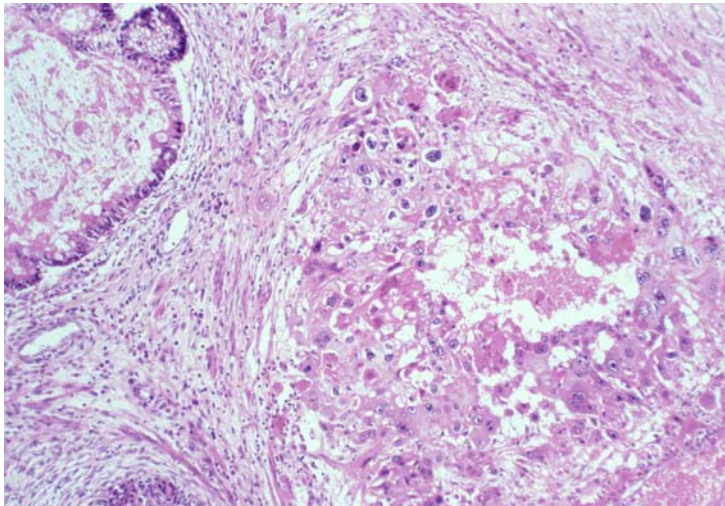


Imagen 11. Coriocarcinoma + Teratoma Inmaduro

Un requisito para el diagnóstico de teratoma maduro es que todos los tejidos sean bien diferenciados (sinónimo: teratoma diferenciado). Sin embargo,

una cierta proporción de estos tumores (particularmente los vistos en adultos) también muestran algún grado de inmadurez tisular, que puede presentarse en el estroma, epitelio o componente neural, que varía desde ligera hiper celularidad del estroma alrededor del componente glandular a grandes focos de glándulas primitivas, neuroepitelio, o incluso tejido semejante al tumor de Wilms.

La WHO/OMS designa a estos teratomas como inmaduros, aunque el pronóstico está por determinar, quizá con una gradación semejante a los teratomas ováricos. Es importante no confundir estas áreas de inmadurez con áreas de carcinoma embrionario. La gradación de la atipia citológica en los tumores maduros se da en bajo y alto grado. Si el teratoma maduro tiene un componente "manifiestamente maligno" se diagnostica como tal (ej.: teratoma maduro con adenocarcinoma, etc). Suele ser epitelial, pero también pueden aparecer sarcomas. (Imagen 12)

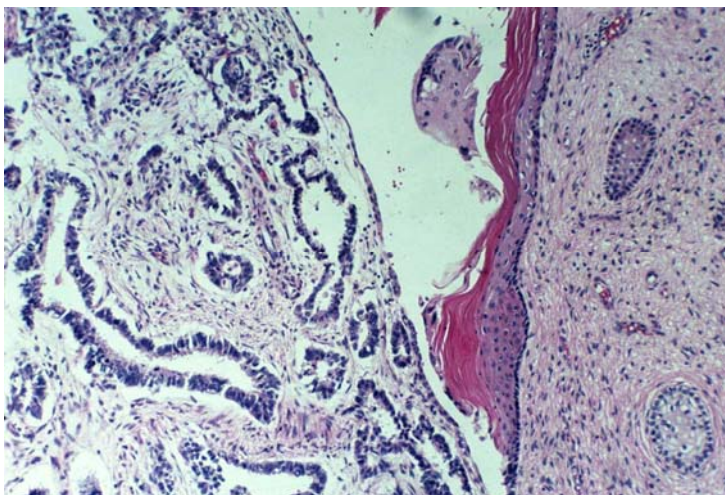


Imagen 12. Teratoma + Adenocarcinoma

Quistes dermoides son una subcategoría del teratoma maduro. Semejantes a los descritos en ovario. Son estructuras quísticas, ocupadas por queratina y pelos con uno o más nódulos protruyentes en su pared. La pared del quiste está revestida por epitelio escamoso queratinizante, con glándulas sebáceas y folículos pilosos. Los nódulos pueden contener cartílago, neuroglía y tejido fibroso. No se han descrito metástasis a diferencia de los otros teratomas maduros.

Los teratomas inmaduros: son neoplasias con tejidos semejantes a los descritos en estructuras fetales o embrionarias, entremezclados con tejidos maduros, como en teratoma maduro. La mayoría de los teratomas que aparecen en edad postpuberal tienen algún grado de inmadurez. Los tejidos más

frecuentemente descritos son neuroepitelio y tejidos de tipo neuroblástico, tejido blastomatoso, semejante al tumor de Wilms, músculo esquelético inmaduro, tejido estromal inmaduro, semejante a músculo liso, alrededor de islotes de epitelio. La inmadurez suele gradarse, basándose en la celularidad y en la actividad mitótica de los elementos inmaduros y dando una estimación de su extensión (ej.: "teratoma con elementos inmaduros focales de alto grado" -presencia de un pequeño foco de neuroepitelio mitóticamente activo o "teratoma con elementos inmaduros de bajo grado moderadamente difusos" -presencia difusa de mesénquima inmaduro, moderadamente celular, alrededor de estructuras glandulares-). Esta gradación tiene un sentido académico pero carece de valor pronóstico. (*Imagen 13*)

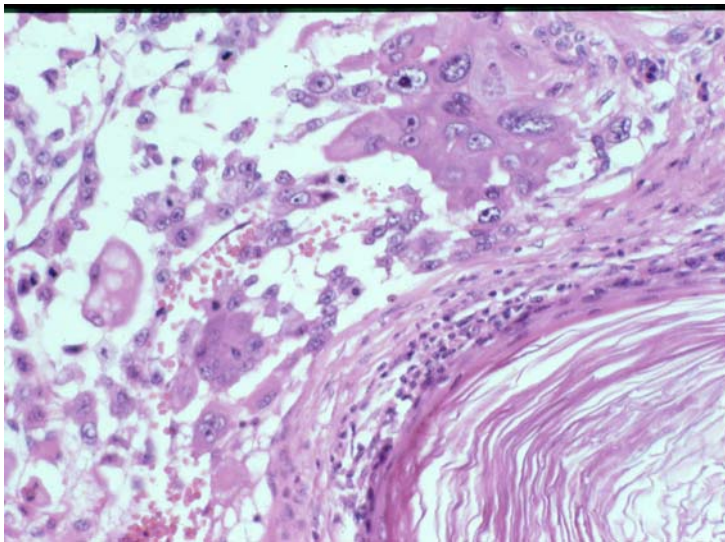


Imagen 13. Detalle de Coriocarcinoma + Teratoma Inmaduro

Teratomas con un componente claramente maligno: teratomas maduros con evidencia de invasión estromal por el componente epitelial maligno o con un nódulo de tamaño considerable y de estroma marcadamente atípico. Este criterio también se aplica a los teratomas inmaduros. (*Imagen 14*)



Imagen 14. Teratoma Maligno

Se considera "nódulo de tamaño considerable" el que ocupa, al menos, la mitad de un campo con objetivo 4x. Existe controversia sobre el valor pronóstico del componente maligno. Los resultados inmunohistoquímicos dependen de los componentes tisulares presentes.

El diagnóstico diferencial de un teratoma maduro en adultos debe hacerse con un quiste epidermoide (quiste intratesticular escamoso, con restos de queratina, sin estructuras anexiales u otros elementos y sin NICGi o bien con un quiste dermoide: ya descrito previamente (pierden el componente sólido y no muestran inmadurez o atipia).

Los teratomas puros prepuberales son lesiones benignas en los que la orquiectomía resulta curativa. Los teratomas puros en adultos son raros. Suelen estar asociados con otros elementos de células germinales, que determinan el pronóstico. Un dato importante es la posibilidad de encontrar elementos no teratomatosos en las metástasis en adultos con teratomas puros.

Tumores carcinoides: considerados como teratomas monodérmicos, Asociado en un 15 % de casos con elementos de teratoma. Con un amplio rango de edad: 20-90 años. La asociación con síndrome carcinoide es rara.

Macrocópicamente se trata de nódulos bien delimitados, amarillos o parduscos. Si se asocia a otros elementos teratomatosos, pueden verse quistes. El examen microscópico muestra islotes de células que forman pequeños acinis, semejante al patrón del tumor semejante descrito en intestino, con núcleos redondeados, cromatina granular y citoplasma eosinófilo. Pueden existir otros

elementos teratomatosos (epitelio glandular y mucinoso, con mayor frecuencia). Las células neoplásicas son positivas para serotonina y enolasa neuronoespecífica. Se plantea un diagnóstico diferencial con un carcinoide metastásico (éste suele ser bilateral, difuso, con invasión vascular/linfática, manifestaciones extratesticulares y sin presencia de otros componentes teratomatosos).

Tumor neuroectodérmico Primitivo (TNP o PNET) en testículo: se considera un teratoma monodérmico compuesto por células pequeñas con patrón difuso, túbulos y rosetas de tipo ependimario. Raro, aunque se describe áreas como PNET en tumores mixtos de células germinales con un componente teratomatoso inmaduro. Se comportan de un modo agresivo".

Tumor del seno endodérmico o del saco vitelino

Al igual que en el teratoma, se describen formas en niños y en adultos. En niños, como neoplasias puras (no asociado a NICGi ni a metástasis) y, en adultos, es frecuente que se presente como tumores mixtos de células germinales. En los niños es más frecuente en edades muy tempranas, con una media de 17-18 meses (rango: hasta 9 años). Es la neoplasia testicular más frecuente en niños, seguida del teratoma. (56). No está asociado con criptorquidia. Aparece con igual frecuencia en blancos y negros.

El síntoma más habitual es un aumento de tamaño testicular detectado por los padres. En los adultos casi aparece como un componente de un tumor mixto de células germinales, como masa testicular, metástasis o ginecomastia. Suele ser el componente que con mayor frecuencia pasa inadvertido en un tumor mixto. En el 94% de los niños, tienen una presentación como estadio I. Presenta elevación de α FP en el 95-100% que debe distinguir de la elevación fisiológica en niños muy pequeños.

El examen macroscópico corresponde a un nódulo no encapsulado, gris, marrón o amarillo, con cambios quísticos y aspecto mixoide y frecuentes áreas hemorrágicas o necróticas. En adultos resulta difícil distinguir macroscópicamente los elementos de tumor del saco vitelino en un tumor mixto.

Histológicamente presenta un gran polimorfismo con numerosos patrones entremezclados, siguiendo una modificación del trabajo de Talerman:

1. *Del seno endodérmico* (perivascular o festoneado): con patrón "glomeruloide" o cuerpos de Schiller-Duval y ejes fibrosos festoneados por células tumorales, que alternan con espacios laberínticos. (*Imagen 15*)

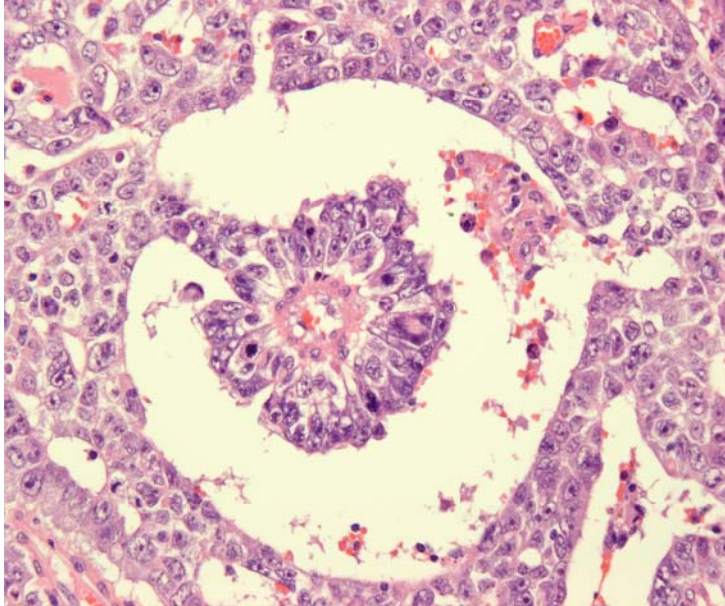


Imagen 15. Cuerpo Glomeruloide

2. *Reticular* (microquístico o en panal): células tumorales anastomosadas, con prominente vacuolización citoplasmática -aspecto en panal- a veces semejante a lipoblastos o células en anillo de sello, o bien patrón cordonal con fondo mixoide.
3. *Papilar*: quistes con proyecciones papilares, con o sin eje fibroso
4. *Sólido*: configuración difusa de células semejantes a seminoma, aunque con tendencia focal microquística.
5. *Glandular-alveolar*: apariencia primitiva, con frecuente aspecto intestinal o vacuolización subnuclear, como en el endometrio. El aspecto ramificado y anastomosado de las glándulas, así como la ausencia de componente estromal circundante, permite diferenciarlo de un teratoma. (*Imagen 16*)

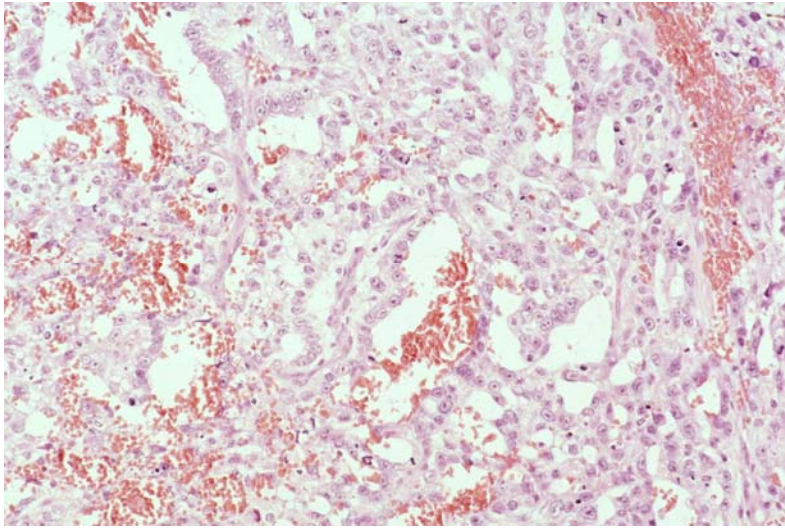


Imagen 16. Seno Endodermico

6. *Mixomatoso*: trabéculas, cordones y células aisladas en un estroma marcadamente mixoide. Células individuales, estrelladas o fusiformes que pueden sufrir diferenciación rabiomioblástica.
7. *Sarcomatoide*: en relación con lo descrito en el patrón mixomatoso.
8. *S. Macroquístico*: quizá por coalescencia de microquistes
9. *Vitelino polivesicular*: infrecuente. Con vesículas de aspecto irregular, delimitadas por un epitelio aplanado en un estroma mixoide.
10. *Hepatoide*: células semejantes a hepatocitos, en un patrón difuso, trabecular o en nidos. Focal en 20 % de los tumores del saco vitelino. Con α FP muy positiva en el tumor y frecuente presencia de glóbulos hialinos. (*Imagen 17 e Imagen 18*)

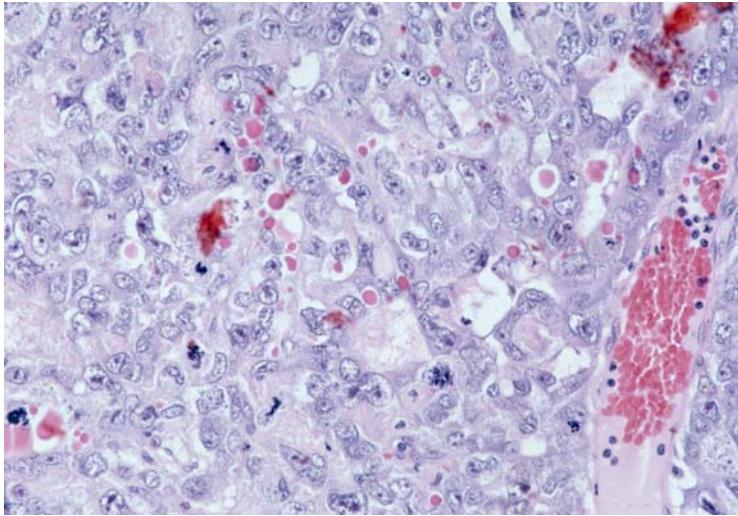


Imagen 17. Globulos Hialinos en Seno Endodermico

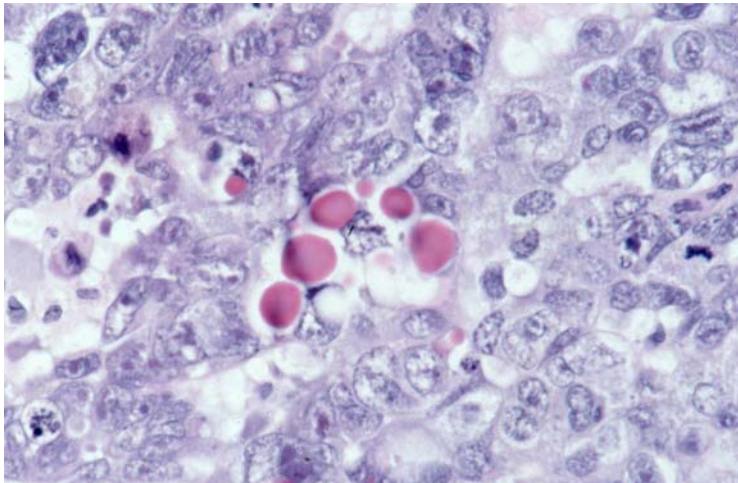


Imagen 18. Detalle Globulos Hialinos

11. *Parietal*: con un predominio de material como membrana basal extracelular -membrana de Reichert. Focal en 92% de casos de tumor del saco vitelino. Suele asociarse con frecuencia a otros patrones. El predominio de este patrón es infrecuente.

El patrón reticular es el más frecuente, seguido del sólido y macroquístico. La presencia de glóbulos hialinos puede facilitar el reconocimiento del tumor. Son PAS + diastasa-resistentes y miden de 1-50 micras o más. Algunos muestran

inmunotinción para alfafetoproteína (α FP). Pueden verse en otras neoplasias pero son infrecuentes en seminoma y carcinoma embrionario (diferenciar también del amplio depósito de material como membrana basal visto en el patrón parietal). (Imagen 19)

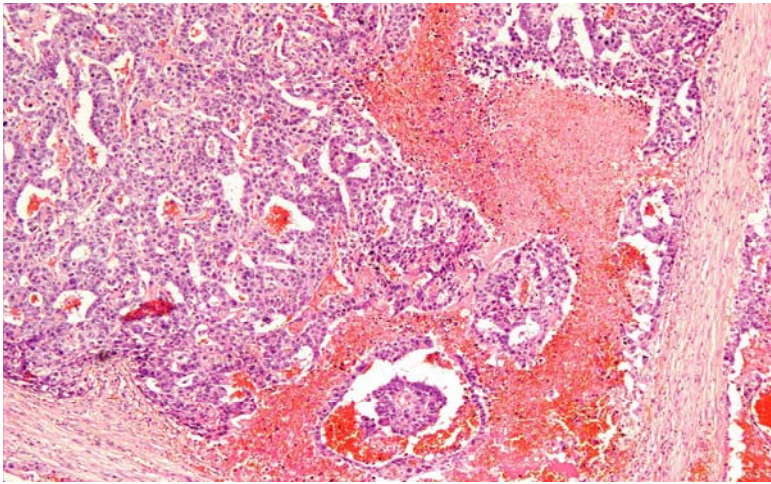


Imagen 19. Seno Endodermico

La AFP es positiva en las células neoplásicas en un 55-100% de casos, con mayor positividad en los focos de patrón hepatoide. En los casos pediátricos puede ser negativa, no sólo en los globos hialinos, también de forma difusa o granular. El antígeno carcinoma-embionario (CEA) es positivo en las glándulas de tipo entérico. La Alfa-I-antitripsina resulta positiva en 50% de casos y las CTK en 100%, de forma difusa. La inmunexpresión para vimentina puede demostrarse en el componente estromal. La fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) es menos positiva que en otros tumores de células germinales. El antígeno epitelial de membrana (EMA) es habitualmente negativo.

La microscopía electrónica identifica células epiteliales con complejos de uniones estrechas y microvellosidades apicales.

El tumor del seno endodérmico debe diferenciarse del seminoma especialmente del patrón sólido, ya descrito previamente. Del carcinoma embrionario por las células con núcleo más grande y pleomórfico de este último. Es raro ver glóbulos hialinos y depósito de material como membrana basal. Del tumor de la granulosa juvenil, sobre todo en el caso de tumores del saco vitelino pediátricos, ya que ambos presentan un patrón sólido-quístico, atipia citológica y alto índice mitótico, aunque el tumor del saco vitelino presenta otros patrones e inmunotinción para AFP.

La invasión de la rete testis por un tumor de células germinales, puede causar una reacción epitelial hiperplásica, con el desarrollo de glóbulos hialinos intracitoplasmáticos.

El tratamiento y pronóstico en adultos es semejante al de otros tumores de células germinales no seminomatosos. La presencia de un componente de tumor del saco vitelino en un tumor primario testicular, se asocia a una más alta incidencia de estadiaje bajo. El tratamiento apropiado en niños es controvertido con tendencia al manejo conservador, postorquiectomía, sin metástasis. 80-90% de los casos se presentan en estadio 1 al diagnóstico. Se describe un 95 % de supervivencia a los cinco años. Las metástasis de tumores de células germinales con componente de tumor del saco vitelino, tienen peor pronóstico que los que no lo tienen (a diferencia del mejor pronóstico de su presencia en el testículo), quizá por la mayor quimiorresistencia de estos elementos.(40)

Coriocarcinoma

Puros son raros, menos del 0.3 % de todos los tumores testiculares, pero se identifica como componente de un 16 % de los tumores mixtos de células germinales. Los pacientes con coriocarcinoma puro están en la segunda o tercera década de la vida (no hay casos prepuberales descritos) y se presentan con frecuencia con síntomas metastásicos (hemoptisis, dolor lumbar, sangrado gastrointestinal y anomalías neurológicas). Con frecuencia se asocian a marcada elevación de β HCG y anomalías endocrinas secundarias (ginecomastia y tirotoxicosis)

El examen macroscópico corresponde a tumores pequeños. El testículo aparece normal o atrófico. Al corte se observa un nódulo hemorrágico con tejido grisáceo en la periferia que microscópicamente muestra proliferación de células trofoblásticas malignas, con dos poblaciones celulares: células de citotrofoblasto, con citoplasma claro y moderado pleomorfismo nuclear y células de sincitiotrofoblasto, células multinucleadas, con lagunas intracitoplasmáticas con eritrocitos. Con frecuencia, presentan cromatina oscura. Ambas poblaciones celulares se disponen de forma semejante a las vellosidades coriales. En casos en que el componente de sincitiotrofoblasto es escaso, se reconoce por su citoplasma denso y su cromatina más oscura.

Debe diferenciarse del carcinoma embrionario con degeneración celular. En el coriocarcinoma suele haber área de hemorragia y necrosis central asociada, con las células neoplásicas únicamente en la periferia. (*Imagen 20*)



Imagen 20. Coriocarcinoma + Carcinoma Embrionario

El índice mitótico es alto en los elementos de citotrofoblasto, pero no se observan mitosis en los elementos de sincitiotrofoblasto. Existen casos raros de coriocarcinoma atípico: en los que no se distingue la separación de los dos elementos del trofoblasto. Es más frecuente en metástasis. Se ha postulado la denominación de "neoplasia trofoblástica", término más amplio que coriocarcinoma.

Por la naturaleza necrótica y hemorrágica, la identificación de las células del coriocarcinoma, puede requerir numerosos cortes tisulares. Suelen ser focos periféricos y también se identifica la presencia de NICG en los túbulos seminíferos adyacentes. Presenta marcada tendencia a la angioinvasión. La β HCG es muy positiva en las células de sincitiotrofoblasto (el citotrofoblasto es casi siempre negativo).

La Glicoproteína beta-1 específica del embarazo lactógeno humano placentario también son positivas en sincitiotrofoblasto y trofoblasto intermedio y negativas en citotrofoblasto. PLAP es positiva en 50%, CEA en 25 %, CTK 7, 8, 18 y 19 positivas en diversos porcentajes y EMA positiva en 46 %.

El coriocarcinoma debe diferenciarse de la necrosis hemorrágica testicular por torsión, trauma o anomalías en la coagulación, con aumento doloroso del testículo y área difusa de hemorragia (el coriocarcinoma es indoloro y pequeño, con hemorragia nodular, NICG y β HCG). Así como de otros tipos de tumores de células germinales, que se distinguen por la aislada presencia de células trofoblásticas, la pérdida del componente de citotrofoblasto y la ausencia de necrosis hemorrágica.

La diferenciación del carcinoma embrionario con degeneración celular se apoya en la positividad para β HCG y la tendencia a citoplasmas claros y bordes citoplasmáticos definidos que favorece un diagnóstico de citotrofoblasto frente a las células del carcinoma embrionario.

Los datos más destacados del pronóstico y tratamiento son la capacidad de diseminación rápida por vía hematogena con afectación cerebral muy frecuente. Se trata de forma semejante a los otros tumores no seminomatosos. Un componente claro de coriocarcinoma en un tumor mixto empeora claramente el pronóstico. Tiene peor evolución con niveles más altos de β HCG. (40)

Se denomina "*Síndrome de coriocarcinoma*" a la presencia de pacientes con metástasis viscerales hemorrágicas que tienen una alta mortalidad, a pesar de la terapia agresiva, aunque se han descrito coriocarcinomas metastásicos curados. El coriocarcinoma como componente de un tumor mixto tiene mejor pronóstico.

3. Tumores de más de un tipo histológico.

Tumores mixtos de células germinales

Entre 69 y 91% de los tumores de células germinales no seminomatosos son de tipo mixto. Se denominan como tumores de tipo mixto con todos sus componentes y proporciones en porcentajes. El aspecto macroscópico es característicamente variado con focos de hemorragia y necrosis. La histología es idéntica a las distintas neoplasias en sus formas puras.

Suele existir tendencia a no identificar el componente de tumor del saco vitelino, que, característicamente se asocia con un componente de carcinoma embrionario. El patrón en "doble-capa" del carcinoma embrionario es un ejemplo de tumores de células germinales mixtos, carcinoma embrionario y tumor del saco vitelino. La asociación de carcinoma embrionario y teratoma tiene mejor pronóstico que el carcinoma embrionario puro. El componente de tumor del saco vitelino también conlleva un mejor pronóstico.(40) (*Imagen 21*)

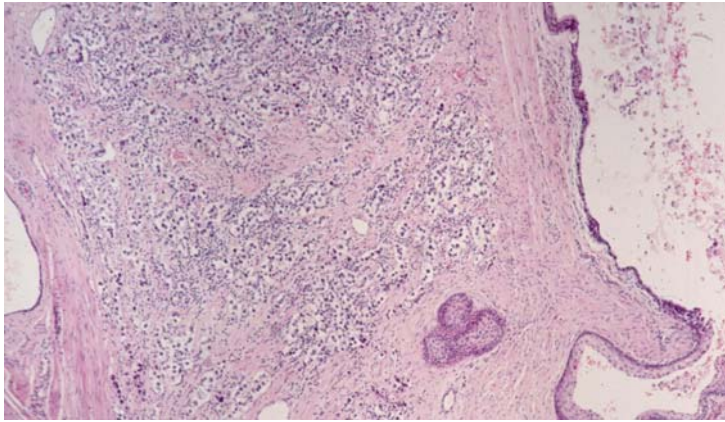


Imagen 21. Teratoma con Seminoma

Poliembrioma y embrioma difuso

Ambos son formas especializadas de tumores mixtos de células germinales. El *poliembrioma* consiste en pequeños y aislados cuerpos embrionarios, con un centro de células de carcinoma embrionario semejante a la placa embrionaria, asociado a una cavidad semejante a la cavidad amniótica, y con un componente de tumor del saco vitelino semejante al saco vitelino embrionario. Puede verse sincitiotrofoblasto, y diferenciación hepática, intestinal y escamosa. Por tanto, se considera que estos tumores tienen diferenciación de carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino y, a veces, elementos de teratoma y de sincitiotrofoblasto. Se comportan como un tumor germinal no seminomatoso.

En el *embrioma difuso* hay una mezcla de elementos del carcinoma embrionario y del tumor del saco vitelino.

4. Regresión de tumores de células germinales

Diagnosticados por la presencia de metástasis, en 10% de casos se demuestra en el testículo únicamente la existencia de cicatrices fibrosas con NICG y "cuerpos hematoxilínicos" intratubulares (restos nucleares y calcificación) o elementos teratomatosos. Es más frecuente en pacientes con coriocarcinoma metastásico.

II. Tumores del estroma de los cordones sexuales

Suponen alrededor del 4% de los tumores testiculares. Con cuatro categorías de neoplasias: de *células de Leydig*, de *células de Sertoli*, de *células de la granulosa* y tumor del *estroma de los cordones sexuales -o tipo mixto o de origen indeterminado*. (56,57,58)

Tumores de células de Leydig

Es el tumor más frecuente entre los del estroma de los cordones sexuales, 2-3 % de todas las neoplasias testiculares. En la mayoría de los casos aparece entre los 30-60 años pero el rango es más amplio, entre 2-90 años (con otro pico en niños de 5-10 años).

La presentación depende de la edad del paciente. Así, en niños (20 % de los casos) da lugar a pseudopubertad precoz (por andrógenos). Son neoplasias pequeñas y no palpables cuya detección requiere métodos especializados. Produce ginecomastia en 10 % de los casos. En adultos se presenta como masa testicular y ginecomastia en 30 % de los casos. Es bilateral en 3% (59).

El examen macroscópico corresponde a nódulos sólidos, bien circunscritos, redondos, amarillos, marrones o grisáceos, con un tamaño entre 2-5 cm (rango: 0.5-10 cm). Las áreas de hemorragia y necrosis se observan sólo de forma minoritaria. Se evidencia extensión extratesticular en 10-15 %. El examen microscópico muestra más frecuentemente un patrón difuso, aunque también pueden verse nidos y cordones rodeados por estroma fibroso. Las células son poligonales, y, habitualmente, tienen citoplasma eosinófilo, a veces, finamente vacuolado lípidos. Con núcleos redondos, con nucleolo intermedio central y moderada variación en el diámetro. Las mitosis son infrecuentes. Pueden verse cristales de Reinke en forma de bastón, intracitoplasmáticos en el 40 % de los casos. A veces existe un predominio de células fusiformes. Son vimentina y S-100 positivas. También puede demostrarse la producción de hormonas androgénicas. Se han descrito casos con osificación y con metaplasia adiposa. Con microscopía electrónica se observa la típica célula productora de esteroides.

El diagnóstico diferencial debe hacerse con la hiperplasia de células de Leydig (como se ve en el Síndrome de Klinefelter) y otros desórdenes: pero producen un patrón de crecimiento que no destruye los tubos circundantes. También con el tumor calcificante de células de Sertoli grandes que es multifocal, con alta incidencia de bilateralidad, estroma más abundante, calcificaciones, crecimiento intratubular y ausencia de cristales de Reinke. La malacoplakia tiene focos como células de Leydig intratubulares y los cuerpos característicos de Michaelis-Gutman. Los nódulos del síndrome adrenogenital o del síndrome de

Nelson son multifocales y bilaterales, pierden los cristales de Reinke y contienen lipofucsina más prominente. Los linfomas y plasmocitomas: tienen un patrón intersticial y son frecuentemente bilaterales. Se confirman con la inmunohistoquímica. Las metástasis de un carcinoma prostático se diferencian con CTK, PSA y fosfatasa ácida prostática para confirmar.

Un 10% de los tumores de células de Leydig tienen un comportamiento maligno. Más probable en los de mayor tamaño, con márgenes infiltrativos, necrosis, atipia nuclear y un índice mitótico de más de 10 por 10 campos de gran aumento y con invasión vascular (se recomienda resección de linfáticos retroperitoneales) (60). También es más frecuente en pacientes mayores. Aquellos con ginecomastia tienen mejor pronóstico. No se ha descrito comportamiento maligno en pacientes prepuberales. Ni la radioterapia ni la quimioterapia suelen ser eficaces.

Pueden desarrollarse recurrencias después de varios años. La media de supervivencia es de 4 años.

Tumores de células de Sertoli

Representan el 1% de los tumores testiculares. Se presentan en cualquier edad, pero más frecuentes en hombres de mediana edad. Si se asocian con el síndrome de Peutz-Jeghers, se trata de chicos jóvenes y se acompañan de ginecomastia. La presentación habitual es una masa testicular, aunque, a veces producen manifestaciones estrogénicas como ginecomastia e impotencia. La existencia de ginecomastia en un niño, con ausencia de virilización, puede ser un signo de tumor de células de Sertoli y contrasta con los tumores de células de Leydig, donde la ginecomastia no ocurre en ausencia de virilización. (61)

El examen macroscópico corresponde a neoplasias sólidas, firmes, bien circunscritas, amarillas, grises o blancas, generalmente menores de 3 cm.

Histológicamente constituyen tubos sólidos, aunque también pueden verse tubos con luces, nidos y cordones. En algunos casos presentan vacuolización citoplasmática, con aspecto microquístico. El citoplasma es claro con alto contenido lipídico y los núcleos son ovales con un nucleolo de tamaño intermedio. La presencia de células de la granulosa o elementos del estroma de los cordones sexuales de tipo indeterminado, coloca a esta neoplasia dentro de la categoría de los tumores mixtos del estroma de los cordones sexuales o incompletamente diferenciados dentro de ese grupo. Se detecta inmunexpresión para CTK, vimentina, alfa-1-antitripsina y enolasa neuronoespecífica.

La microscopía electrónica corresponde a células interconectadas por desmosomas con abundante REL y vacuolas lipídicas. Pueden identificarse filamentos citoplasmáticos de Charcott-Bottcher (patognomónicos de diferenciación de células de Sertoli), aunque son más abundantes en el tumor calcificante de células de Sertoli grandes. En torno a un 10% manifiesta un comportamiento maligno con neoplasias grandes, con actividad mitótica, pleomorfismo, pobre circunscripción e invasión linfática y vascular, aunque no es posible predecir con exactitud. A diferencia de los tumores de Leydig en niños, en los tumores de Sertoli infantiles, sí puede darse un comportamiento maligno.

El diagnóstico diferencial se cuestiona con seminomas con patrón tubular, que son raros y presentan glucógeno citoplasmático, mientras que las células de Sertoli contienen lípidos. Puede verse NICGi en seminomas y no en tumores de células de Sertoli. Pueden ser útiles la PLAP y la microscopía electrónica. También con los nódulos hiperplásicos de células de Sertoli comunes en testículos criptorquídicos y menos frecuentes en no criptorquídicos, son pequeños nódulos, a veces microscópicos, constituidos por tubos de pequeño tamaño delimitados por células de Sertoli con ocasionales espermatogonias, por tanto distinto al tumor de células de Sertoli y con presencia frecuente de material hialino de membrana basal, en las zonas centrales de los túbulos.

Los nódulos hamartomatosos son múltiples en testículos extirpados de pacientes con síndromes de insensibilidad a los andrógenos. Los adenomas de células de Sertoli, proliferación de células de Sertoli en pequeños tubos, entremezclados con células de Leydig. Se ven en un 25 % de casos de síndrome de insensibilidad a andrógenos.

Tumor esclerosante de células de Sertoli: Es una variante del tumor de células de Sertoli, asociado a esclerosis prominente del estroma. Con una media de edad de 18 años (rango de 18-80). Se trata de masas testiculares indoloras y cursan con síntomas endocrinos.

El examen macroscópico corresponde a neoplasias menores de 1,5 cm, bien circunscritas, firmes, blancas, marrones o amarillas que, con microscopía óptica muestran túbulos sólidos o no, acompañados de cordones de células en un estroma fibroso hipocelular. Las células tienen citoplasma claro y vacuolas lipídicas. Los núcleos varían de pequeños e hiper cromáticos a grandes y vesiculosos. El 10 % presentan atipia significativa y actividad mitótica. Sólo son positivas para vimentina. El diagnóstico diferencial se plantea con el tumor carcinoide, el tumor adenomatoide centrado en estructuras paratesticulares y las metástasis de un carcinoma prostático que no forman túbulos y son PSA y fosfatasa alcalina prostática (FAP) positivos.

Tumor calcificante de células de Sertoli grandes: Asociado con el Síndrome de Carney (mixomas de la piel, de los tejidos blandos y del corazón, así como lesiones mixoides en la mama), léntigos en cara y labios, nevus cutáneos azules, síndrome de Cushing secundario a hiperplasia adrenal, adenomas somatotrofos hipofisarios y schwannomas melanocíticos psamomatosos. También puede verse en el Síndrome de Peutz-Jeghers. Se presenta generalmente en pacientes jóvenes con una media de 16 años. La mayoría de los pacientes debutan con una masa testicular, 40 % con síntomas del Síndrome de Carney, otros con pseudoprecocidad isosexual y ginecomastia.

En el examen macroscópico suelen ser tumores pequeños de menos de 4 cm, con frecuencia bilaterales y multifocales, amarillos o marrones, con un corte típico de tejido con calcificaciones. Histológicamente constituyen nódulos, nidos y cordones de células poligonales grandes, con abundante citoplasma eosinofílico, en un estroma fibroso mixoide. El crecimiento intratubular del tumor es frecuente y muestra calcificación en 50% de casos, dentro de focos intratubulares o extratubulares de tumor. El núcleo es oval y pueden tener nucleolo prominente. Las figuras de mitosis son raras excepto en casos malignos. La microscopía electrónica se corresponde con tumores de células de Sertoli, planteando diagnóstico diferencial con tumores de células de Leydig.

Tumores de células de la granulosa

De tipo adulto: Semejantes a los descritos en ovario. Son muy raros en el testículo. Con un rango de edad de 21-73 años. Asociados con ginecomastia. Macroscópicamente amarillos o grisáceos, con un patrón sólido, parcialmente quístico. Semejantes a los del ovario muestran cuerpos de Call-Exner, núcleo pálido y frecuentes hendiduras.

Las células son positivas para vimentina y CTK 8 y 18, negativas para EMA, detectándose receptores de hormonas esteroideas. El comportamiento maligno es raro (metástasis en 10 % de los casos).

De tipo juvenil: También semejantes a los descritos en el ovario. Suelen presentarse en niños muy pequeños, menores de 5 meses y pueden ser congénitos. Se describe asociación con mosaicismo X/XY.

Se detectan como masa testicular, con mezcla variable de áreas sólidas grises o amarillas con quistes ocupados por fluido viscoso. Corresponden a estructuras como folículos, redondeadas, con líquido de aspecto acuoso, fluido, con frecuencia positivo para mucicarmín. Las áreas sólidas están constituidas por nódulos y sábanas de células con frecuente hialinización estromal. Las células presentan abundante citoplasma eosinófilo claro y núcleo hiper cromático, redondeado, con nucleolo. Las mitosis pueden ser muy numerosas, pero el

comportamiento es sorprendentemente benigno, planteando diagnóstico diferencial con el tumor del saco vitelino.

Túmore del estroma de los cordones sexuales, mixtos e inclasificados

Como mezcla o bien con formas no específicas de diferenciación. Con amplio rango de edad. Se presentan en forma de masas testiculares y en un 15% de casos asocian ginecomastia. Aproximadamente en un 50% de casos ocurren en niños. Pueden ser desde pequeños nódulos a grandes masas, lobulados, grises o amarillos, con una mezcla variable de células epiteliales y diferenciación estromal. Puede existir pleomorfismo y figuras mitóticas prominentes, con diferenciación sarcomatoide. En los mejor diferenciados pueden verse túbulos con células semejantes a las de Sertoli. Algunas neoplasias con patrón estromal, pueden derivar de células peritubulares miofibroblásticas.

Es benigno en niños menores de diez años, con pronóstico reservado en adultos (maligno en 20 % de casos). El tratamiento de elección es la orquiectomía con resección de ganglios retroperitoneales en casos con sospecha de malignidad (tamaño grande, patrón de crecimiento invasivo, invasión vascular o linfática, atipia nuclear, alto índice mitótico y necrosis).

III. Tumores mixtos de células germinales y del estroma de los cordones sexuales

Gonadoblastoma

Mezcla de células germinales como las del seminoma y células de los cordones sexuales (células de Sertoli). Casi siempre ocurren en pacientes con gónadas disgenéticas y un síndrome intersexual, 80% fenotipo femenino y 20% fenotipo masculino. Bilateral en 1/3 de casos. Los pacientes fenotípicamente varones, presentan síntomas de feminización en la adolescencia.

Macroscópicamente son marrones o amarillos con zonas de calcificación al corte.

Microscópicamente, el patrón más común son nidos redondeados, bien definidos de células como seminoma, entremezclados con células de los cordones sexuales, redondas o anguladas, que pueden constituir una empalizada periférica. También pueden distribuirse en forma de cordones, con ambos tipos de células. Dentro de los nidos pueden observarse agregados eosinófilos de material como membrana basal, que pueden dar lugar a calcificaciones. Fuera de estos nidos

pueden verse, en 2/3 de los casos, agregados de células de Leydig, que han perdido los cristales de Reinke.

El gonadoblastoma debe considerarse como una forma "in situ" del tumor de células germinales. En 50 % de los casos se desarrolla un tumor invasivo de células germinales, habitualmente un seminoma. En 8% de casos, es un tumor de mayor malignidad -tumor del saco vitelino o carcinoma embrionario, etc. Está indicada la gonadectomía bilateral. El pronóstico es bueno si no existe componente invasivo.

Otros tumores mixtos de células Germinales y estroma de los cordones sexuales

Son raros. Más frecuentes en adultos entre 30 y 69 años. Debutan como masa testicular de larga evolución. No se han identificado disgenesia gonadal ni síndromes intersexuales.

Macroscópicamente son grisáceos-blanquecinos, sólidos o parcialmente quísticos. Macroscópicamente se observa una sábana de células constituida por una mezcla de elementos grandes, como seminoma, y células oscuras, como de cordones sexuales. Las áreas de proliferación de estas últimas, pueden recordar tumores de células de la granulosa de tipo adulto o tumores de células de Sertoli, y se han identificado cristales de Charcot Bottcher en un caso.

Se debe diferenciar del gonadoblastoma: por la ausencia de cambios degenerativos y del patrón en nidos y la diferente situación clínica. No se ha descrito el desarrollo de tumor invasivo ni de metástasis. La orquiectomía es el tratamiento apropiado.

IV. Tumores de la rete testis

Adenocarcinoma

Se piensa que la mayoría representan tumores de diferenciación mulleriana, frecuentemente con la morfología de los cistoadenomas serosos de bajo potencial maligno. Pero existen adenocarcinomas de la rete testis con una combinación de patrones sólidos, tubulares o papilares, con clara invasión estromal. Con un rango de edad entre 31-91 años y sólo descritos en pacientes blancos. La mayoría se presentan con dolor e hinchazón testicular, síntomas de epididimitis o de hidrocele.

Macroscópicamente blancos, pero, a veces, amarillos, marrones o grises, centrados en el hilio testicular.

Microscópicamente puede identificarse la transición entre el epitelio neoplásico y no neoplásico de la rete testis. Son frecuentes las hendiduras en el seno de los nidos sólidos del tumor. Puede observarse un patrón tubular semejante al tumor de células de Sertoli y transición de patrones epiteliales a morfología fusiforme.

Es frecuente la extensión a otras estructuras y las metástasis linfáticas al retroperitoneo. Se ha descrito afectación de la piel perineal y escrotal. El pronóstico es malo.

La diferenciación de los tumores de tipo mulleriano se basa en el patrón quístico predominante de estos, la localización hiliar y la transición con el epitelio normal, en el caso de los adenocarcinomas de la rete testis. La diferenciación del mesotelioma maligno puede requerir inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

V. Miscelánea

Incluyendo tumores no clasificados y tumores de tipo celular incierto.

VI. Tumores paratesticulares

Mesotelioma

Se han descrito benignos y malignos (atipia, mitosis e invasión). Los malignos presentan una media de 56 años (amplio rango), asociado a la exposición a asbesto. La clínica es semejante al hidrocele. Puede observarse invasión de estructuras vecinas. Microscópicamente muestran un patrón papilar epitelial, con una sola capa de mesotelio sobre un eje fibrovascular. Se identifican cuerpos de psammoma. Pueden observarse atipias e invasión de estructuras vecinas. A veces se reconoce un patrón bifásico con células fusiformes. Son útiles las mismas técnicas de diagnóstico empleadas en otras localizaciones. El tratamiento de elección es la orquiectomía radical. (62)

Tumores de epitelio de tipo ovárico

Como resultado de metaplasia mulleriana del mesotelio. También intratesticular por inclusiones mesoteliales embrionarias. Se han descrito tumores

de Brenner benignos y un tumor de Brenner maligno, así como la combinación de tumor de Brenner y tumor adenomatoide. También tumores serosos papilares paratesticulares o intratesticulares. Si son paratesticulares se presentan con hidrocele. Macroscópicamente se reconocen lesiones únicas o multifocales, exofíticas y papilares. Microscópicamente la apariencia es de un tumor papilar seroso de baja malignidad, aunque puede observarse franca invasión en un cistoadenocarcinoma. También pueden verse cistoadenomas serosos y cistoadenofibromas papilares.

La orquiectomía radical es el tratamiento de estos tumores. Los de bajo potencial maligno tienen buen pronóstico, pero los pacientes con cistoadenocarcinoma desarrollan metastásis. Se describe un caso raro de cistoadenoma mucinoso paratesticular.

Otros tumores

Leiomiomas, hemangiomas, histiocitomas fibrosos malignos, neurofibromas y quistes dermoides de las tunicas testiculares. Tumores adenomatoides, independientes del epidídimo. Consisten en una proliferación de células, desde cuboideas a aplanadas que forman cordones sólidos, con aspecto epitelial, alternando con luces dilatadas de aspecto cuboideo o plano, semejante éste último, al endotelio vascular. El estroma circundante suele ser prominente, a veces hialinizado, con abundantes fibras de músculo liso y fibras elásticas. Puede verse reacción desmoplásica e infiltrado inflamatorio. Las células tumorales presentan llamativa vacuolización citoplásmica, sin mucina.(63)

Tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas (descrito en abdomen de hombres jóvenes)

VII. Tumores hematopoyéticos

Linfoma

Puede ser primario pero con mayor frecuencia representa enfermedad extratesticular diseminada. La media de edad es de 60 años. Representan sólo el 5% de los tumores testiculares pero alcanzan el 50% en hombres mayores de 60 años. La afectación bilateral es común, simultánea, en 20% de los pacientes (64,65). Se acompaña de afectación sistémica con fiebre y pérdida de peso.

Macroscópicamente es una neoplasia blanca, marrón o rosada, semejante al seminoma, pero presenta extensión extratesticular con mayor frecuencia. (Imagen 22)



Imagen 22. Linfoma Testicular

Microscópicamente destaca el patrón intersticial, con presencia de túbulos seminíferos preservados en cantidad mucho mayor que en los tumores de células germinales. Los linfocitos presentan distinta citología según el tipo de linfoma. Es frecuente la migración a los tubos seminíferos. No se asocia con NICGi (a diferencia de los tumores de células germinales). Pueden usarse el antígeno común leucocitario (LCA) y PLAP en el diagnóstico diferencial.

La mayoría son linfomas de célula grande, de fenotipo B y apariencia inmunoblástica. Predominan las formas difusas, con alta incidencia de invasión vascular. El linfoma de Burkitt es el linfoma más común con afectación testicular en la infancia. La enfermedad de Hodgkin es infrecuente en el testículo.

Se debe diferenciar de una orquitis crónica, por la naturaleza parcheada y la heterogeneidad del infiltrado (el pseudolinfoma testicular es un exuberante ejemplo con hiperplasia linfoide reactiva). Distinguir también de seminomas anaplásicos y espermatocíticos. El estadio constituye el factor pronóstico más importante.

Plasmocitoma

Raros en testículo. Suelen ser una manifestación más de un mieloma múltiple en el paciente. Ocurre en 2% de los casos, y suele ser un hallazgo de autopsia. En los raros casos en que se diagnostica únicamente en el testículo, debe descartarse afectación sistémica.

Macroscópicamente son blandos y elásticos, con frecuencia con focos de hemorragia.

Microscópicamente son semejantes a los plasmocitomas en otros lugares.

La demostración de monoclonalidad, con restricción de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, confirma el diagnóstico.

Infiltración leucémica

40-60% en leucemia aguda y 20-35% en pacientes con leucemia crónica. Mayor tendencia en niños con leucemia linfoblástica. El diagnóstico habitual se realiza por biopsia, pero, en raros casos puede detectarse masa o induración testicular.

Microscópicamente muestran un patrón intersticial de tipo monomórfico, con la morfología propia del tipo de leucemia. El diagnóstico diferencial debe realizarse con orquitis, linfoma y seminoma de patrón intersticial.

VIII. Tumores metastásicos o secundarios

De próstata (35%), pulmón (19%), melanoma maligno (9%), carcinomas de colon (9%) y de riñón (7%).

En el caso de la próstata, también es más fácil reconocer las metástasis por el examen de las orquiectomías terapéuticas. La edad media es de 57 años (mayores que en los tumores de células germinales). La elevación de marcadores serológicos es menos probable en las metástasis.

Macroscópicamente, lo más frecuente es el patrón multinodular, pero pueden verse otros. La afectación bilateral favorece el proceso metastásico.

Microscópicamente presentan un patrón intersticial, con extensa invasión vascular y linfática, con ausencia de IGCNU y marcadores de inmunohistoquímica en casos complejos.

IX. Lesiones neoplásicas y no neoplásicas testiculares y paratesticulares

De interés en el diagnóstico diferencial de las neoplasias principalmente malignas de la zona. Se destacan sólo algunas de las citadas en clasificación modificada de WHO:

Hidrocele

Se origina por fallo en la obliteración completa de los procesos vaginales. El fluido se acumula entre las capas parietal y visceral o bien por producción desde la cavidad peritoneal. El diagnóstico se realiza por transiluminación. Están constituidos por tejido conectivo laxo con revestimiento mesotelial.

Fusión espleno-gonadal

Se presenta como una masa testicular izquierda en la que tejido esplénico accesorio está adherido al testículo, epidídimo o cordón espermático. También puede localizarse dentro de la túnica albugínea. Si es de tipo continuo (se asocia con defectos en los miembros y micrognatia) constituye una masa de tejido fibroso que conecta con el bazo, o discontinuo, cuando dicha conexión no existe.

Periorquitis meconial

Se produce durante la vida fetal. En algunos pacientes asociada a fibrosis quística. Se trata de una masa testicular en infancia temprana, amarillo-verdosa. Microscópicamente formada por combinación de macrófagos pigmentados, estroma mixoide, escamas y lanugo. Puede verse calcificación e hiperplasia mesotelial.

Proliferación fibrosa nodular y difusa

Entre las tunicas testiculares, y menos frecuentemente, afectando epidídimo y cordón espermático. Con una media de presentación de 30 años (7-95). En algunos casos con historia previa de trauma o infección. La mayoría se presentan

como masa escrotal, con un engrosamiento difuso, multinodular del tejido peritesticular, o un discreto nódulo de tejido blanquecino, que puede alcanzar hasta 15 cm. Pueden existir un hidrocele o espermatocele asociado. Microscópicamente se observa una mezcla de tejido fibroso, fibroblastos, células inflamatorias y calcificación distrófica. Las lesiones tempranas son más celulares y más colagenizadas que las tardías. Pueden dar lugar a lesiones con rasgos de miofibroblastoma. Debe diferenciarse del mesotelioma fibroso, con ayuda de técnicas de inmunohistoquímica y de microscopía electrónica. La excisión es curativa.

Quistes epidermoides

Frecuentes en el testículo. De etiopatogenia desconocida: desplazamiento del epitelio escrotal, metaplasia de inclusiones mesoteliales y teratomas monodérmicos (en este último caso, difieren de las otras formas de teratoma maduro, por su curso benigno y la no asociación con IGCNU). Más frecuentes entre 20-40 años, como masa testicular palpable de aproximadamente 2 cm de diámetro y con las características habituales de estas lesiones en otras localizaciones. Son lesiones benignas pero deben distinguirse del teratoma (presencia de otros elementos teratomatosos y de IGCNU) y de los quistes dermoides (presencia de estructuras anexiales asociadas al revestimiento escamoso).

Tumores mesenquimales

Derivados de células estromales del intersticio testicular como las células mioideas peritubulares, las células de músculo liso de origen vascular o de células mesenquimales primitivas capaces de diversas formas de diferenciación. Descritos, aunque raros, leiomiomas testiculares, neurofibromas, hemangiomas, y hemangioendoteliomas. Entre los sarcomas: osteosarcomas, fibrosarcomas, leiomiosarcoma, y, más comúnmente, rhabdomyosarcoma. Posiblemente alguno de estos casos, especialmente en jóvenes, represente el crecimiento de un componente sarcomatoso de un teratoma.(66)

Displasia quística de la rete testis

En niños, como masa testicular. Histológicamente como dilatación quística de la rete y de los tubos rectos con compresión y atrofia de los tubos seminíferos. Parece ser una anomalía del desarrollo y está asociada con agenesia renal ipsilateral y displasia renal.

Hiperplasia adenomatosa de la rete testis

Se observa en pacientes con un media de 59 años, como masas testiculares hiliares con apariencia sólido-quística. Con microscopio óptico corresponden a proliferaciones túbulo-papilares de células columnares o cuboideas, que se proyectan en canales dilatados de la rete testis.

Proliferación nodular de tejido conectivo calcificante

Consiste en proyecciones de tejido fibroso en el interior de la rete.

Transformación quística adquirida de la rete testis

Se produce por obstrucción de vías espermáticas y aparece asociada a fallo renal.

Otras lesiones no neoplásicas en este área

Se pueden citar:

- ***Quistes mesoteliales***
- ***Hematocelos***
- ***Endometriosis.***

IV. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

Se ha realizado un estudio observacional transversal con recogida de todos los tumores testiculares diagnosticados en los Servicios de Urología y Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Murcia (actualmente Hospital General Universitario “Reina Sofía”) durante 15 años desde 1988 hasta el año 2003 así como los recogidos en 8 años en el Hospital General Universitario “Morales Meseguer” de Murcia desde 1995 a 2003 (apertura del mismo).

Se han recogido 18 tumores en el periodo comprendido en el Hospital General Universitario “Morales Meseguer”, que corresponde al 35,2% de la muestra y 35 tumores proceden del Area del Hospital General Universitario, actual “Reina Sofía” que constituyen el 64,8%.

Se recuperaron de los Servicios de Documentación de los dos hospitales las Historias Clínicas de los pacientes portadores de dichos tumores. En todas las historias clinicas de los pacientes buscamos una serie de datos realizando una ficha individualizada en la que se recogían diferentes variables (*Anexo 1. Tabla de recogida de datos*):

- Edad
- Lado
- Localización dentro de la gónada
- Estadío clínico
- Estadío patológico

Se recogieron los bloques de los tumores testiculares y se seleccionaron los más representativos y se practican doce cortes por bloque. Realizamos el estudio anatomopatológico exhaustivo de las muestras obtenidas que describimos más adelante. Aplicamos diferentes tinciones y técnicas inmunohistoquímicas que se describe detalladamente en Método tanto en el TCG que fueron 51, como en el Tejido Peritumoral (TP), no afecto macroscópicamente. Disponíamos de material suficiente para el mismo en 49 de los 51 especímenes, lo que constituye un 96,1%.

Todo el Estudio anatomopatológico tanto macro, micro como la interpretación de los marcadores inmunohistoquímicos ha sido realizados por ***un solo Patólogo*** lo que permite excluir variabilidad observador dependiente y desaparece cualquier sesgo en la misma.

Para la Clasificación de los Tumores de Células Germinales seguimos la Clasificación TNM. Clasificación AMJC (175). El AMJC (American Joint Committee on Cancer) ha designado los estadios mediante clasificación TNM

Definiciones TNM

Tumor Primario (T)

El grado del tumor primario se clasifica después de una orquiectomía radical, y por esta razón se asigna un estadio patológico.

pTX: No puede evaluarse el tumor primario*

pT0: No hay constancia de tumor primario (por ejemplo, cicatriz histológica en el testículo) .

pTis: Neoplasia celular Intratubular

pT1: Tumor limitado al testículo y epidídimo sin invasión linfático/vascular; el tumor podría invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginalis .

pT2: Tumor limitado al testículo y epidídimo con invasión linfático/vascular o tumor extendiéndose a través de la túnica albugínea involucrando la túnica vaginalis .

pT3: Tumor invade el cordón espermático con invasión linfático/vascular o sin esta.

pT4: Tumor invade el escroto con invasión linfático/vascular o sin esta

** (Nota: La extensión del tumor primario se clasifica por medio de la orquiectomía radical excepto para pTis y pT4. El TX se podría emplear para otras categorías en la ausencia de una orquiectomía radica)*

Ganglios linfáticos regionales (N)

NX: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales .

N0: No hay metástasis regional de ganglios linfáticos.

N1: Metástasis con un solo ganglio linfático, ≤ 2 cm en su dimensión mayor; o ganglios linfáticos múltiples de ≤ 2 en su mayor dimensión.

N2: Metástasis en un solo ganglio linfático, protuberancia > 2 cm pero ≤ 5 cm en su dimensión mayor; o ganglios linfáticos múltiples, ≤ 5 cm en su dimensión mayor.

N3: Metástasis con una protuberancia de un ganglio linfático > 5 cm en la dimensión mayor .

Metástasis a distancia (M)

MX: No puede evaluarse la presencia de metástasis a distancia .

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia .

M1a: Metástasis pulmonar nodal o no regional.

M1b: Metástasis distante además de los ganglios linfáticos no regionales y los pulmones .

Marcadores tumorales séricos (S)

SX: Estudios sobre marcadores no realizados o disponibles.

S0: Los grados de estudio de los marcadores, dentro de los límites de normalidad .

S1: Lactatodeshidrogenasa (LDH) $< 1,5 \times N^*$ y
Gonadotropina coriónica humana (hCG) (mIU/mL) < 5000 y
Alfa fetoproteína (AFP) (ng/mL) $< 1,000$

S2: LDH $1,5-10 \times N^*$ o
hCG (mIU/mL) $5000-50,000$ o
AFP (ng/mL) $1,000-10,000$

S3: LDH $> 10 \times N^*$ o
hCG (mIU/mL) $> 50,000$ o
AFP (ng/mL) $> 10,000$

* (Nota: N indica el límite óptimo de lo normal para la prueba del LDH)

Agrupación por estadios del AJCC

Estadio 0

pTis, N0, M0, S0

Estadio I

pT1-4, N0, M0, SX

Estadio IA

pT1, N0, M0, S0

Estadio IB

pT2, N0, M0, S0

pT3, N0, M0, S0

pT4, N0, M0, S0

Estadio IS

Cualquiera pT/Tx, N0, M0, S1-3

Estadio II

Cualquiera pT/Tx, N1-3, M0, SX

Estadio IIA

Cualquiera pT/Tx, N1, M0, S0

Cualquiera pT/Tx, N1, M0, S1

Estadio IIB

Cualquiera pT/Tx, N2, M0, S0

Cualquiera pT/Tx, N2, M0, S1

Estadio IIC

Cualquiera pT/Tx, N3, M0, S0

Cualquiera pT/Tx, N3, M0, S1

Estadio III

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1, SX

Estadio IIIA

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1a, S0

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1a, S1

Estadio IIIB

Cualquiera pT/Tx, N1-3, M0, S2

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1a, S2

Estadio IIIC

Cualquiera pT/Tx, N1-3, M0, S3

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1a, S3

Cualquiera pT/Tx, cualquiera N, M1b, cualquiera S

Además de las definiciones de estadios clínicos, se puede designar el estadio quirúrgico sobre la base de los resultados de la extirpación quirúrgica y el examen microscópico del tejido.

Estadio I

El cáncer testicular en estadio I está limitado al testículo. La invasión de la pared escrotal por el tumor o la interrupción de la pared escrotal por cirugía previa no cambian el estadio pero sí aumenta el riesgo de propagación a los ganglios linfáticos inguinales, y esto deberá considerarse en el tratamiento y seguimiento. La invasión de la túnica albugínea del epidídimo o el cordón espermático no cambia el estadio pero sí aumenta el riesgo de compromiso ganglionar retroperitoneal y el riesgo de recurrencia. Este estadio corresponde al estadio I y estadio II del sistema de clasificación AJCC.

Estadio II

El cáncer testicular en estadio II incluye el testículo y los ganglios linfáticos retroperitoneales o paraaórticos generalmente en la región del riñón. El compromiso retroperitoneal debe ser caracterizado aún más por el número de ganglios complicados y el tamaño de los ganglios complicados. El riesgo de recurrencia aumenta si hay >5 ganglios complicados, si el tamaño de uno o más ganglios complicados es >2 cm o si hay complicación extraganglionar adiposa. La enfermedad voluminosa en estadio II describe a pacientes con ganglios retroperitoneales extensos (>5 cm) que requieren quimioterapia primaria y que tienen un pronóstico menos favorable. Este estadio corresponde al estadio III y estadio IV del sistema de clasificación de AJCC (no hay metástasis distante).

Estadio III

El estadio III implica propagación más allá de los ganglios retroperitoneales basándose en el examen físico, radiografías o análisis de sangre.

El estadio III se subdivide en estadio III no voluminosa versus estadio III voluminosa. En estadio III no voluminosa, las metástasis están limitadas a los ganglios linfáticos y el pulmón sin una masa >2 cm en diámetro. El estadio III voluminosa incluye complicación ganglionar retroperitoneal extensa, más ganglios pulmonares o propagación a otros órganos como el hígado o el cerebro. Este estadio corresponde al estadio IV del sistema de clasificación AJCC (metástasis distante).

2. METODO

Estudio histopatológico

Realizamos el estudio anatomopatológico exhaustivo de las muestras obtenidas consistente en:

Estudio macroscópico

Tanto en superficie externa como al corte valorando:

- Delimitación: márgenes
 - expansivo (bien delimitado)
 - infiltrativo (mal delimitado).
- Cápsula
- Coloración
- Necrosis
- Hemorragia
- Infiltración: albugínea, epidídimo, cordón testicular
- Presencia de parénquima testicular respetado

Estudio microscópico

Una vez incluidas las muestras en parafina según método habitual, realizamos cortes a 4 μ , que fueron teñidas con las técnicas de tinción de Hematoxilina-Eosina y PAS.

Fueron evaluados:

- Tipo histológico y su composición
- Márgenes:
 - expansivo (bien delimitado)
 - infiltrativo (mal delimitado)
- Hemorragia
- Infiltración
- Tipo de crecimiento:
 - sólido
 - cordonal
 - túbulo/glandular
 - nodular o difuso,
 - quístico

- Necrosis
- Apoptosis,
- Cuerpos embrioides
- Cuerpos de Schiller-Duval
- Fibrosis
- Infiltración inflamatoria:
 - Crónica: linfocitos, células plasmáticas, macrófagos
 - aguda: PMN-N
- Calcificaciones
- Citoplasma:
 - vacuolado,
 - granular,
 - globulos hialinos
- Nucleo:
 - multinucleado,
 - pleomórfico,
 - nucléolo
- Grado
- Mitosis
 - <2 x10 cga,
 - 3-5 x 10 cga,
 - 6-10 x 10 cga,
 - >10 x 10 cga
- PAS
- Parénquima testicular adyacente:
 - Atrofia
 - Only Sertoli
 - NICG
 - PAS

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. ESTUDIO INMUNO-HISTOQUIMICO

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre material previamente fijado con formol y procesado de manera rutinaria e incluido en bloques de parafina. Se utilizaron secciones de 3-4 micras.

Fundamento de las técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas son aquellas que nos permiten detectar in situ componentes moleculares propios de unas células o estirpes celulares, como

son enzimas, proteínas del citoesqueleto, antígenos tumorales y otros componentes celulares que nos ayudan a un mejor conocimiento biológico y al diagnóstico diferencial de diferentes “procesos” patológicos. Estas técnicas se basan en una reacción antígeno-anticuerpo. (176)

Los Anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los *policlonales* son producidos por distintas células, por lo que son inmunohistoquímicamente distintos. Reaccionan con varios epitopos del antígeno. Los *monoclonales* son producidos por clones de células plasmáticas. Los Anticuerpos de un clon son inmunohistoquímicamente idénticos y reaccionan con un epítipo específico del antígeno. Los anticuerpos monoclonales tienen numerosas ventajas sobre los policlonales porque tienen una alta homogeneidad, son más específicos, de fácil caracterización y escasa variabilidad de unos lotes a otros.

Método de la avidina-biotina

Las primeras técnicas de inmunohistoquímica que se usaron se basaban en la detección de inmunoglobulinas y complemento mediante inmunofluorescencia. Se marcaba un anticuerpo y luego se demostraba que este se había unido al antígeno visualizando el tejido con un microscopio de inmunofluorescencia. En la actualidad este método ha sido desplazado por otros que nos permiten visualizar los tejidos a microscopía óptica. Uno de los métodos más usados es el de avidina-biotina (177).

La Avidina es una proteína que se encuentra en la clara de huevo y tiene una gran afinidad por la biotina que es una vitamina de bajo peso molecular. La avidina actúa como unión entre el anticuerpo secundario y la peroxidasa marcada con biotina

Técnica inmunohistoquímica

Se realizan secciones de 3-4 micras de grosor con microtomo convencional. A continuación se dejan secar las preparaciones sobre una placa caliente para facilitar la adhesión del tejido a la laminilla y evitar su despegamiento con los procedimientos posteriores. A continuación se procedió a desparafinar las muestras mediante pases progresivos de 10 minutos por xiloles y alcoholes.

Después se realizó un pretratamiento con microondas incluyendo las muestras en un volumen de 250 cc de buffer citrato (pH6), a 750 w en tres ciclos de 10,5 y 5 minutos respectivamente y descansando 1 minuto entre cada ciclo, para evitar el despegamiento de las muestras por efecto del calor. Este pretratamiento, se denomina *desenmascaramiento antigénico* y pretende desenmascarar los

antígenos, que están inactivados por el proceso de la fijación, para que puedan reaccionar con los anticuerpos primarios. Hay numerosos estudios que destacan la importancia de este paso para la obtención de una buena calidad de las técnicas inmunohistoquímicas (178, 179, 180).

A continuación dejamos enfriar las preparaciones a temperatura ambiente en la solución de buffer durante 20 minutos. Cuando se han enfriado las muestras realizamos un lavado de las mismas con agua destilada y, las incluimos en metanol peróxido de hidrógenos al 1% durante 20 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena.

Posteriormente lavamos las laminillas con PBS y procedemos a la incubación con suero de caballo durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para mantener estas condiciones de humedad, ponemos en el fondo de las placas de Petrik PBS, y así evitamos la desecación de las preparaciones. A continuación, sin la var las preparaciones, cubrimos los tejidos con el Anticuerpo primario a dilución de 1/50, 1/40 y los dejamos 30 minutos a 37°C, o toda la noche a temperatura ambiente.

A continuación tras volver a lavar las preparaciones con PBS en tres pases de cinco minutos, se cubrieron con el anticuerpo secundario a una dilución de 1/200 (DAKO mouse inmunoglobulins y DAKO rabbitt inmunoglobulins) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se vuelven a lavar con PBS y se incuban durante 45 minutos con el complejo avidina-biotinas (ab complex, HRP DAKO, avidin biotinylated horseradish peroxidase) que hemos preparado previamente 30 minutos de antelación. Lavamos de nuevo con PBS.

El último paso es el revelado con cromógenos (Díaminobenzidine chromogen kit tablets. Biomeda corp. USA)

Luego lavamos las preparaciones, las contrastamos con un pase rápido por Hematoxilina de Mayer, las rehidratamos con pases sucesivos por alcoholes y xiloles y las montamos con Eukitt.

Valoración de los resultados inmunohistoquímicos

Una vez asegurado que la técnica ha sido correcta, que se realiza con controles para estos anticuerpos se cuantifican cada una de las técnicas con los siguientes criterios:

La medición de la tinción se realizó de una manera semicuantitativa usando una escala de 1 + a 3+ que correspondería:

- + de 0 a 9% de las células muestran positividad.
- ++ de 10 a 50 de las células muestran positividad.
- +++ más del 50% de las células son positivas. (181).

Los Anticuerpos primarios utilizados fueron:

1. β HCG: Polyclonal Rabbit Anti-Human Chorionic Gonadotropin
(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Está indicado para uso para su uso en inmunocitoquímica. El anticuerpo marca a las células que contienen gonadotropina coriónica humana (HCG, por sus siglas en inglés) (67) y puede utilizarse para demostrar la presencia de elementos trofoblásticos, por ejemplo en los tumores de células germinales (68). La HCG es una glicoproteína de 40 kDa compuesta de dos subunidades: α y β . La subunidad α es común a la HCG, LH, hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona estimulante del tiroides (TSH), mientras que la subunidad β es exclusiva de la HCG, aunque su secuencia de aminoácidos es parcialmente idéntica a la de la subunidad β de la LH (69,70). La HCG es el marcador más importante de las células trofoblásticas gestacionales, estando presente en las células sincitiotrofoblásticas y células del trofoblasto intermedio, y ausente en los citotrofoblastos. Asimismo, se ha demostrado que la HCG se expresa en algunos tumores no trofoblásticos, por ejemplo, en el 14% de los pacientes aquejados de carcinoma hepatocelular (70) y TCG.

Inmunógeno La cadena beta aislada de la HCG.

Especificidad El anticuerpo reacciona con la HCG, y a semejanza de la mayoría de los demás anticuerpos policlonales frente a la beta-HCG, muestra también una ligera reactividad cruzada (en torno al 4%) con la LH (69). Se han eliminado las trazas de los anticuerpos contaminantes contra el plasma humano mediante absorción en fase sólida.

INMUNOCITOQUÍMICA

Preparación de las muestras

Secciones de parafina: el anticuerpo puede utilizarse para marcar secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol. Es necesario pretratar los tejidos mediante recuperación de epítipo inducida por calor. Se obtienen

resultados óptimos con DakoCytomation Target Retrieval Solution número de catálogo S 1700, o con tampón Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 9,0. Se obtienen resultados menos óptimos con DakoCytomation Target Retrieval Solution número de catálogo S 3308 a pH alto, con tampón citrato 10 mmol/L, pH 6,0, y pretratando los tejidos con proteinasa K. No hay que permitir que las secciones de tejido se sequen durante el tratamiento ni durante el procedimiento de tinción inmunocitoquímica siguiente.

Procedimiento de tinción

Dilución: Polyclonal Rabbit Anti-Human Chorionic Gonadotropin (hCG), número de catálogo A 0231, puede utilizarse en un intervalo de diluciones de 1:300 a 1:600 cuando se aplica a secciones de placenta humana incluidas en parafina fijadas en formol, utilizando 20 minutos de recuperación de epítipo inducida por calor en DakoCytomation Target Retrieval Solution número de catálogo S 1700, y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario.

Las condiciones óptimas (71,72) pueden variar en función de la muestra y del método de preparación, y deben ser determinadas por cada laboratorio individual. El control negativo recomendado es DakoCytomation Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed), número de catálogo X 0936, diluida a la misma concentración de proteína que el anticuerpo primario. A menos que se haya establecido la estabilidad del sistema de ensayos utilizado, se recomienda la dilución del producto justo antes de utilizarlo, o que se diluya en DakoCytomation Antibody Diluent, número de catálogo S 0809.

Visualización: se recomienda el kit DAKO LSAB™+/HRP número de catálogo K 0679, y los kits DAKO EnVision™+/HRP números de catálogo K 4008 y K 4010.

Automatización: el anticuerpo es adecuado para la tinción inmunocitoquímica mediante plataformas automatizadas tales como DakoCytomation Autostainer.

Características de tinción

Las células marcadas con el anticuerpo muestran un patrón de tinción del citoplasma (67). *Tejidos normales:* en la placenta del primer trimestre de gestación, el anticuerpo marca a muchos gránulos citoplásmicos sincitiotrofoblásticos, algunos de ellos en exocitosis (67).

2. α FP: Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha-1-Fetoprotein
(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Está prevista para determinar la alfa-1-fetoproteína humana en la inmunocitoquímica (73,74,75), en ELISA (76) y en las técnicas de inmunoprecipitación en gel.

Los resultados positivos pueden contribuir a la identificación de enfermedades hepáticas neoplásicas y no neoplásicas, *tumores del saco vitelino* y *tumores en células germinales mixtas*. Sin embargo, es importante no utilizar el anticuerpo solo, sino junto con un panel de anticuerpos.

La AFP es una glicoproteína de 70 kDa que contiene 590 aminoácidos. Las células del saco vitelino embrionario, el hígado fetal y el tracto intestinal fetal sintetizan esta glicoproteína (77,78). La AFP es un marcador muy útil para la detección de numerosos defectos de desarrollo y diversas patologías, cancerosas o no (79). Se ha demostrado la expresión de AFP en aproximadamente un 44% de los carcinomas hepatocelulares, así como en tumores de células germinales gonadales y extragonadales, incluidos tumores del saco vitelino. La AFP no se ha detectado en tejido adulto normal utilizando inmunotinción (77). No obstante, se han encontrado trazas de AFP en sueros adultos normales y en mayores concentraciones en sueros maternos y fetales, así como en fluido amniótico (80).

Inmunógeno Alfa-1-fetoproteína aislada del suero medular humano.

Especificidad El anticuerpo reacciona con alfa-1-fetoproteína humana. Se han eliminado las trazas de cualquier anticuerpo contaminante mediante absorción en fase sólida con proteínas de plasma humano.

INMUNOCITOQUÍMICA

Preparación de las muestras

Secciones de parafina: el anticuerpo puede utilizarse para marcar secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol. No es necesario pretratar los tejidos con proteinasa K ni someterlos a recuperación de epítipo inducida por calor. No hay que permitir que las secciones de tejido se sequen durante el tratamiento ni durante el procedimiento de tinción inmunocitoquímica siguiente.

Procedimiento de tinción

Dilución: Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha-1-Fetoprotein, número de catálogo A 0008, puede utilizarse en un intervalo de diluciones de 1:400 a 1:800 cuando se aplica a cortes de hígado fetal humano incluidos en parafina y fijados con formol, utilizando 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Las condiciones óptimas pueden variar en función de la muestra y del método de preparación, y deben ser determinadas por cada laboratorio individual.

Visualización: se recomienda el kit DAKO LSAB™+/HRP número de catálogo K 0679, y los kits DAKO EnVision™+/HRP números de catálogo K 4008 y K 4010. Se sigue el procedimiento incluido en el kit de visualización seleccionado.

Características de tinción

Las células marcadas con el anticuerpo muestran un patrón de tinción en el citoplasma (73). *Tejidos normales:* en un embrión humano de 20 días, el anticuerpo marca las células endodérmicas de la superficie interior del saco vitelino. La AFP amniótica también queda marcada (81,82)

3. C-Kit: Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, C-kit

(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Sinónimo: KIT, receptor del factor de células madre, receptor del factor de crecimiento de los mastocitos; receptor del factor de Steel, p145(*c-kit*)

Antígeno: Péptido que corresponde a los aminoácidos 963 a 976 en la parte terminal C citoplasmática del *c-kit* (83,87)

El anticuerpo policlonal de conejo contra el CD117 humano, C-kit, está indicado para su uso en inmunocitoquímica. El anticuerpo marca al receptor de la tirosinquinasa transmembranal CD117/*c-kit*, localizado en las células madre hematopoyéticas, melanocitos, mastocitos, células de Cajal, células germinales, células basales de la piel y el epitelio de los conductos mamarios.(83,87) El anticuerpo puede ser una herramienta útil para la identificación de varios cánceres que expresan el *c-kit*, entre los que se incluyen a las enfermedades de los mastocitos, leucemia mieloide aguda (LMA), el carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP) y el sarcoma de Ewing, y puede ayudar a diferenciar entre los tumores del estroma gastrointestinal (TEGI) y otros tumores mesenquimatosos intraabdominales.(83,86) Los resultados de un panel de anticuerpos ayudan a la identificación diferencial.

El protooncogen *c-kit*, localizado en el cromosoma humano 4,(88) codifica un receptor transmembranal, CD117/*c-kit*, que pertenece a la familia de receptores clase III de la tirosinquinasa, entre los que se incluyen al receptor del factor 1 estimulante de las colonias y a los receptores tipo A y tipo B del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La región extracelular de estos receptores consiste en cinco dominios tipo inmunoglobulinas en los que se piensa que el segundo y tercer rulo están involucrados en la unión al ligando. El dominio intracitoplasmático de la tirosinquinasa está dividido por una inserción hidrofílica larga entre la región que se une al ATP y el sitio activo de la fosfotransferasa. La activación del receptor está acompañada por una dimerización del receptor, fosforilación y autofosforilación del sustrato, internalización del receptor, activación de proteinquinasas y fosfolipasas y transcripción de diferentes protooncogenes (87). Por lo general, se ha demostrado que la vía del receptor *c-kit* de la tirosinquinasa es importante para el crecimiento tumoral y la progresión de varios cánceres (86) y mutaciones en el gen *c-kit* que conduce a la fosforilación independiente del ligando (activación) del gen *c-kit* de la tirosinquinasa, y se cree que tiene un papel patogenético central en, por ej., los tumores del estroma gastrointestinal. (89)

Especificidad: En los estudios de Western blotting de un extracto de la línea celular SY de carcinoma pulmonar de células pequeñas que sobreexpresan el mRNA del c-kit, el anticuerpo marca una banda de 145 kD que corresponde a la proteína c-kit. La banda marcada es bastante ancha, de 120 a 155 kD. También se marca una banda adicional de 100 Kd (83). En otro estudio que aplicó un anticuerpo diferente al c-kit, se marcó, en forma similar, una banda de proteínas de 100 kD. Este marcado se abolió cuando el anticuerpo se incubó con el antígeno sintético del péptido de c-kit para inmunización. (88) En los estudios de Western blotting, el anticuerpo no reaccionó con un extracto de línea celular HS de adenocarcinoma, es decir, no expresó el gen *c-kit*.(83)

Reactivo provisto

Anticuerpo de conejo aislado por afinidad purificado mediante cromatografía por afinidad con tior AvidGel Factivado, unido al antígeno y provisto en forma líquida en Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN₃ 0,015mol/L, pH 7,2 y seroalbúmina bovina 1%.

Preparación de las muestras

Secciones en parafina:

El anticuerpo puede utilizarse para marcar secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol. Se recomienda pretratar los tejidos mediante recuperación de epítipo inducida por calor. Se encontró que las siguientes soluciones son eficaces para la recuperación del epítipo inducida por calor: Target Retrieval Solution (N° de código S1700) y tampón Tris 0,01 mol/L, EDTA 0,001 mol/L, pH 9,0. tampón citrato 0,01 mol/L, pH 6,0 redujeron la intensidad de la tinción.

Procedimiento de tinción

Dilución: El anticuerpo policlonal de conejo contra el CD117 humano (N° de código A4502), puede utilizarse en un intervalo de diluciones de 1:400 a 1:600 cuando se aplica a secciones de tumores del estroma gastrointestinal incluidas en parafina fijadas en formol, utilizando 20 minutos de recuperación de epítipo inducida por calor en Target Retrieval Solution (N° de código S 1700), y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario.

Visualización:

Se recomienda el uso del kit LSAB®+ HRP (N° de código K0679) y el kit EnVision®+ HRP (números de catálogo K4008 y K4010).

Automatización:

El anticuerpo es adecuado para la tinción inmunocitoquímica mediante plataformas automatizadas tales como Dako Autostainer.

Interpretación de la tinción

El patrón de tinción celular del anticuerpo contra el CD117, c-kit, es membranal y/o citoplasmático.

Características de la tinción

Tejidos Normales:

El anticuerpo marca el epitelio de las mamas, las células basales de la piel (que aparentan ser melanocitos), los espermatozoides, los ovocitos, las mastocitos titulares (83) las células tipo fibroblastos que tapizan los huesos (90) y las células intestinales de Cajal.

Tejidos Anormales:

El anticuerpo marcó 50 de 56 seminomas/disgerminomas, 45 de 123 carcinomas pulmonares de células pequeñas, 3 de 7 teratomas inmaduros, 2 de 11 adenocarcinomas papilares serosos ováricos, 2 de 14 melanomas malignos cutáneos, 2 de 18 neuroblastomas, 7 de 86 carcinomas pulmonares de células escamosas, 1 de 18 carcinomas de células basales, 9 de 227 carcinomas cervicales de células no pequeñas, 1 de 35 adenocarcinomas pulmonares y 1 de 92 carcinomas de mama. (83) También se evaluó el anticuerpo en 365 sarcomas de tejido blando. Los tumores que mostraron inmunoreactividad en forma ocasional, en la mayoría de los casos con marcado focal, fueron 3 de 5 schwannomas melanóticos, 5 de 20 angiosarcomas, 4 de 20 melanomas metastáticos, 4 de 20 sarcomas de Ewing/tumores neuroectodérmicos periféricos primitivos malignos, 2 de 10 perineurinomas, 2 de 20 condrosarcomas mixoides extraesqueléticos. Muy pocas células tumorales fueron marcadas por el anticuerpo en 1 de 10 sarcomas fibromixoides de bajo grado y en 1 de 20 fibromatosis desmoides. Se encontró que más de 35 tumores consecutivos del estroma gastrointestinal (TEGI) sobreexpresaron el c-kit cuando se los examinó con el anticuerpo y estos resultados fueron confirmados por inmunoblotting. El marcado en estos tumores fue típicamente difuso y, por lo general, fuerte. (85) El anticuerpo también marcó a

las células madre activadas [db2] de la médula ósea en las biopsias de médula ósea de casos de linfomas malignos infiltrativos y osteomielitis. El marcado de las células madre activadas de la médula ósea fue más heterogéneo en los casos de anemia aplásica, mielodisplasia y metástasis de la próstata o cáncer de mama. (90,91,92) No se observó marcado en 17 carcinomas pulmonares de células grandes, 5 carcinomas pulmonares adenoescamosos, 1 carcinoma pulmonar mucoepidermoide, 2 carcinomas cervicales del tipo de células pequeñas, 9 carcinomas ováricos de células clara, 4 cistoadenocarcinomas mucosos ováricos, 4 carcinomas endometriales, 17 tumores de células germinales, con excepción de seminomas/disgerminomas y teratomas inmaduros, 355 carcinomas del tracto gastrointestinal, 59 carcinomas de hígado, 31 carcinomas de páncreas, 7 carcinomas de vesícula, 16 carcinomas de los conductos biliares, 29 carcinomas de riñón, 49 carcinomas de vejiga, 159 carcinomas de próstata, 14 carcinomas adrenales, 91 carcinomas de tiroides, 45 carcinomas de piel, 7 ganglioneuromas, 23 feocromocitomas, 12 paragangliomas, 7 carcinomas medulares tiroideos, 1 retinoblastoma, 30 carcinoides, 10 tumores neuroendócrinos pulmonares, 20 tumores neuroendócrinos del tracto gastrointestinal, 3 tumores de Ewing y 8 tumores de los islotes pancreáticos. (83) No se observó marcado en los tumores de tejido blando en 40 leiomiomas, 25 rabdomiosarcomas, 20 mixofibrosarcomas, 10 liposarcomas mixoides/ de células redondas, 10 liposarcomas no diferenciados, 20 tumores fibrosos solitarios, 20 sarcomas sinoviales, 30 dermatofibrosarcomas protuberantes, 20 schwannomas, 20 tumores de la vaina de nervios periféricos malignos, 10 sarcomas de células claras, 10 sarcomas del estroma de endometrio de bajo grado y 5 sarcomas foliculares de células dendríticas.(85)

4. Ki-67: Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Clone: MIB-1

(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Inmunógeno: péptido recombinante humano correspondiente a un fragmento de cADN de Ki-67 de 1002 bp. Isotipo: IgG1, kappa

Está indicado para su uso en laboratorio para identificar cualitativamente con el microscopio óptico las células positivas a Ki-67 en los tejidos normales y neoplásicos fijados con formol e incluidos en parafina mediante pruebas inmunohistoquímicas. Los resultados positivos indican que las células se dividen en el tejido normal y neoplásico.(93)

El anticuerpo MIB-1 monoclonal reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 (doble banda de 345 y 395 kD en el procedimiento de inmunoblotting de la proteína extraída de las células proliferativas) asociado a la proliferación celular, presente en todo el ciclo celular (fases G1, S, G2 y M) y ausente en las células en reposo (fase G0). (94) El anticuerpo reconoce el antígeno Ki-67 nativo y los fragmentos recombinantes de la molécula Ki-67.(95)

Preparación de los especímenes

Secciones de parafina

El anti-Ki-67 se puede utilizar en secciones de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina. Las secciones de tejido desparafinadas se deben tratar con calor antes del procedimiento de tinción inmunohistoquímica. La recuperación antigénica conlleva la inmersión de las secciones de tejido en una solución tampón precalentada y el mantenimiento del calor en un baño de agua (95–99°C), un vaporizador (95–99°C) o un autoclave (121°C).

Se recomienda una solución de recuperación antigénica (nº de catálogo S1700) o un concentrado 10x (nº de catálogo S1699) en caso de utilizar un protocolo de calentamiento de 20 minutos con el sistema de detección LSAB2 o LSAB+. Si se utiliza el sistema de detección EnVision o EnVision+, la tinción se puede mejorar mediante la ampliación del tiempo del protocolo de calentamiento a 40 minutos.

Cortes de congelación y frotis de células

El anti-Ki-67 se puede utilizar para marcar cortes de congelación fijados con acetona. La recuperación antigénica no es necesaria.

Procedimiento de tinción

El tiempo de incubación recomendado para este anticuerpo primario es el siguiente: N1633: 10 minutos a temperatura ambiente con LSAB2; 30 minutos a temperatura ambiente con EnVision NP011: 30 minutos a temperatura ambiente

Características de tinción

El patrón de tinción celular del anti-Ki-67 es nuclear.

Tejidos normales

Tabla 1. Resumen de la reactividad tisular normal 5

<i>Tipo de tejido</i>	<i>Tinción positiva del elemento tisular</i>
Suprarrenal	0 de 2 casos
Médula ósea	3 de 3 casos de células precursoras hematopoyéticas inmaduras
Cerebro/cerebelo	0 de 3 casos
Cerebro	0 de 3 casos
Mama	1 de 2 casos de células epiteliales lobulares
Cuello uterino	3 de 3 casos de células escamosas basales
Colon	2 de 3 casos de mucosa epitelial; 1 de 3 casos de epitelio glandular
Esófago	3 de 3 casos de epitelio escamoso basal
Corazón	0 de 3 casos
Hígado	0 de 3 casos
Pulmón	0 de 3 casos
Células mesoteliales	3 de 3 casos de células mesoteliales
Ovario	1 de 3 casos de células granulosas de oocito
Páncreas	0 de 3 casos
Paratiroides	0 de 1 casos
Nervio periférico	0 de 3 casos
Pituitaria	0 de 3 casos
Próstata	1 de 2 casos de células epiteliales glandulares
Glándula salival	0 de 3 casos
Músculo esquelético	0 de 3 casos
Piel	3 de 3 casos de queratinocitos epidérmicos
Intestino delgado	2 de 3 casos de células epiteliales de la mucosa
Bazo	2 de 3 casos de linfocitos internos y próximos a la vaina linfoide periarteriolar
Estómago	3 de 3 casos de células epiteliales de la mucosa gástrica
Testículos	3 de 3 casos de espermatogonia inmadura
Timo	3 de 3 casos de linfocitos corticales
Tiroides	0 de 3 casos
Amígdalas	3 de 3 casos de linfocitos del centro germinal

Útero 3 de 3 casos de células epiteliales glandulares; 2 de 3 casos de células estromales endometriales

Tejidos anormales

La detección inmunohistoquímica del antígeno Ki-67 se ha utilizado como medida de la fracción de crecimiento en una serie de tumores. Entre los diversos tumores en que el estado de división celular se ha evaluado mediante anticuerpos frente a Ki-67 se encuentran la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el neuroblastoma, el mesotelioma, el adenocarcinoma de próstata y el carcinoma de mama. (98-103)

5.C-erb-B2: HercepTest™

(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

HercepTest™ es un ensayo inmunocitoquímico semicuantitativo para determinar la sobreexpresión de la proteína HER2 en tejidos mamarios cancerosos y otros procesados de forma rutinaria para su evaluación histológica.

El gen humano *HER2* (también conocido como *ERBB2* o *NEU*) codifica una proteína a menudo llamada proteína HER2 o p185HER2. La proteína HER2 es una tirosinquinasa del receptor de membrana homóloga con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1) (103-110). La proteína HER2 es un componente normal expresado por una variedad de tipos de células epiteliales (110).

En una parte de los pacientes con cáncer de mama, la proteína HER2 aparece sobreexpresada, como parte del proceso de transformación maligna y de progresión tumoral (111). La sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de las células con cáncer de mama sugería que podría tratarse de un objetivo de una terapia con anticuerpos. Herceptin™ (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado (112) que se liga con gran afinidad a la proteína HER2 y que ha demostrado ser un inhibidor de la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan la proteína HER2 in vitro e in vivo (113-115).

Características

HercepTest™ se desarrolló para ofrecer una alternativa al CTA de investigación utilizado en los estudios clínicos de Herceptin™. El rendimiento de HercepTest™ en la determinación de la sobreexpresión de la proteína HER2 se evaluó en un estudio independiente comparando los resultados de HercepTest™ con los del CTA en 548 especímenes de cáncer de mama, ninguno de los cuales se obtuvo de pacientes de los estudios clínicos de Herceptin™. Los resultados indicaron una concordancia del 79% entre los resultados de los dos ensayos en estos especímenes de tejido.

HercepTest™ se interpreta como negativo para la sobreexpresión de la proteína HER2 con una intensidad de tinción de 0 y 1+, débilmente positivo con una intensidad de tinción de 2+ y altamente positivo con una intensidad de tinción de 3+. HercepTest™ no está pensado para ofrecer información de pronóstico a los pacientes y médicos y no se ha validado a este efecto.

Principio del procedimiento

HercepTest™ contiene los reactivos necesarios para completar un procedimiento de tinción inmunocitoquímica en dos pasos con especímenes procesados de forma rutinaria e incluidos en parafina. Después de la incubación con el anticuerpo primario de conejo de la proteína HER2 humana, este kit utiliza un reactivo de visualización listo para su uso basado en tecnología de dextrano. Este reactivo consiste tanto de moléculas secundarias de inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo como de moléculas de peroxidasa de rábano rusticano ligadas a un esqueleto de polímero de dextrano común, lo que elimina la necesidad de una aplicación secuencial de anticuerpos de enlace y anticuerpos conjugados de peroxidasa. La reacción cruzada del reactivo de visualización con las inmunoglobulinas humanas y el suero fetal bovino se ha eliminado por absorción en fase sólida. La conversión enzimática del cromógeno añadido posteriormente provoca la formación de un producto de reacción visible en el lugar del antígeno. Entonces, el espécimen puede someterse a contratinción y se puede colocar el cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico.

Los portaobjetos de control que contienen tres líneas celulares humanas con cáncer de mama incluida en parafina y fijada en formol con puntuaciones de intensidad de tinción de 0, 1+ y 3+ se suministran para validar las secuencias de tinción. La intensidad de tinción de estas líneas celulares se ha relacionado con el número de receptores por célula. HercepTest™, número de catálogo K 5204, se puede aplicar tanto en tinción manual como automática, utilizando el Autostainer.

Preparación del espécimen

Los especímenes de biopsia se deben manipular de forma que se conserve el tejido para la tinción inmunocitoquímica. Deben utilizarse los métodos estándar de procesamiento de tejidos para todos los especímenes (117).

Cortes incluidos en parafina

Los tejidos conservados en formol tamponado neutro o fijados con Bouin para su procesamiento rutinario y la inclusión en parafina son adecuados para el uso. Por ejemplo, con los especímenes de biopsia deben hacerse bloques de un grosor de 3 ó 4 mm y fijarse durante 18-24 horas en formol tamponado neutro. A continuación, los tejidos se deshidratan en un conjunto de alcoholes y xileno, a lo que sigue la infiltración por parafina fundida a una temperatura que no supere los 60°C (117,118). En EE.UU., la Ley de Mejoras de Laboratorio Clínico de 1988 exige en el apartado 42 CFR 493.1259(b) que “El laboratorio debe conservar los

portaobjetos teñidos como mínimo durante diez años a partir de la fecha del análisis y los bloques de espécimen como mínimo durante dos años a partir de la fecha del análisis” (118). Los especímenes de tejido deben cortarse en cortes de 4-5 mm. (119).

La utilización de HercepTest™ en tejidos decalcificados no se ha validado y no se recomienda.

Tratamiento de los tejidos antes de la tinción

Para un rendimiento óptimo del ensayo, debe utilizarse un método específico de recuperación de epítipo: la ebullición en tampón citrato a 10 mmol/L. La Epitope Retrieval Solution se suministra con el kit HercepTest™. Este método implica el calentamiento de los cortes de tejido montados en portaobjetos sumergidos en tampón citrato a 10 mmol/L (120,121) en un baño de agua calibrado capaz de mantener la Epitope Retrieval Solution a la temperatura necesaria. Inmediatamente después de la recuperación de epítipo, se inicia el procedimiento de tinción.

INSTRUCCIONES DE USO

A. Preparación del reactivo

Resulta adecuado preparar los siguientes reactivos antes de la tinción:

A.1 Epitope Retrieval Solution

Se diluye una cantidad suficiente del vial 7 (Epitope Retrieval Solution x 10) a 1:10 utilizando agua destilada o desionizada para el procedimiento de tinción previsto. Las soluciones diluidas que no se utilicen pueden almacenarse a entre 2 y 8°C durante un mes. Se desecha la solución diluida si tiene un aspecto turbio.

A.2 Wash Buffer

Se diluye una cantidad suficiente del vial 8 (Wash Buffer x 10) a 1:10 utilizando agua destilada o desionizada para los pasos del lavado. Las soluciones tampón diluidas que no se utilicen pueden almacenarse a entre 2 y 8°C durante un mes. Puede utilizarse agua destilada o desionizada para el aclarado después de las incubaciones en Peroxidase-Blocking Reagent, Substrate-Chromogen Solution y hematoxilina. El resto de pasos de aclarado requieren el uso del Wash Buffer.

A.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Con el procedimiento que sigue se obtiene 1 mL de Substrate-Chromogen Solution. Una porción alícuota de 1 mL es suficiente para diez cortes de tejido.

A.4 Contratinción

El producto final teñido resultante de la reacción de tinción de DAB es insoluble en alcohol y agua. Se utiliza una contratinción de hematoxilina. Tras la contratinción con hematoxilina, se realiza un aclarado intenso en agua destilada o desionizada y, seguidamente, se sumerge los cortes de tejido en un baño de agua de amoníaco a 37 mmol/L.

A.5 Medio de montaje

Se recomienda un medio de montaje no acuoso y permanente. Se recomienda la utilización de DakoCytomation Faramount Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use, número de catálogo S 3025 o Glycergel™ Mounting Medium, número de catálogo C 0563 para un montaje acuoso. Licue Glycergel™ calentándolo a aproximadamente 40 (± 5)°C antes de su uso.

B Procedimiento de tinción

B.1 Notas referentes al procedimiento

Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25°C) antes de la inmunotinción. De forma similar, todas las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente. No hay que dejar que los cortes de tejido se sequen durante el procedimiento de tinción.

Si se debe interrumpir el procedimiento de tinción, los portaobjetos pueden guardarse en un baño de tampón después de la incubación del anticuerpo primario (paso 3) como máximo una hora a temperatura ambiente (20-25°C) sin que afecte al rendimiento de la tinción.

Desparafinización y rehidratación: antes de la tinción, los portaobjetos con los tejidos deben desparafinizarse, para eliminar el medio de inclusión, y rehidratarse. No se debe eliminar completamente la parafina.

B.2 Protocolo de tinción

Realizado a temperatura ambiente, 20-25°C.

Paso 1. Recuperación de epítipo

Se llena los recipientes de tinción, con la Epitope Retrieval Solution diluida. Se coloca los recipientes de tinción con Epitope Retrieval Solution en un baño de agua. Se calienta el baño de agua y Epitope Retrieval Solution a una temperatura de 95-99°C. Se cubre los recipientes con tapas para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación. Se sumerge los cortes desparafinizados a temperatura ambiente en la Epitope Retrieval Solution precalentada de los

recipientes de tinción. Se vuelve a situar la temperatura del baño de agua y epitope retrieval solution de nuevo a 95^a-99^a. Se incuba durante 40 (\pm 1) minutos a 95-99°C.

Se retira todo el recipiente con los portaobjetos del baño de agua. Se deja que los portaobjetos se enfríen en la Epitope Retrieval Solution durante 20 (\pm 1) minutos a temperatura ambiente. Se decanta la Epitope Retrieval Solution y se aclara los portaobjetos en el Wash Buffer diluido. Para un rendimiento óptimo, se empapa los cortes en Wash Buffer entre 5 y 20 minutos después de la recuperación de epítopo y antes de la tinción.

Paso 2. Peroxidase-Blocking Reagent

Se elimina el exceso de líquido golpeando suavemente los portaobjetos. Con la ayuda de una tela sin hilos alrededor del espécimen para eliminar cualquier líquido presente y conservar los reactivos dentro del área especificada.

Se aplican 3 gotas (100 μ L) de Peroxidase-Blocking Reagent para cubrir el espécimen. Se incuba durante 5 (\pm 1) minutos. Se aclara *suavemente* con agua destilada o desionizada o Wash Buffer de un frasco de lavado y se coloca en un baño de tampón.

Paso 3. Primary Antibody or Negative Control

Se elimina el exceso de líquido golpeando suavemente los portaobjetos. Se cubre el espécimen con 3 gotas (100 μ L) de Anti HER2 Protein o Negative Control Reagent.

Se incuba durante 30 (\pm 1) minutos.

Se aclara *suavemente* con Wash Buffer de un frasco de lavado y se coloca en un baño de tampón.

Si debe interrumpirse el procedimiento de tinción, los portaobjetos pueden guardarse en Wash Buffer después del paso 3 hasta una hora a temperatura ambiente (20-25°C) sin que afecte al rendimiento de la tinción.

Paso 4. Visualization Reagent

Se elimina el exceso de líquido golpeando suavemente los portaobjetos. Se cubre el espécimen con 3 gotas (100 μ L) de Visualization Reagent.

Se incuba durante 30 (\pm 1) minutos.

Se aclara los portaobjetos como en el paso 3.

Paso 5. Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Se limpia los portaobjetos como se indica anteriormente.

Se cubre el espécimen con 3 gotas (100 mL) de Substrate-Chromogen Solution (DAB).

Se incuba durante 10 (\pm 1) minutos.

Se aclara *suavemente* con agua destilada o desionizada de un frasco de lavado (no aplique el flujo directamente sobre el tejido).

Paso 6. Contratación (instrucciones válidas para la hematoxilina)

Se sumergen los portaobjetos en un baño de hematoxilina. Se incuba entre 2 y 5 minutos, en función de la potencia de la hematoxilina utilizada.

Se aclara *suavemente* en un baño de agua destilada o desionizada. Hay que asegurar de que se han eliminado todos los residuos de hematoxilina.

Paso 7. Montaje

Se recomienda un medio de montaje no acuoso y permanente. Los especímenes pueden montarse y taparse con cubreobjetos con un medio de montaje acuoso como DakoCytomation Faramount, número de catálogo S 3025, o Glycergel™, número de catálogo C 0563.

Control de calidad

Las diferencias en la fijación, el procesamiento y la inclusión de tejidos en el laboratorio pueden generar una variabilidad significativa de los resultados, lo que requeriría un rendimiento regular de los controles internos además de los portaobjetos de control suministrados por DakoCytomation. (125,126)

Interpretación de la tinción

En la determinación de la sobreexpresión de la proteína HER2, sólo deben evaluarse la intensidad y el patrón de tinción de la *membrana*, utilizando la escala presentada en la tabla 2.

Para la evaluación de la tinción y la puntuación inmunocitoquímicas, resulta apropiado un objetivo de aumento 10x. La utilización de un objetivo de aumento 20-40x puede resultar de utilidad para confirmar la puntuación. La tinción citoplasmática debe considerarse como tinción no específica y no se incluirá en la evaluación de la intensidad de tinción de la membrana (110).

Tabla 2. Criterios de intensidad de tinción de la membrana celular.

Patrón de tinción. Puntuación. Evaluación de la sobreexpresión de la proteína HER2.

No se observa tinción o la tinción de la membrana se observa en menos de un 10% de las células tumorales

Se detecta una tinción de la membrana débil o prácticamente imperceptible en más de un 10% de las células tumorales. Las células sólo presentan tinción en parte de su membrana

0 Negativa

1+ Negativa

Se observa una tinción de membrana incompleta entre débil y moderada o completa en menos de un 10% de las células tumorales. Se observa una tinción de membrana completa fuerte en menos de un 10% de las células tumorales

2+ Dudosa, expresión positiva en mas del 10% de las células

3+ Positiva, expresión completa de membrana en la mayoría de las células.

HercepTest™ se interpreta como negativo para la sobreexpresión de la proteína HER2 (con intensidad de tinción 0 y 1+), débilmente positivo (con intensidad de tinción 2+) y altamente positivo (con intensidad de tinción 3+). HercepTest™ no está pensado para ofrecer información de pronóstico a los pacientes y médicos y no se ha validado a este efecto.

Limitaciones específicas del producto

1. El antígeno presente en la línea celular de control 1+ MDA-175 se degradará con el tiempo. Una tinción negativa de las células MDA-175 puede indicar que el portaobjetode control se ha degradado. Los portaobjetos de control deben almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8°C.

2. Es posible que la degradación del antígeno en los tejidos provoque con el tiempo resultado falso negativos. Cuando se almacenan a temperatura ambiente (20-25°C), los especímenes se deben teñir antes de que transcurran de 4 a 6 semanas desde el montaje de los tejidos en los portaobjetos (126).

3. Para obtener unos resultados óptimos y reproducibles, la proteína HER2 exige una recuperación de epítopo por calor cuando los tejidos se fijan de la forma rutinaria (formol tamponado neutro o fijador de Bouin) y se incluyen en parafina. Este pretratamiento debe completarse al principio de todo el proceso de tinción.

4. La recuperación de epítipo por calor de la proteína HER2 sólo debe realizarse mediante un baño de agua calibrado. Se han probado otros métodos de calentamiento que no han arrojado resultados reproducibles.

6. EGFR:EGFR pharmDx™

(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Es un kit inmunohistoquímico para identificar la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en tejidos normales y neoplásicos fijados de la forma habitual para su evaluación histológica. EGFR pharmDx detecta específicamente la proteína EGFR (HER1) en células que expresan el EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico es un receptor transmembranal de 170 kD codificado por el gen *HER1* humano. La proteína EGFR contiene un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular con actividad tirosinquinasa intrínseca. La proteína EGFR es homóloga a otros miembros de la familia erbB/receptor EGF entre los que se incluyen el HER2/erbB2 o neu, HER3/erbB3 y HER4/erbB4 (133,134). Una variedad de células normales expresan la proteína EGFR entre las que se incluyen muchos tipos de células epiteliales y tumores derivados de estos tipos celulares (135-141). Entre los tipos celulares no epiteliales que expresan el EGFR se incluye: músculo liso, fibroblastos y nervio (142).

Especificidad

Mouse monoclonal anti-human EGFR, clon 2-18C9 se proporciona como sobrenadante de cultivo de tejido hibridoma obtenido de un ratón inmunizado con EGFR inmunoprecipitado de la línea de células A431 (carcinoma de epitelio humano). Los estudios de mapeo de epítomos indican que el anticuerpo reconoce un epítomo en la zona extracelular rica en cisteína del subdominio S2 de la molécula, y proximal al dominio transmembranal. Un mapeo más detallado de los aminoácidos críticos indica que el epítomo es conformacional y depende del puente de disulfido en la molécula nativa (143). Se ha demostrado que este clon de anticuerpo monoclonal no tiene una reacción cruzada con HER2, HER3 ni HER4, ni con el vector tag, myc. La tinción citoplásmica es común. Sin embargo, la prueba debe repetirse si una tinción citoplásmica significativa dificulta la lectura de la tinción diagnóstica de la membrana y la interpretación de los resultados.

Principio del procedimiento

El kit EGFR pharmDx IHC contiene reactivos necesarios para completar un procedimiento de tinción de muestras incluidas en parafina, fijadas de la forma habitual. Tras la incubación con el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína EGFR humana, clon 2-18C9, este kit utiliza un reactivo de visualización listo para

usar basado en la tecnología del dextrano. Este reactivo está compuesto por moléculas de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón y moléculas de peroxidasa de rábano unidas a un esqueleto del polímero de dextrano común, eliminando así la necesidad de la aplicación secuencial de conjugado de peroxidasa y anticuerpo de enlace. La conversión enzimática del cromógeno añadido posteriormente produce la formación de un producto de la reacción visible en la zona del antígeno. La muestra puede contratarse y ponerse en un cubreobjetos.

Los resultados se interpretan con un microscopio óptico. Se suministran portaobjetos de control que contienen dos líneas de células humanas incluidas en parafina, fijadas en formol, con una valoración de la intensidad de tinción de 2+ y 0 para control de calidad de la eficacia del reactivo del kit.

Preparación de las muestras

Las muestras de biopsia deben manipularse de forma que se conserve el tejido para su tinción. (144,145). Las muestras conservadas en formol neutro tamponado al 10 % (v/v), formol sin tamponar al 10 % (v/v), formol sin tamponar al 25 % (v/v), AFA (alcohol formol acético), Pen-fix de Richard-Allen Scientific y fijador de Bouin pueden analizarse con EGFR pharmDx. Los tejidos fijados en PreFer de Anatech no son adecuados para analizar con EGFR pharmDx. El uso de EGFR pharmDx con tejidos fijados con PreFer resulta en una conservación no satisfactoria de la morfología, y puede generar resultados equívocos (146).

Cortes incluidos en parafina

Está indicado el uso de tejidos incluidos en parafina. Las muestras de la biopsia deben colocarse en bloques de un espesor de 3 ó 4 mm y fijarse durante el período correspondiente al fijador. A continuación, los tejidos son deshidratados y secados en una serie de alcoholes y xileno, seguido por infiltración mediante parafina fundida. La temperatura de la parafina no debe superar los 60 °C. Los bloques de tejido incluidos y fijados adecuadamente que expresen la proteína EGFR, se podrán mantener indefinidamente antes de cortarse y montarse en portaobjetos si se conservan en un lugar frío (15–25 °C)(145,147).

Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de 3–5 µm. Después de cortarlo, los tejidos deben montarse en portaobjetos y colocarse en rejillas de secado.

Las rejillas de portaobjetos deben sacudirse suavemente en una toalla absorbente para eliminar el agua atrapada debajo de la parafina y el cristal, después deben secarse a temperatura ambiente durante una hora, secándolos

durante una hora más en un incubador a 50–60 °C. Cualquier resto de agua en los portaobjetos después de su eliminación con el incubador, debe eliminarse sacudiendo los portaobjetos en una toalla y secándolos durante una hora más en el incubador. Para conservar la antigenicidad, los cortes de tejido, montados en portaobjetos deben teñirse dentro de un período de 2 meses tras ser cortados si se mantienen a temperatura ambiente (20–25°C)

El uso de esta prueba en tejidos descalcificados no ha sido validado, por lo que no puede recomendarse.

Instrucciones de uso

Preparación de los reactivos

Los siguientes reactivos deben prepararse antes de la tinción:

Solución de tampón de lavado

Se prepara una cantidad suficiente de tampón de lavado diluyendo tampón de lavado 10x en una proporción 1:10 con agua destilada o desionizada (agua de grado reactivo) para los pasos de lavado.

Substrate-Chromogen Solution (DAB+)

Esta solución debe mezclarse bien antes de usar. Cualquier precipitado que se desarrolle en la solución no afecta a la calidad de la tinción. Para preparar la solución DAB+ Substrate-Chromogen, se añaden 11 gotas de Liquid DAB+ Chromogen a un vial de DAB+ Substrate Buffer y mézclelo.

Contratinción

Se prepara el agua amoniacal para teñir de azul la contratinción si es necesario. El agua amoniacal (0,037 mol/L) se prepara mezclando 2,5 ($\pm 0,5$) ml de hidróxido de amoníaco 15 mol/L (concentrado) con 1 litro de agua de grado reactivo. El agua amoniacal 0,037 mol/L no utilizada puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) en un frasco herméticamente cerrado durante un máximo de 12 meses.

Interpretación del procedimiento de tinción

La evaluación de los portaobjetos debe ser realizada con un microscopio óptico. Todas las evaluaciones tienen que realizarse en la región del tumor de la

muestra. Un objetivo de 10X o 20X aumentos es apropiado para evaluar la intensidad y la tinción inmunohistoquímica. Se deben utilizar células intactas para interpretar los resultados de la tinción. Las células necróticas o degeneradas a menudo se tiñen de forma inespecífica (151).

Cada kit de EGFR pharmDx incluye líneas de células positivas y negativas, para validar los procesos de tinción cada vez que se realiza el ensayo. Una tinción adecuada de las líneas de células de control proporciona evidencia de que el ensayo EGFR pharmDx funciona correctamente.

EGFR pharmDx tiñe principalmente las membranas celulares, demostrando una tinción circunferencial completa e incompleta. Frecuentemente, el patrón de inmunotinción es heterogéneo, mostrando varias intensidades de tinción en una única neoplasia. También se ha observado tinción en el citoplasma y en los espacios extracelulares.

Los resultados de la prueba EGFR pharmDx se comunican como positivos o negativos, utilizando la tinción de la membrana como la estructura evaluable. La positividad de la expresión de EGFR se define como cualquier tinción de la membrana por encima del nivel de fondo, tanto si es completamente circunferencial como si no lo es. La ausencia de tinción se comunica como negativa.

La tinción citoplásmica es común. Sin embargo, la prueba debe repetirse si una tinción citoplásmica significativa dificulta la lectura de la tinción de la membrana y la interpretación de los resultados. Según el período de la incubación y la potencia de la hematoxilina utilizada, la contratinción puede producir una coloración de los núcleos de las células que va de azul claro a azul oscuro. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación de los resultados.

Resultados de la tinción con EGFR pharmDx

Negativo para EGFR Ausencia de tinción específica de la membrana en el tumor. La tinción positiva (1+) se define como cualquier tinción IHQ de las **membranas** de las células tumorales, por encima del nivel del fondo, tanto si se trata de una tinción circunferencial completa como incompleta de más del 10% de las células. Intensidad de la tinción Porcentaje de tinción de las células tumorales. Positivo para EGFR 1+, 2+ o 3+ ≥ 1 %

Limitaciones específicas del producto

Los resultados negativos falsos podrían ser causados por la degradación del antígeno en los tejidos con el transcurso del tiempo. Las muestras deben teñirse dentro de los 2 meses siguientes al montaje de los tejidos en los portaobjetos, cuando se almacenan a temperatura ambiente (20–25 °C) (146,157). Para obtener resultados óptimos y reproducibles, la proteína EGFR requiere la digestión proteolítica cuando los tejidos se fijan de manera estándar y se incluyen en parafina.

Características de resultados

Especificidad

Se ha analizado la reactividad del anticuerpo anti-EGFR, clon 2-18C9 (2-18C9) contra las líneas celulares que expresan EGFR, HER2, HER3 y HER4. En la inmunotinción "western" de SKBR3 y los lisados de células A431, 2-18C9 se reconoció una banda de 170kD que es coherente con el peso molecular conocido de EGFR.

Inmunorreactividad

En la tabla 5 se presenta un resumen de la inmunorreactividad de EGFR pharmDx en el panel recomendado de tejidos normales. Todos los tejidos estaban incluidos en parafina y fijados con formol.

Tabla 5: Evaluación de tinción de tejido normal mediante EGFR pharmDx*

<i>Tipo de tejido (Nº analizado)</i>	<i>Tinción de elemento tisular positivo y patrón de tinción</i>
Suprarrenal (2)	Células corticales (2+): citoplasma
Médula ósea (3)	Ninguno
Mamas (2)	Células epiteliales lobulares (2+): membrana y citoplasma
Encéfalo, cerebelo (3)	Capa molecular (1+): extracelular
Encéfalo/cerebrum (3)	Ninguno
Cuello uterino (3)	Células epiteliales escamosas basales (2+): membrana
Colon (3)	Ninguno**
Esófago (2)	Células epiteliales escamosas basales (2+): membrana
Corazón (3)	Ninguno
Riñón (3)	Túbulos (1+): tinción citoplásmica (granular)
Hígado (3)	Hepatocitos (sinusoides) (3+); vías biliares (3+): membrana y citoplasma
Pulmón (3)	Células del epitelio alveolar/células bronquiales basales

(células mioepiteliales) (2+): membrana y citoplasma Células mesoteliales (3)
 Células mesoteliales (2+): membrana y citoplasma
 Ovario (3) Ninguno
 Páncreas (3) Conductos (2+): membrana
 Paratiroides (1) Ninguno
 Nervio periférico (3) Procesos de células nerviosas (1+): fibroso
 Pituitaria (3) Ninguno
 Próstata (3) Células epiteliales glandulares (2+): membrana
 Glándula salival (3) Elementos ductales (1+): citoplasma
 Músculo esquelético (3) Ninguno
 Piel (3) Células escamosas, estructuras anexiales (2+): membrana y
 citoplasma
 Intestino delgado (3) Ninguno
 Bazo (3) Ninguno
 Estómago (3) Ninguno
 Testículo (3) Ninguno
 Timo (3) Ninguno
 Tiroides (3) Ninguno
 Amígdala (3) Epitelio escamoso (3+): membrana y citoplasma
 Útero (3) Epitelio de la glándula endometrial (2+): membrana y citoplasma
 Células del estroma endometrial (2+): membrana y citoplasma
 Miometrio: Ninguno

*La mayoría de los tejidos analizados dieron una tinción positiva de fibroblastos en tejido del estroma (1+, fibroso) así como los fibroblastos perineurales y las células mioepiteliales. Ocasionalmente, se observó la tinción de eosinófilos inducida por la peroxidasa endógena.

**Se ha observado una inmunotinción variable del epitelio colónico normal.

**7.AE1/AE3:Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clon:
AE1/AE31,2**

(®DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark)

Immunogen: Callo epidérmico humano1

Isotipo: Cadena kappa de la IgG1.

El anticuerpo monoclonal de ratón contra la Citoqueratina humana, Clones AE1/AE3 (anti-CK AE1/AE3), está indicado para su uso en el laboratorio, para identificar en forma cualitativa por microscopía de luz dos epítomos presentes en la mayoría de las citoqueratinas epiteliales en los tejidos normales y neoplásicos fijados en formol e incluidos en parafina, mediante el uso de métodos de pruebas inmunohistoquímicas (IHQ). Los resultados positivos ayudan a la clasificación de los tejidos normales y neoplásicos como de origen epitelial (158-160) y sirven como complemento de la histopatología convencional. La identificación diferencial se ve facilitada por los resultados de un panel de anticuerpos

Las citoqueratinas son una familia de proteínas hidrosolubles con un peso molecular entre 40-70 kD que forman el citoesqueleto de las células epiteliales. Se han identificado al menos 19 citoqueratinas diferentes y se las puede dividir en dos subfamilias. La subfamilia A comprende a las citoqueratinas relativamente ácidas (con un pH por debajo de 5,5), mientras que los miembros de la subfamilia B tienen un pH relativamente básico de 6 o más.(161,162)

Especificidad

El AE1/AE3 es una mezcla de dos anticuerpos monoclonales que se obtuvieron mediante la inmunización de ratones con queratinas de callos humanos (159). Se ha demostrado que el AE1/AE3 identifica a la mayoría de las citoqueratinas y, por lo tanto, se lo puede utilizar como un instrumento para la identificación positiva por IHQ de las células originadas en epitelios simples y estratificados (158,159,161). El anticuerpo AE1 reacciona inmunológicamente con un determinante antigénico que se encuentra presente en la mayoría de las citoqueratinas de la subfamilia A, que incluyen a las citoqueratinas con designación 10, 13, 14, 15, 16 y 19 de Moll4 (PM 56,5, 54', 50, 50', 48 y 40 kD, respectivamente) pero no con los números 12, 17 y 18 (55, 47 y 45 kD). (161) El anticuerpo AE3 reacciona con un determinante antigénico compartido por las

citoqueratinas de la subfamilia B que incluyen los números 1 y 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (PM de 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54 y 52 kD, respectivamente) (162).

Preparación de las muestras

Secciones en parafina:

Se puede utilizar DakoCytomation AE1/AE3 en secciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina. Se requiere el pretratamiento del tejido para mejorar la identificación del epítipo.

Se pueden utilizar las siguientes enzimas para el tratamiento de los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina: Proteolytic Enzyme, RTU (N° de código S3007), Proteinase K, RTU (N° de código S3020), Pepsin (N° de código S3002), Pronase (N° de código S2013) o Trypsin (N° de código S2012) durante 5 minutos.

Se aclara concienzudamente con agua destilada y se continúa con el procedimiento de tinción de acuerdo con las instrucciones del reactivo. Como alternativa al pretratamiento de la enzima se puede utilizar la recuperación del epítipo inducida por calor. La recuperación de epítipo inducida por calor incluye la inmersión de las secciones de tejido en una solución tampón precalentada y la mantención del calor mediante un baño en agua (95–99 °C), un vaporizador (95–99 °C) o un autoclave (121 °C).

Secciones en crióstato y extendidos celulares.

Se puede utilizar el AE1/AE3 para el marcado de las secciones en cámara de congelación fijadas en acetona o extendidos celulares fijados;

Procedimiento de tinción

Los tiempos de incubación recomendados son los siguientes:

N1590: 10 minutos a temperatura ambiente con los sistemas Envision o LSAB.

NP019: 30 minutos a temperatura ambiente con los sistemas Envision+ o LSAB+.

Limitaciones específicas del producto

1. Se ha demostrado que las células del retículo extrafolicular de los ganglios linfáticos, las amígdalas y el bazo reaccionan con anticuerpos contra la citoqueratina 8.(164)

2. Se ha confirmado la presencia de citoqueratina 19 y posiblemente también la citoqueratina 8 en las células de músculo liso del útero.(165)

3. Algunos pocos melanomas (166) y leiomiomas (165) pueden teñirse en forma positiva. Por lo general este hallazgo es más pronunciado en los tejidos congelados que en los tejidos fijados en formol (167). Por lo tanto, se recomienda utilizar el AE1/AE3 en un panel con HMB45 (cuando se intente descartar melanomas) y en desmina (cuando se intente descartar leiomiomas), ya que estos últimos anticuerpos carecen de especificidad por las células epiteliales.

4. Se han informado casos de tinción falso-positiva de las células gliales tumorales presentes en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina cuando se utiliza un pretratamiento proteolítico. Se ha demostrado mediante métodos inmunocitoquímicos y bioquímicos que estas células y tumores no expresan citoqueratinas. (168)

5. Pinkus y col. (169) han enfatizado la importancia de la digestión proteolítica de los tejidos fijados en formol que van a ser teñidos con AE1/AE3.

En estos últimos casos, sólo 2 de 12 cánceres de piel de diferentes tipos mostraron una tinción óptima para la citoqueratina. Al revisar datos conflictivos acerca de la inmunoreactividad de las citoqueratinas en las publicaciones anteriores y al compararlos con los resultados propios, Pinkus y col. (169) consideraron que muchos casos previamente interpretados como falso-positivos eran atribuibles a uno o varios de estos inconvenientes.

6. En un estudio de IHQ de 87 neoplasias, entre las que se incluían 48 adenocarcinomas de varios tipos, en el que se comparó al AE1/AE3 con un anticuerpo contra el antígeno epitelial de membrana (EMA), Pinkus y col. (170) concluyeron que en el 33% de las neoplasias derivadas del epitelio el AE1/AE3 era un marcador más confiable que el anticuerpo contra el EMA para la tinción de las proteínas citoqueratinas de los tejidos fijados en formol tratados proteolíticamente. Sin embargo, se recomendó que el AE1/AE3 y el anticuerpo contra el EMA se utilizaran como reactivos complementarios, ya que el EMA fue positivo y el AE1/AE3 negativo en el 9% de los casos.

7. Aunque Listrom y Dalton (171) no informaron casos de tinción falso-positiva, se observó una tinción citoplasmática tenue en 2 de 2 plasmocitomas, 2 de 4 melanomas y 2 de 7 linfomas, lo que se consideró que fue el resultado de una tinción inespecífica del fondo.

Características de tinción

El patrón de tinción celular del AE1/AE3 es citoplasmático.

Tejidos Normales:

La evaluación de 30 tejidos normales diferentes demostró una tinción positiva del citoplasma de células de epitelio escamoso y columnar del cuello uterino, colon, esófago, piel, intestino delgado, estómago y amígdalas.

Entre otros tejidos que se tiñeron se incluye al tejido glandular (glándula mamaria, paratiroides, líquido prostático y tiroideo), astrocitos, sustancia blanca del cerebelo, filamentos gliales del cerebro, túbulos distales y cápsula de Bowman del riñón, conducto biliar, neumocitos, bronquio, mesotelio, conducto interlobulillar del páncreas, células de la hipófisis anterior, conducto interlobulillar y células acinares de las glándulas salivales, células reticulares y cuerpos de Hassall del timo y endometrio y células de músculo liso del útero. Se observó tinción negativa en las glándulas suprarrenales, la médula ósea, el corazón, el pericardio, los nervios periféricos, el músculo esquelético, el bazo y los testículos.

El anticuerpo contra el AE1/AE3 reacciona con la epidermis queratinizada (56,5/65-67) y corneana (55 de 64), el epitelio escamoso estratificado de los órganos internos (51 de 59), el epitelio estratificado (50 de 58), los queratinocitos hiperproliferativos (48 de 56) y los epitelios simples (45 de 52 y 46 de 54). La queratina de 40 kD está presente en la mayoría de los epitelios, con excepción de la epidermis de los adultos. (160,161)

Tejidos Anormales:

Listrom y Dalton¹⁴ analizaron los clones AE1/AE3 en tejidos patológicos de más de 60 neoplasias epiteliales escasamente diferenciadas, linfomas, melanomas y sarcomas. Con excepción de la tinción de sólo 2 de 6 casos de carcinomas de células pequeñas y 3 de 5 carcinomas de células transicionales, el estudio encontró que las 34 neoplasias epiteliales se tiñeron en forma positiva. Cuando era positiva, el AE1/AE3 tiñó carcinomas de células transicionales sólo en forma débil y la tinción de las células tumorales era difusamente citoplasmática o perinuclear. Montag y col (173) encontraron que el AE1/AE3 era un reactivo sensible para el diagnóstico diferencial entre el mesotelioma difuso maligno del tipo sarcomatoide (de células en huso) (positivo en 30 de 30 casos) y otros tipos de neoplasias de células en huso (0 de 49). Cuando lo compararon con el anticuerpo contra el EMA en un estudio de 87 neoplasias, entre las que se incluyeron 48 adenocarcinomas de varios tipos, Pinkus y col.(170) encontraron que en el 33% de los casos el AE1/AE3 provocó una tinción más confiable que el anticuerpo contra el EMA.

Aunque 3 de 3 casos de cordoma condroide y 1 de 8 casos de linfoma fueron reactivos con el anticuerpo contra el AE1/AE3, no se observó tinción positiva entre 25 neoplasias no epiteliales, entre las que se incluían 4 casos de melanoma y 4 de glioblastoma. (171) Cuando se utilizó el AE1/AE3 en la técnica inmunoblot no se detectó la presencia de citoqueratina en 8 casos de tumores no epiteliales, que incluyeron melanomas, linfomas, neurofibromas y sarcomas. (174) Sin embargo, se recomendó (171) que se utilizara al AE1/AE3 como uno más dentro de un panel de anticuerpos para la determinación del linaje celular en los casos de neoplasias de células pequeñas escasamente diferenciada

El estudio se hizo sobre el tumor de células germinales y en el tejido peritumoral no afecto de tumor macro ni microscópico y se hizo la Inmunohistoquímica por tanto con β HCG, α FP, C-kit, Ki-67, C-erb-B2, EGFR, AE1/AE3 en tejido tumoral y en tejido sano determinando su expresión, lo que significa 14 variables

Se confeccionó una Hoja de Recogida de todos los datos descritos con un total de 42 variables. (*Ver Hoja de Recogida*)

3. MATERIAL Y METODO ESTADISTICO

Para el estudio estadístico se utilizará el paquete SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Sciences) y Microsoft Excel para Window XP Professional.

Se confeccionó una hoja de Cálculo Excel para el tratamiento estadístico de todas las variables recogidas (Anexo 2. Variables de recogida. Opciones y Asignacion de valores numéricos para confección de hoja de Excel)

Estudio estadístico descriptivo

Se calcularán las medidas de tendencia central (media, mediana y moda), medidas de dispersión (desviación típica y varianza) para variables cuantitativas. Para variables cualitativas se obtendrán las frecuencias absolutas y relativas. Mediante tablas de frecuencias se expresarán los resultados en frecuencias (variables cualitativas absolutas) y porcentajes (relativas). Gracias a ello podremos ver características clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas de los tumores germinales y tejido peritumoral en los individuos que lo padecían.

Estudio estadístico analítico

Se realizará estudio bivariante para ver la asociación entre las distintas variables. Para relacionar variables cualitativas se utilizará previamente las tablas de contingencia. Se hará el Análisis del Intervalo de Confianza mediante el Test de la χ^2 de Pearson complementado con análisis de residuos.

Se han realizado Estimaciones de las variables mediante el Intervalo de Confianza al 95%. Se han realizado contrastes de una proporción

4. BUSQUEDA BIBLIOGRAFICA

Se realiza búsqueda electrónica en fuentes primarias y fuentes secundarias así como búsqueda manual en el tema relacionado: tumores de células germinales y marcadores inmunohistoquímicos. En el resto de partes: anatomía, embriología, marcadores inmunohistoquímicos específicos: β HCG, α FP, C-kit, Ki-67, Cerb-2, EFGR, AE1/AE3 utilizamos la bibliografía específica referida por las fuentes utilizadas. Se utiliza como palabras claves para el tema principal: “Testicular Cancer” and “Immunohistochemical”.

La búsqueda se acota a los últimos 15 años: Enero de 2000 a Julio 2015, seleccionando estudios en humanos, publicados en Inglés y en Español, aquellos con mayor evidencia, por lo que se restringió a: Metaanálisis, Revisiones Sistemáticas, Ensayos Clínicos (aleatorizados o no) y estudios validados.

El resultado de la búsqueda en PubMed obtuvo con los criterios descritos 277 estudios potenciales. Tras la depuración han sido válidos para nuestro estudio 188 artículos.

V. RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LAS VARIABLES CLINICAS

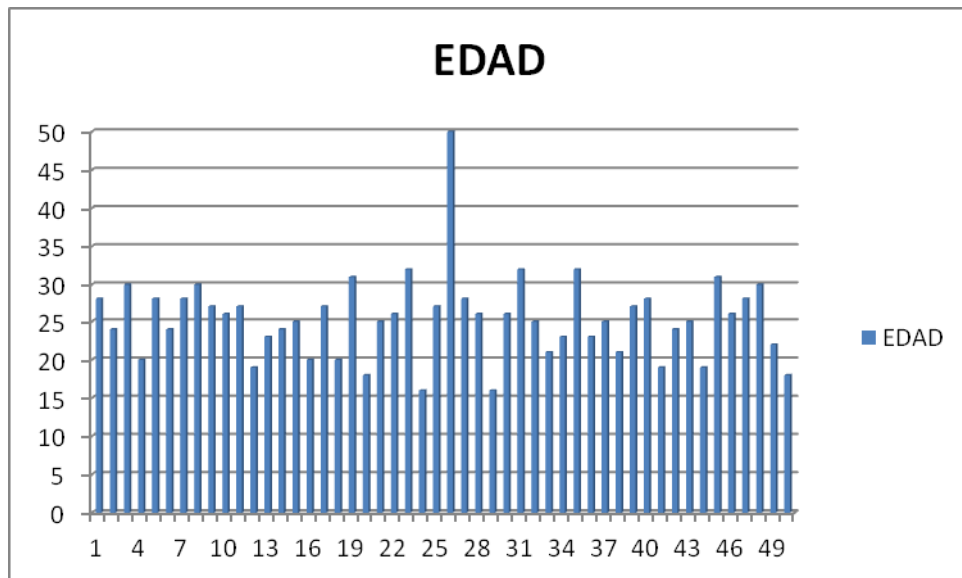
EDAD

Los resultados correspondientes a la muestra son los siguientes

Tabla 1. Edad

	Media	Desv. Tip.	Minimo	Máximo	I.Confianza
Edad	25,82	6,201	16	50	24,05 - 27

Gráfica 1. Edad



La edad de aparición está por encima de 16 años, con un pico máximo entre 24-28 años. La edad media es de 25,82 años. Hay un solo tumor que aparece a los 50 años

Se ha hecho estimación de la edad de la Población que tiene TCG de manera que con un intervalo de confianza del 95% la edad está comprendida entre 24,05 y 27 años

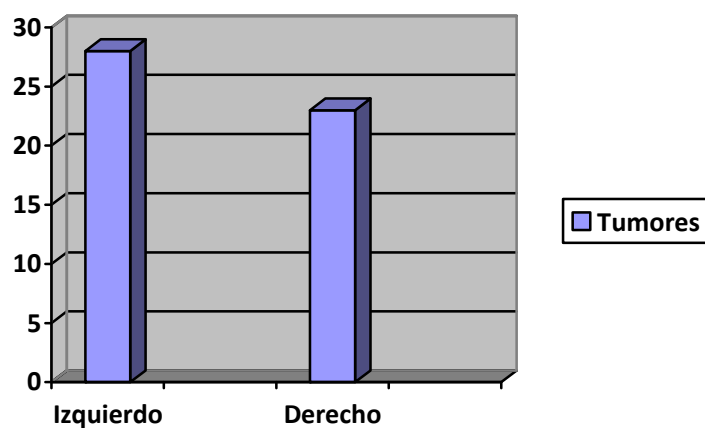
LADO

Los resultados correspondientes a la muestra son los siguientes

Tabla 2. Testículo afectado por el Tumor

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
IZQUIERDO	28	54,9
DERECHO	23	45,1

Gráfico 2. Testículo afectado por el Tumor



En nuestra muestra el 54,9 % de los tumores estaban en la gónada izquierda, correspondiendo a 28.

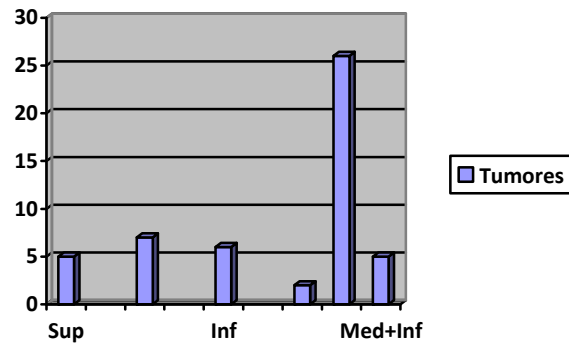
LOCALIZACIÓN

Los resultados correspondientes a la muestra son los siguientes

Tabla 3. Localización del Tumor en el Testículo

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
SUPERIOR	5	9,8
MEDIO	7	13,7
INFERIOR	6	11,8
SUPERIOR+MEDIO	2	3,9
SUPERIOR+MEDIO+INFERIOR	26	51
MEDIO+INFERIOR	5	9,8

Gráfico 3. Localización del Tumor en el Testículo



Destacar que más de la mitad del total ocupaban todo el Testículo.

2. RESULTADOS DE LAS VARIABLES ANATOMO-PATOLOGICAS

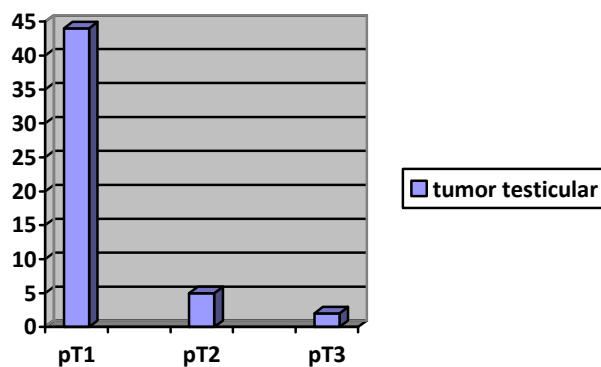
ESTADÍO PATOLÓGICO

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 4. Estadío Patológico

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
pT1	44	86,3
pT2	5	9,8
pT3	2	3,9

Gráfico 4. Estadío Patológico



El 86,3% eran organoconfinados pT1 limitado al testículo y epidídimo sin invasión linfático/vascular; el tumor podría invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginal. Sólo 2 eran pT3, es decir tumores que invadían el cordón espermático con invasión linfático/vascular o sin esta.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que en más del 75% de esta Población de TCG más del 75% de estos tumores son organoconfinados con una $p < 0,05$.

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

Los resultados obtenidos de la muestra son

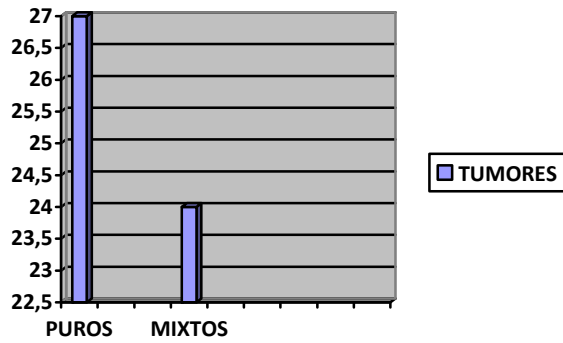
Tabla 5. Tipos de Tumor

<i>Tipo Histológico</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
Seminoma Clásico	18	35,3
Carcinoma Embrionario	4	7,8
Seno Endodérmico o Saco Vitelino	3	5,9
Teratoma Inmaduro	2	3,9
Seminoma+Carcinoma Embrionario+Saco Vitelino+Corio	1	2
Carcinoma Embrionario+Saco Vitelino+Teratoma Inmaduro	1	2
Seminoma+Carcinoma Embrionario Saco Vitelino+Teratoma Inmaduro	3	5,9
Carcinoma Embrionario+Teratoma Inmaduro Saco Vitelino+Coriocarcinoma	5	9,8
Carcinoma Embrionario+Saco Vitelino	2	3,9
Carcinoma Embrionario+Saco Vitelino	5	9,8
Seminoma+Carcinoma Embrionario+Corio+Teratoma Maduro	1	2
Carcinoma Embrionario+Coriocarcinoma+Teratoma Inmaduro	1	2
Coriocarcinoma+Teratoma Inmaduro	1	2
Seminoma+Teratoma Maduro	1	2
Tumor Estromal Mixto	1	2
Seminoma+Teratoma Inmaduro	1	2
TOTAL	51	100

Tabla 5bis. Tipos de Tumor Agrupados: Puros y Mixtos

	<i>Frecuencia.</i>	<i>%</i>
Puros	27	53
Mixtos	24	47

Gráfico 5. Tipos de Tumor: Puros y Mixtos



Tenemos 27 TCG Puros: 18 Seminomas (35,3%), 4 Carcinomas Embrionarios (7,8%), 3 Tumores del Saco Vitelino o Seno Endodérmico (5,9%) y 2 Teratomas Inmaduros (3,9%). Un total de 24 tumores (47,1%) son mixtos.

2.1.RESULTADOS DEL ESTUDIO MACROSCOPICO DEL TCG

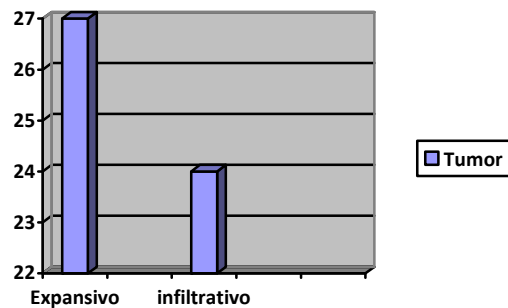
MÁRGENES

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 6. Afectación márgenes a nivel macroscópico

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
Expansivo (bien delimitado)	27	52,9
Infiltrativo (mal delimitado)	24	47,1

Gráfico 6. Afectación márgenes a nivel macroscópico



Los márgenes son en un 52,95% Expansivos, bien delimitados, siendo el resto Infiltrativos, mal delimitados.

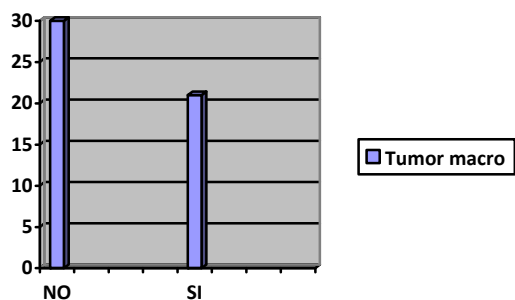
HEMORRAGIA INTRATUMORAL

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 7. Hemorragia intratumoral macroscópicamente

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Hemorragia	30	58,8
Hemorragia	21	41,2

Gráfico7. Hemorragia intratumoral macroscópicamente



En nuestra muestra, 21 tumores (41,2%) la presenta.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 32% de esta Población de TCG presentan Hemorragia intratumoral con una $p < 0,05$.

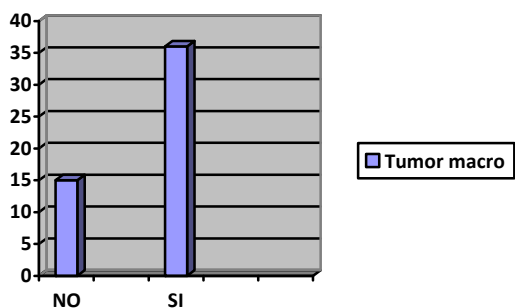
NECROSIS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 8. Necrosis Macroscópica

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Necrosis	15	29,4
Presente	36	70,6

Gráfico 8. Necrosis Macroscópica



En nuestra muestra, aparece en el 70,6% (36 tumores).

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 59% de esta Población de TCG presentan Necrosis Macroscópica con una $p < 0,05$.

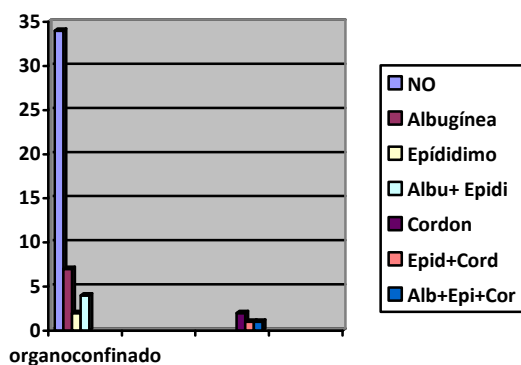
INFILTRACIÓN

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 9. Infiltración Macroscópica

<i>Afectación genital</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
NO	34	66,7
ALBUGINEA	7	13,7
EPIDÍDIMO	2	3,9
CORDÓN TESTICULAR	2	3,9
ALBUGINEA+EPIDÍDIMO	4	7,8
EPIDIDIMO+CORDON	1	2
ALBUGINEA+EPIDIDIMO+CORDON	1	2

Gráfico 9. Infiltración macroscópica



En nuestra muestra el 66,7% del total de los tumores no infiltran estructuras anexas ni la albugínea testicular. 7(13,7%) infiltran la albugínea, y solo 4 (7,8%) infiltran la albugínea y el epidídimo y solo otros 4 (7,8%) afectan al cordón testicular.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más de 2/3 partes de esta Población de TCG presentan Tumor Organoconfinado con una $p < 0,05$.

2.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCOPICO DEL TCG

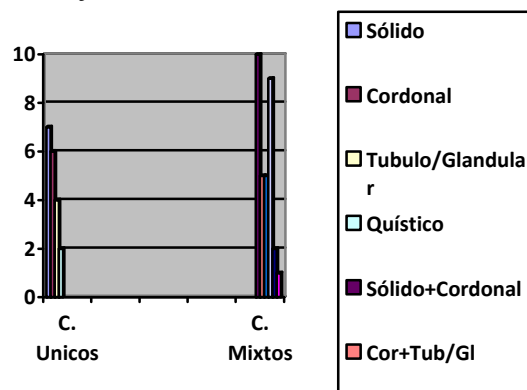
TIPO DE CRECIMIENTO

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 10. Patrones de Crecimiento

<i>Patrón de Crecimiento</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
SOLIDO	7	13,7
CORDONAL	6	11,8
TUBULO/GLANDULAR	4	7,8
SOLIDO+CORDONAL	10	19,6
SOLIDO+TUBULO/GLANDULAR	5	9,8
CORDONAL+TUBULO/GLANDULAR	5	9,8
SOLIDO+CORDONAL+TUBULO/GLANDULAR	9	17,6
QUISTICO	2	3,9
TUBULO/GLANDULAR+ QUISTICO	2	3,9
SOLIDO+QUISTICO	1	2

Gráfico 10. Patrones de Crecimiento



En nuestra muestra el más frecuente es el Sólido en Cordones con 10 casos (19,65%) y el Sólido Cordonal y Tubulo/Glandular en otros 9 lo que constituye un 17,6%. Sumando ambos serían 19 casos (37,25%)

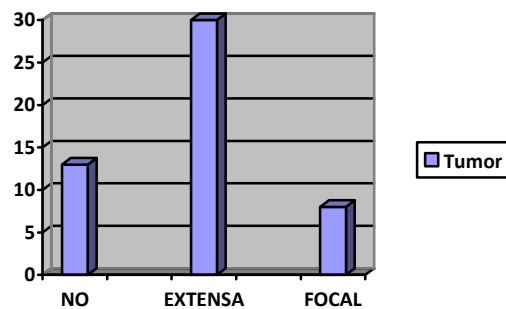
NECROSIS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 11. Necrosis Microscópica

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Necrosis	13	25,5
Extensa	30	58,8
Focal	8	15,7

Gráfico 11. Necrosis Microscópica



En nuestra muestra no aparece en el 25,5% (13 casos), El 58,8% (30 tumores) presenta una Necrosis extensa y en 8 (15,7%) es Focal.

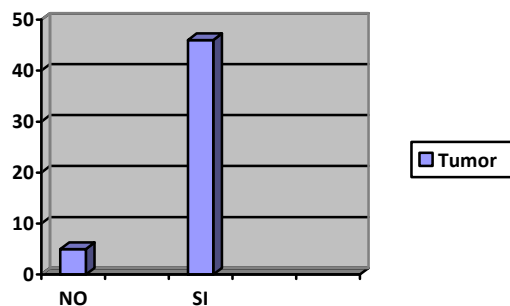
APOPTOSIS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 12. Apoptosis

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Apoptosis	5	9,8
Sí Apoptosis	46	90,2

Gráfico 12. Apoptosis



Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 80% de esta Población de TCG presentan Apoptosis con una $p < 0,05$.

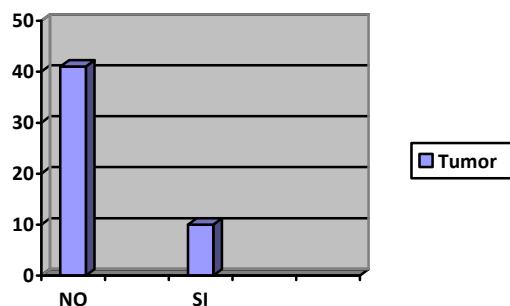
CUERPOS EMBRIOIDES

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 13. Cuerpos Embrioides

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No C.Embrioides	41	80,4
Sí C.Embrioides	10	19,6

Gráfico 13. Cuerpos Embrioides



En nuestra muestra aparecen solo en 10 casos (19,6%)

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 70% de esta Población de TCG no tendrán Cuerpos Embrioides con una $p < 0,05$.

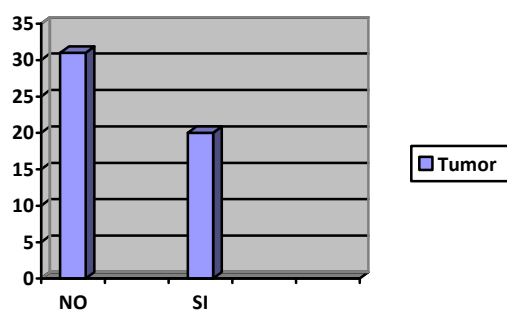
CUERPOS DE SCHILLER

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 14. Cuerpos de Schiller

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No C.Schiller	31	60,8
Sí C.Schiller	20	39,2

Gráfico 14. Cuerpos de Schiller



En 31 de los 51 tumores, lo que constituye el 60,8% no aparecen.
Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 30% de esta Población de TCG no tendrán Cuerpos Embrioides con una $p < 0,05$.

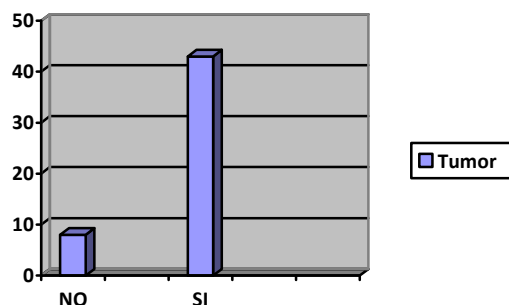
FIBROSIS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 15. Fibrosis

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Fibrosis	8	15,7
Sí Fibrosis	43	84,3

Gráfico 15. Fibrosis



La Fibrosis aparece en el 85,3% del total con 43 casos.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 75% de esta Población de TCG tendrán Fibrosis con una $p < 0,05$.

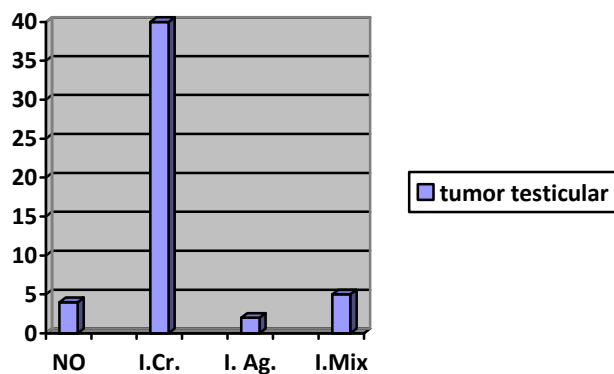
INFILTRADO INFLAMATORIO

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 16. Infiltrado Inflamatorio

<i>Infiltrado Inflamatorio. Tipo de Células</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
AUSENTE/NO	4	7,8
LINFOCITOS	10	19,6
INFILTRADO AGUDO	2	3,9
LINFOCITOS+CELULAS PLASMATICAS	22	43,1
LINFOCITOS+MACROFAGOS	2	3,9
LINFOCITOS+INFILTRADO AGUDO	3	5,9
LINFOS+CELS. PLASMATICAS+MACROFAGOS	6	11,8
LINFOS+ C. PLASMA+MACRO+I.AGUDA	2	3,9

Gráfico 16. Infiltrado Inflamatorio



El más frecuente es el crónico con un 78%, dentro de él, el que está a base de Linfocitos y Células Plasmáticas con un 43% (22 casos). Sólo 2 (3,9%) pacientes presentan un infiltrado exclusivamente agudo.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 70% de esta Población de TCG presentan una Infiltrado Inflamatorio Crónico con una $p < 0,05$.

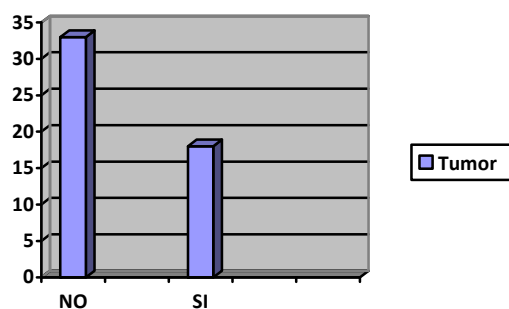
CALCIFICACIONES

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 17. Calcificaciones

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
No Calcificaciones	33	64,7
Si Calcificaciones	18	35,3

Gráfico 17. Calcificaciones



Las *Calcificaciones* están presentes en 33 tumores (64,75%).

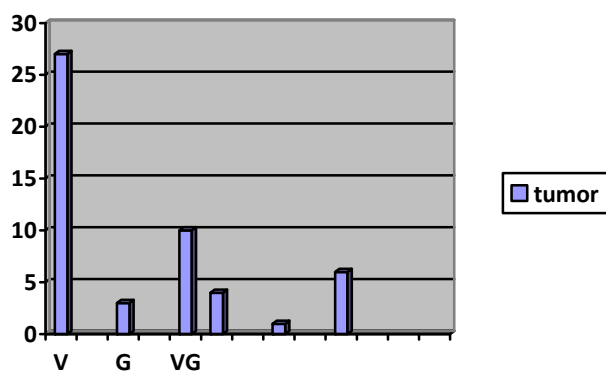
CITOPLASMA

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 18. Morfología del Citoplasma

<i>Morfología del Citoplasma</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
VACUOLADO	27	52,9
GRANULAR	3	5,9
VACUOLADO+GRANULAR	10	19,6
VACUOLADO+GLOBULOS HIALINOS	4	7,8
GRANULAR+GLOBULOS HIALINOS	1	2
VACUOLADO+GRANULAR+GLOB. HIALINOS	6	11,8

Gráfico 18. Morfología del Citoplasma



El aspecto microscópico del Citoplasma más frecuente es el Vacuolado exclusivamente con un 52,9% (27 casos) que si lo sumamos a los que se presentan además con otras formas: Granular o con Globulos Hialinos constituirían 41 tumores, lo que es el 80,3% del total.

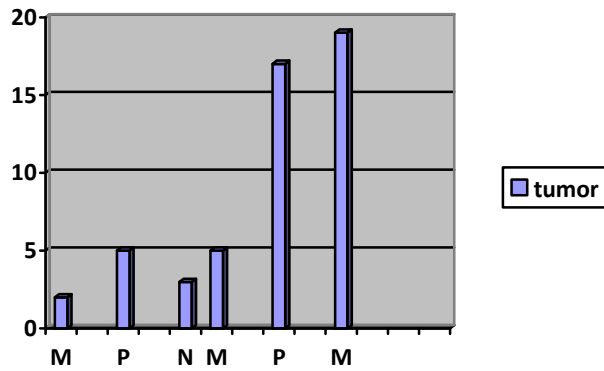
NÚCLEO

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 19. Morfología del Núcleo

<i>Morfología del Núcleo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
MULTINUCLEACION	2	3,9
PLEOMORFICOS	5	9,8
NUCLEOLO	3	5,9
MULTINUCLEACION+PLEOMORFICO	5	9,8
PLEOMORFICOS+NUCLEOLOS	17	33,3
MULTINUC+PLEOMORFICO+NUCLEOLO	19	37,3

Gráfico 19. Morfología del Núcleo



En la morfología del Núcleo destacan los Pleomórficos con Nucleolos en 19 casos (37,3%) y los Vacuolados con Nucleolo en 17 (33,3%).

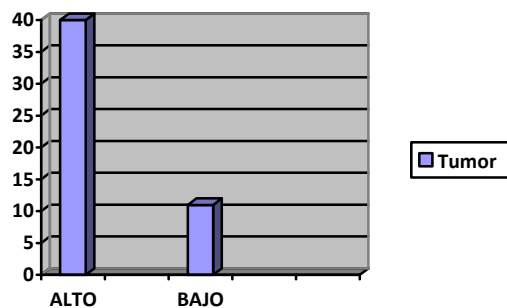
GRADO

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 20. Grado

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
Alto Grado	40	78,4
Bajo Grado	11	21,6

Gráfico 20. Grado



En relación al grado el 78,4% (40 tumores) presenta Alto.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 74% de esta Población de TCG presentan Alto Grado con una $p < 0,05$.

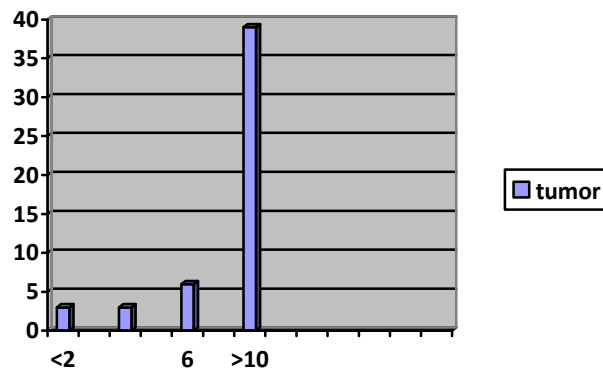
MITOSIS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 21. Número de Mitosis

<i>Número de Mitosis</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
<2x10 c.g.a	3	5,9
3-5x10c.g.a.	3	5,9
6-10x10 c.g.a.	6	11,8
>10x10 c.g.a.	39	76,5

Gráfico 21. Número de Mitosis



El 76,5% (39 tumores) presentan *Mitosis* superiores a >10x10 c.g.a.

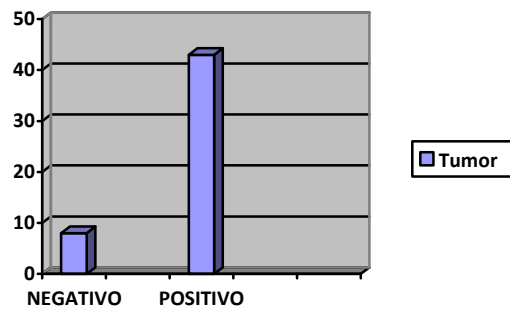
PAS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 22. PAS

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
PAS-	8	15,7
PAS+	43	84,3

Gráfico22.PAS



Son *PAS* positivo 43 casos que constituye un 84,3%.

2.3.RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCOPICO DEL TEJIDO PERITUMORAL (TP)

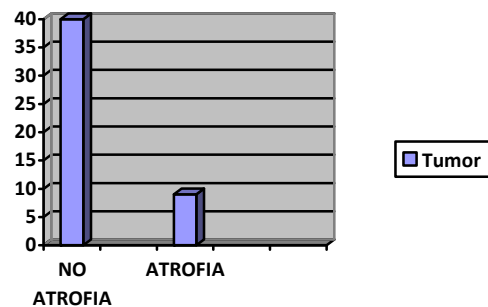
ATROFIA

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 23. Atrofia en TP

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
NO	40	81,6
SI	9	18,4

Gráfico23. Atrofia en TP



Presentaba sólo el 18,4% (9 casos).

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 72% de esta Población de TCG no presentan Atrofia con una $p < 0,05$.

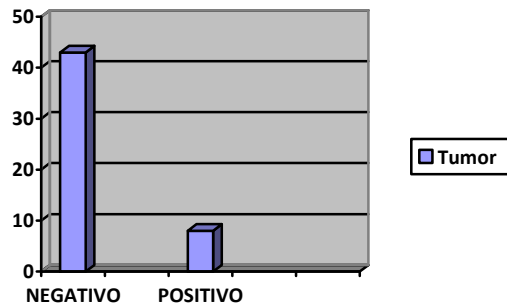
“ONLY SERTOLI CELLS”

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 24. Células “Solo Sertoli”

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
NO	46	93,9
SI	3	6,1

Gráfico24. Células “Solo Sertoli”



Presencia sólo en 3 de los 49, por tanto el 93,9% no tenía ese tipo de hallazgo.

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 80% de esta Población de TCG presentan Células “Sólo Sertoli” con una $p < 0,05$.

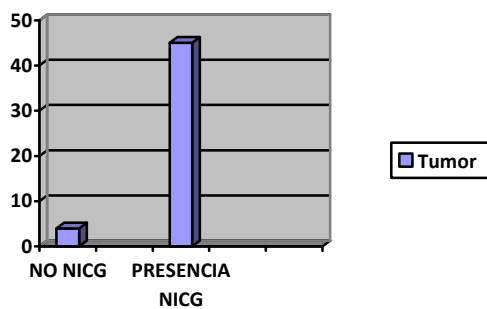
NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINALES (NICG)

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 25.NICG

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
NO	4	8,2
SI	45	91,8

Gráfico25.NICG



En 45 (91,8%) sobre 49 muestras de tejido peritumoral había Neoplasia Intratubular de células Germinales (NICG).

Mediante el Contraste de una Proporción podemos decir que más del 82% de esta Población de TCG presentan NICG con una $p < 0,05$.

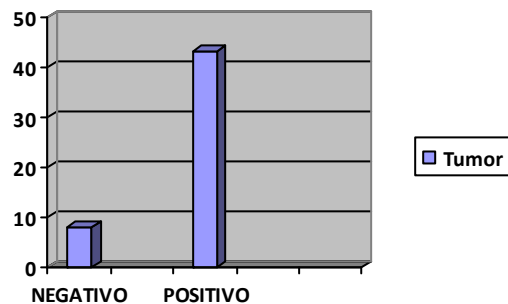
PAS

Los resultados obtenidos de la muestra son

Tabla 26. PAS

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
PAS -	7	14,3
PAS +	42	85,7

Gráfico26. .PAS



El 85,7% (42 casos) presentan PAS positivo.

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO EN TCG Y EN TP

Como *marcadores inmunohistoquímicos* se utilizaron: β HCG, α FP, C-kit, Ki-67, C-erb-B2, EGFR, AE1/AE3 en tejido tumoral y en tejido perilesional sano determinando su expresión, lo que significa que determinamos 14 variables, siete en TCG y siete en el TP.

β HCG

Tabla 27. Expresión de β HCG

β HCG	TCG		TP	
	Expresión	Frecuencia	%	Frecuencia
0	19	37,3	36	73,5
+	26	51	10	20,4
++	1	2	2	4,1
+++	5	9,8	1	2
Total	51	100	49	100

En los TCG se expresaba en el 62,7%, es decir en 32 tumores. En el TP resultaron sin expresión 36 casos (73,5%)

α FP

Tabla 28. Expresión de α FP

α FP	TCG		TP	
	Expresión	Frecuencia	%	Frecuencia
0	35	68,6	46	93,9
+	5	9,8	3	6,1
++	5	9,8	02	0
+++	6	11,8	0	0
Total	51	100	49	100

En los TCG era negativo en el 68,6%, lo que suponían 35 tumores y en el TP fueron negativos 46 (93,9%).

C-kit

Tabla 29. Expresión de C-Kit

C-Kit	TCG		TP	
	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
0	25	49	12	24,5
+	10	19,6	9	18,4
++	6	11,8	7	3,2
+++	10	19,6	21	42,9
<i>Total</i>	51	100	49	100

En los TCG no se expresaba en 49%. En el TP se expresó en alguno de sus tres grados en el 75,5%, es decir en 37 casos.

Ki-67

Tabla 30. Expresión de Ki-67

Ki-67	TCG		TP	
	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
0	2	3,9	7	14,3
+	11	21,6	13	26,5
++	18	35,3	13	26,5
+++	20	39,2	16	32,7
<i>Total</i>	51	100	49	100

En los TCG se expresaba en todos excepto en 2 en diferente porcentaje, lo que significaba que el 96,1% lo tenían positivo. En el TP El Ki-67 obtuvo positividad en 85,7 % del total de los estudiados, es decir 42 especímenes,

C-erb-B2

Tabla 31. Expresión de C-erb-B2

C-erb-B2	TCG		TP	
	<i>Expresión</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>	<i>Frecuencia</i>
0	38	74,5	38	77,6
+	10	19,6	9	18,4
++	2	3,9	1	2
+++	1	2	1	2
<i>Total</i>	51	100	49	100

En los TCG no se expresaba en el 74,5%,38 tumores. En el TP en 38 de 49 (77,6%) no se expresa

EFGR

Tabla 32. Expresión de EFGR

EFGR	TCG		TP	
	<i>Expresión</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>	<i>Frecuencia</i>
0	37	72,5	48	98
+	6	11,8	1	2
++	3	5,9	0	0
+++	5	9,8	0	0
<i>Total</i>	51	100	49	100

En los TCG era negativo en el 72,5%. En el TP sólo uno de las muestras de tejido peritumoral expresó

AE1/AE3

Tabla 33. Expresión de AE1/AE3

AE1/AE3	TCG		TP	
	<i>Expresión</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>	<i>Frecuencia</i>
0	25	49	12	24,5
+	10	19,6	9	18,45
++	6	11,8	7	3,2
+++	10	19,6	21	42,9
<i>Total</i>	51	100	49	100

En los TCG expresaba positividad en algún grado en el 58,8%, esto es en 30 tumores. En el TP el 69,4% (34 casos) expresa de uno u otro grado, lo que supone que en 15 casos (30,6%) no lo hace.

**4. AGRUPACIONES DE TUMORES DE CÉLULAS
GERMINALES (TCG) Y DEL TEJIDO
PERITUMORAL (TP)**

En el análisis de los datos se observa que los Tumores Mixtos son muchos y variados dentro del bajo número total que disponemos, ya que la prevalencia es muy baja. Dentro de los Puros, excepto el Seminoma que es más numeroso, el resto son escasos por lo que para realizar la Investigación decidimos realizar Agrupaciones.

Las Agrupaciones de TCG (y su correspondiente Agrupación del TP) las realizamos basándonos en: - número de casos-, en determinadas características que justificamos más adelante: - composición -, - procedencia -, - forma de crecimiento -, etc.) que pudiera identificar, expresándose, determinado Marcador.

Valoramos características macro y microscópicas de las Agrupaciones de TCG y del TP: Márgenes, Hemorragia, Necrosis macroscópica y microscópica, Apoptosis, Cuerpos Embrioides, Cuerpos de Schiller, Fibrosis, Grado, Atrofia, presencia de Células Sólo Sertoli y de NICG

Las Agrupaciones han sido:

Agrupación 1

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP, unos derivados del Sincitiotrofoblasto como los Seminomas que constituye el Grupo 1, otro que corresponde a los Tumores Mixtos que tienen componente Seminomatoso y/o Coriocarcinoma y Coriocacinoma Puro, que es el Grupo 2 y un ultimo Grupo 3 de Tumores Mixtos sin esos componentes o Puros ni del primero ni segundo grupo.

Valoramos la expresión del marcador βHCG en primer lugar ya que queremos analizar la expresión en tumores derivados del sincitiotrofoblasto. Analizamos la expresión del resto de marcadores: αFP , $C-kit$, $Ki-67$, $C-erb-B2$, $EFGR$, $AE1/AE3$.

Grupo 1: Seminoma Puros

Grupo 2: Tumores Mixtos Sin componente de Seminoma, Mixtos Sin componente de Coriocarcinoma + Tumores Puros No Seminomas y No Coriocarcinoma

Grupo 3: Tumores Mixtos Con Coriocarcinoma y/o Con componente Seminomatoso + Tumores Puros Coriocarcinoma

Agrupación 2

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP que por marcar séricamente alfafetoproteína pudiera hacerlo también inmunohistoquímicamente. Así dejamos un Grupo 1: Seminomas, por ser el más numeroso, un Grupo 2 que corresponde a aquellos que marcan alfafetoproteína en suero que corresponde a Tumores Mixtos de Seno Endodermico o Saco Vitelino que lo lleven y Tumores Puros de Saco Vitelino y un tercer grupo que no sea ni Seminoma ni Seno Endodermico ni mixtos con sus componentes ni Puros.

Se analiza la expresión del marcador αFP para ver si existiera relación con su detección elevada en suero y el resto de marcadores: βHCG , $C-kit$, $Ki-67$, $C-erb-B2$, $EFGR$, $AE1/AE3$

Grupo 1: Seminoma Puros

Grupo 2: Tumores Mixtos Con componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino + Tumor Puro Saco Vitelino

Grupo 3: Tumores Mixtos Sin Componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino y Tumores Puros No Seminomatosos + Tumores Puros No Saco Vitelino ni Seminoma.

Agrupación 3

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP. El $C-kit$ es un anticuerpo que podría detectar proteínas transmembrana específicas y ese tipo los posee los Tumores Seminomatosos Puros o Mixtos con dicho Componente y también pudiera hacerlo la Displasia y los NICG que se agrupan en un Grupo 1 y se hace otro con el resto. También se evalúa el resto de marcadores en esos grupos: βHCG , αFP , $Ki-67$, $C-erb-B2$, $EFGR$, $AE1/AE3$.

Grupo 1: Seminomas Puros + Tumores Mixtos Con componente de Seminomas + Displasia

Grupo 2: Resto de Tumores

Agrupación 4

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP. Los tumores con mayor índice de proliferación son los Seminomas, Carcinoma Embrionario y Seno Endodermico. Así, realizamos tres grupos, uno que corresponde al Grupo 1: Seminoma, otro Grupo 2: Tumores Mixtos con seminoma y/o con Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodermico o Puros de éstos dos últimos y por último otro grupo que es el Grupo 3 con el resto de tumores.

Valoramos inicialmente la expresión de *Ki-67* que es un marcador de proliferación celular al igual que el resto de marcadores: *βHCG*, *αFP*, *C-kit*, *C-erb-B2*, *EFGR*, *AE1/AE3*.

Grupo 1: Seminomas Puros

Grupo 2: Tumores Mixtos Con componente Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodermico + Tumores Puros Carcinoma Embrionario o Seno Endodermico

Grupo 3: Resto de Tumores

Agrupación 5

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP. Se quiere inicialmente valorar la presencia de la proteína HER2 con la expresión de *C-erb-B2* para valorar respuesta a futuro tratamiento con anticuerpo monoclonal específico. Así realizamos dos grupos: Grupo 1 Seminomatosos Puros o Mixtos y Grupo 2 el resto de Tumores.

Evaluamos el resto de marcadores: *βHCG*, *αFP*, *C-kit*, *Ki-67*, *EFGR*, *AE1/AE3*

Grupo 1: Seminomas + Tumores Mixos Con componente Seminomatoso

Grupo 2: Tumores Puros No Seminomas + Tumores Mixtos Sin componente Seminomatoso

Agrupación 6

Realizamos esta Agrupación para valorar y diferenciar grupos de tumor y su correspondiente TP. Queremos establecer dos Grupos de Tumores, por un lado el Grupo 1: que derivan del ectodermo y producen citoqueratinas como los Teratomas y Mixtos con componentes del mismo, y en otro Grupo 2 el resto. Las Citoqueratinas podrían ser detectadas por los marcadores *EFGR, AE1/AE3*.

También se estudia el resto de marcadores: *βHCG, AFP, C-kit, Ki-67, C-erb-B2*.

Grupo 1: Tumores Puros Teratomas (Maduros o Inmaduros) + Tumores Mixtos Con componentes Teratomatoso

Grupo 2: Resto de Tumores

4.1.RESULTADOS DEL ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS AGRUPACIONES DE LOS TCG

MÁRGENES

No se han encontrado relaciones significativas entre las Agrupaciones y los márgenes.

HEMORRAGIA

Aunque la gran mayoría de los Seminomas no la presenta (72%) no hemos encontrado relación significativa de la Hemorragia con las Agrupaciones.

Los Tumores del Seno endodérmico o Mixtos con componente del Saco Vitelino presentan un 73% de hemorragia. Hemos encontrado relación significativa entre la Hemorragia y la Agrupación 2.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 34. Hemorragia en Agrupación 2.

Hemorragia	AGRUPACION 2			<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	13	4	13	30
SI	5	11	5	21
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Hemorragia en esta Agrupación 2, está asociada al Grupo 2 que corresponde a los Tumores del Seno Endodérmico o Mixtos del Saco Vitelino con una $p < 0,011$

NECROSIS

Los Seminomas y los Tumores Mixtos con componente de Seminoma no presentan *Necrosis macroscópicamente* en un 73% y los No Seminomatosos sí un 66%,

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 35. Necrosis en Agrupación 3

Necrosis	AGRUPACION 3		<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	11	4	15
SI	12	24	36
<i>Total</i>	23	28	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de No Necrosis en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1 que corresponde a los Seminomas y los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma, y la de Necrosis al Grupo 2: Tumores No Seminomatosos con una $p < 0.09$

4.2.RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LAS AGRUPACIONES DE LOS TCG

NECROSIS MICROSCÓPICA

En los Seminomas se aprecia Necrosis Microscópica Focal en un 38% y no la hay en un 33%. En los Tumores no Seminomatosos y sin coriocarcinoma hay Necrosis Microscópica Extensa en el 79%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 36. Necrosis Microscópica en Agrupación 1

Necrosis Microscópica	AGRUPACION 1			<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	6	4	3	13
EXTENSA	5	19	6	30
FOCAL	7	1	0	8
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Necrosis Focal en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1 que corresponde a los Seminomas y los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma, y la de Necrosis Extensa en la Agrupación 1 al Grupo 2: Tumores Mixtos no Seminomatosos y Tumores Puros no Coriocarcinomas con una $p < 0.003$.

Los Tumores Mixtos con Componente del Saco Vitelino o Puros del mismo presenta una Necrosis microscópica en el 93% siendo el 86% Extensa.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 37. Necrosis Microscópica en Agrupación 2

Necrosis Microscópica	AGRUPACION 2			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	6	1	6	13
EXTENSA	5	13	12	30
FOCAL	7	1	0	8
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Necrosis Extensa en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componente del Saco Vitelino o Puros con una $p < 0.001$.

Los Tumores No Seminomatosos presenta *Necrosis Extensa* en un 82%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 38. Necrosis Microscópica en Agrupación 3.

Necrosis Microscópica	AGRUPACION 3		Total
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	9	4	13
EXTENSA	7	23	30
FOCAL	7	1	8
<i>Total</i>	23	28	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Necrosis Extensa en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: Tumores No Seminomatosos con una $p < 0.001$.

Los Tumores con alto índice de proliferación como son los Seminomas y los Carcinoma Embrionario y Seno Endodermico presentan *Necrosis*. Los Tumores Mixtos con Seminoma y/o con Carcinoma Embrionario y/o con Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos tienen *Necrosis Extensa* en el 85%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 39. Necrosis Microscópica en Agrupación 4

Necrosis Microscópica	AGRUPACION 4			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	6	3	4	13
EXTENSA	5	23	2	30
FOCAL	7	1	0	8
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Necrosis Extensa en la Agrupación 4 está asociada al Grupo 2: Grupo 2: Tumores Mixtos con Seminoma y/o con Carcinoma Embrionario y/o con Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos con una $p < 0.0001$.

APOPTOSIS

La *Apoptosis* está presente en el 100% de los Tumores Seminoma Puros y Mixtos con dicho componente y en el 100% de los Tumores mixtos con Componente del seno Endodérmico o Saco Vitelino puro en nuestra muestra.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 40. Apoptosis en Agrupación 3.

Apoptosis	AGRUPACION 3		Total
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	0	5	5
SI	23	23	46
<i>Total</i>	23	28	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Apoptosis en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: Tumores Seminomas Puros y Mixtos con Componente de Seminoma y Displasia con una $p < 0.03$.

El 27% de los Tumores Mixtos sin Componente de Seno Endodermico o Seminomatosos o Puros No Seminomatosos ni Seno Endodermico tienen.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 41. Apoptosis en Agrupación 2.

Apoptosis	AGRUPACION 2			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	0	0	5	5
SI	18	15	13	21
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Apoptosis en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 3: Tumores Mixtos sin Componente de Seno Endodermico o Seminomatosos o Puros No Seminomatosos ni Seno con una $p < 0.006$.

CUERPOS EMBRIOIDES

Los Seminomas no presentan *Cuerpos Embrioides* en el 100%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 42. Cuerpos Embrioides en Agrupación 1

Cuerpos Embrioides	AGRUPACION 1			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	18	15	8	41
SI	05	9	1	10
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir la no aparición de Cuerpos Embrioides en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas con una $p < 0.006$.

En los Tumores No Seminomatosos los hay en 32%

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 43. Cuerpos Embrioides en Agrupación 3

Cuerpos Embrioides	AGRUPACION 3		Total
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	22	19	41
SI	1	9	10
<i>Total</i>	23	28	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Cuerpos Embrioides en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: Tumores No Seminomatosos con una $p < 0.01$

En los Tumores con componente del Seno Endodérmico o Tumores del Saco Vitelino la presencia de Cuerpos embrioides es del 53%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 44. Cuerpos Embrioides en Agrupación 2.

Cuerpos Embrioides	AGRUPACION 2			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	18	7	16	41
SI	0	8	2	10
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Cuerpos Embrioides en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores con componente del Seno Endodérmico o Tumores del Saco Vitelino con una $p < 0.001$.

CUERPOS DE SCHILLER

En ningún Seminoma Puro aparecen *Cuerpos de Schiller*. Aparecen en un 87 % los Tumores Mixtos del Seno Endodérmicos o Puros del Saco Vitelino.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 45. Cuerpos de Schiller en Agrupación 2

Cuerpos de Schiller	AGRUPACION 2			<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	18	6	7	31
SI	0	18	2	20
<i>Total</i>	18	15	18	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Cuerpos de Schiller en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 1: Seminomas Puros y la aparición de los mismos en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores con componente del Seno Endodérmico o Tumores del Saco Vitelino con una $p < 0.001$

Los Tumores mixtos con componente de Teratoma o Teratomas Puros los presentan en nuestra muestra en el 60% y los que no los son están ausentes en un 69%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 46. Cuerpo de Schiller en Agrupación 6.

Cuerpos Schiller	AGRUPACION 6		<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	6	25	31
SI	9	11	20
<i>Total</i>	23	28	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición

de Cuerpos de Schiller en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 1: Teratomas y Tumores Mixtos con componente de Teratomas y que la No aparición de los mismos en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 2: Tumores No Teratomatoso con una $p < 0.05$

FIBROSIS

Se aprecia que en nuestra muestra en todos los Grupos de Tumores dentro de todas las Agrupaciones hay mayor *Fibrosis*. En los Seminomas puros un 88%, en los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino un 93 %. En los Teratomas Puros o Mixtos con componente de Teratoma alcanzar un 80%. En ninguno de los Grupos de las distintas Agrupaciones se alcanza significación estadística.

GRADO

El *Grado* en todos los Grupos de Tumores y todas las Agrupaciones es mayor el de alto grado. Un 72% de los Seminomas Puros y un 80% de los que tienen Seno Endodermico en su composición o los son Puros de éste último. En ninguno de esos Grupos dentro de las Agrupaciones se alcanza la significación estadística.

Los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puros de estos dos últimos presentan alto grado en un 88%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 47. Grado en Agrupación 4

Grado	AGRUPACION 4			Total
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
NO	13	25	2	39
SI	5	2	4	11
<i>Total</i>	18	27	6	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de Alto Grado en la Agrupación 4 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con

componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puros de estos dos últimos con una $p < 0,02$.

Los Tumores con Teratoma o Mixtos con componente del mismo la presenta en un 67 % y en los restantes sea cual sea su composición excepto la anterior en un 80,5%. En ninguno de esos Grupos se alcanza la significación estadística.

4.3.RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCOPICO DE LAS AGRUPACIONES DEL TEJIDO PERITUMORAL (TP)

ATROFIA

La *Atrofia* la presentan un 35% del TP de los Tumores Seminomas Puros o Mixtos con componente de Seminoma. En el 96% del TP de los Tumores No Seminomatosos no la hay en nuestra muestra.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 48. Atrofia en Agrupación 3

Atrofia	AGRUPACION 3		<i>Total</i>
	Grupo 1	Grupo 2	
NO	15	25	40
SI	8	1	9
<i>Total</i>	23	26	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la aparición de *Atrofia* en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: TP de los Tumores Seminomas Puros o Mixtos con componente de Seminoma y la no aparición de *Necrosis* en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: TP de los Tumores No Seminomatosos con una $p < 0,005$

El 86% del TP de los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodérmico o Puro de él no hay *Atrofia* y tampoco en el 93% de los TP de los Teratomas o Mixtos con dicho componente.

“ONLY SERTOLI CELLS” (SOLO CÉLULAS DE SERTOLI)

La presencia de *Celulas Sólo Sertoli* es muy escasa en todos los TP de los Grupos de Tumores.

NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINALES

En todos los Tumores y en los grupos establecidos la presencia de *NICG* está en al menos en un 90% pero no tiene en ningún Grupo de TP de los TCG de las Agrupaciones nivel significativo.

4.4.RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO POR MARCADOR EN LAS AGRUPACIONES DE TCG Y TP

Vamos a analizar los resultados obtenidos por los diferentes marcadores aplicados: β HCG, α FP, C-kit, Ki-67, C-erb-B2, EFGR, AE1/AE3 en las Agrupaciones que hemos realizado y por los Grupos de Tumores utilizados dentro de las mismas, tanto en ellos como en el Tejido Peritumoral.

4.4.1. RESULTADOS DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LAS AGRUPACIONES DE TCG

β HCG

Los Seminomas Puros expresan β HCG en grado + en el 78%. Los Tumores Mixtos No Seminomatosos y sin componente de Coriocarcinoma o Puros de ninguno de estos dos componentes no lo hacen en un 54%. Los Tumores Mixtos con componente Seminomatoso o de Coriocarcinoma o Puro de éste último expresan grado +++ en el 44%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 49. β HCG en Agrupación 1

AGRUPA 1	β HCG				Total
	-	+	++	+++	
Grupo 1	4	14	0	0	18
Grupo 2	13	9	1	1	24
Grupo 3	2	3	0	4	9
<i>Total</i>	19	26	1	5	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión + de β HCG en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas Puros y no expresión - en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos No Seminomatoso y sin componente de Coriocarcinoma o Puros de ninguno de estos dos componentes no lo haga y que la expresión +++ en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 3: Tumores Mixtos con componente Seminomatoso o de Coriocarcinoma o con una $p < 0,001$.

Los Tumores Mixtos sin componente de Saco Vitelino y en Puros no Seminoma ni Seno Endodérmico no se expresan en un 61%. Al realizar una agrupación por expresión o no expresión se objetiva que 73% de los Tumores Mixtos con componente de Saco Vitelino lo presentan, tuvieran o no también componente de Seminoma.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguientes Tablas

Tabla 50. β HCG en Agrupación 2.

AGRUPA 2	β HCG				Total
	-	+	++	+++	
Grupo 1	4	14	0	0	18
Grupo 2	4	8	1	2	15
Grupo 3	11	4	0	3	18
<i>Total</i>	19	26	1	5	51

Tabla 51. β HCG agrupado en Agrupación 2.

AGRUPA 2	β HCG		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	4	14	18
Grupo 2	4	11	15
Grupo 3	11	7	18
<i>Total</i>	19	32	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión - de β HCG en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 3: Tumores Mixtos sin componente de Saco Vitelino y en Puros no Seminoma ni Seno Endodérmico con una $p < 0,03$.

α FP

Reagrupando los que expresan en un solo Grupo y los que no en otro y estudiando los Grupos de las Agupaciones podemos confirmar que en todos los Seminomas puros no se expresa este marcador. En la mitad de los Tumores Mixtos sin Componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni Puros de cualquiera de ellos.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 52. α FP agrupado en Agrupación 1.

AGRUPA 1	α FP		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	18	0	18
Grupo 2	12	12	24
Grupo 3	5	4	9
<i>Total</i>	35	16	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión - de α FP en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas Puros y la expresión agrupada + de α FP en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos No Seminomatomatosos y sin componente de Coriocarcinoma o Puros con una $p < 0,002$.

El 87% de los Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino expresan y un 40% con +++ con $p < 0,0001$

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 53. α FP agrupado en Agrupación 2.

AGRUPA 2	α FP		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	18	0	18
Grupo 2	2	13	15
Grupo 3	15	3	18
<i>Total</i>	35	16	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la y la expresión agrupada+ de α FP en la Agrupación 2 (con marcador α FP agrupado) está asociado al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino con una $p < 0,0001$.

En el 95% de los Tumores mixtos con componente de Seminoma y Seminomas puros y Displasia no se expresa, En el resto de tumores un 53% son positivos

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 54. α FP agrupado en Agrupación 3.

AGRUPA 3	α FP		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	22	1	23
Grupo 2	13	15	28
<i>Total</i>	35	16	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión - de α FP en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: Tumores mixtos con componente de Seminoma y Seminomas puros y que la expresión de la agrupada + de α FP en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: Tumores No Seminomatoso con una $p < 0,0001$.

C-KIT

El 83% de los Tumores Mixtos sin componentes de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni los Puros de esos dos tipos no expresan C-kit. Los Seminomas Puros expresan +++ el 39% y es significativo con $p < 0,0001$.

Si agrupamos por expresión, lo que no y los que sí, vemos que el 89% los Seminomas expresan el marcador. Los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni los Puros de ellos son negativos en un 83%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 55. C-Kit agrupado en Agrupación 1.

AGRUPA 1	C-kit		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	2	16	18
Grupo 2	20	4	24
Grupo 3	3	6	9
<i>Total</i>	25	26	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de C-Kit en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas y que la expresión – de C-kit en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni los Puros de ellos con una $p < 0,0001$.

En los Tumores Mixtos con Componentes del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino el C-kit no se expresa en el 80 %.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 56. C-Kit agrupado en Agrupación 2

AGRUPA 2	C-kit		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	2	16	18
Grupo 2	12	3	15
Grupo 3	11	7	18
<i>Total</i>	25	26	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión – de C-Kit en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componentes del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino con una $p < 0,0001$

Agrupando todos los Seminomas y los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y Displasia el marcador se expresan en el 91%. Los Tumores Mixtos no Seminomatosos o Puros no Seminoma no lo hacen en el 82%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 57. C-Kit agrupado en Agrupación 3

AGRUPA 3	C-kit		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	2	21	23
Grupo 2	23	5	28
<i>Total</i>	25	26	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de C-Kit en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: Seminomas y los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y Displasia y que la no expresión – de C-Kit en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos no Seminomatosos o Puros no Seminoma con una $p < 0,0001$.

El 70% de los Tumores Mixtos con Componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puro de estos dos últimos no expresan C-kit tanto agrupados por expresión exclusivamente o por grados de expresión.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 58. C-Kit agrupado en Agrupación 4.

AGRUPA 4	C-kit		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	2	16	18
Grupo 2	19	8	27
Grupo 3	4	2	6
<i>Total</i>	25	26	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión – de C-Kit en la Agrupación 4 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puro de estos dos últimos con una $p < 0,0001$.

El 66% los Teratoma o Tumores Mixtos con componente Teratomatoso no expresan C-kit pero no es significativo

Ki-67

En los Seminoma Puros el 89 % presentan expresión de Ki-67.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 59. Ki-67 agrupado en Agrupación 1

AGRUPA 1	Ki-67		Total
	-	Agrupación +	
Grupo 1	2	16	18
Grupo 2	0	24	24
Grupo 3	0	9	9
Total	2	49	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de Ki-67 en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminoma Puros con una $p < 0,01$

En los Tumores Seminomatosos Puros o Mixtos y Displasia expresan Ki-67 en un 91 % y lo hacen en el 100% de los no Seminomatoso aunque no es significativo en ninguno de los dos Grupos

C-erb-B2

Todos los Seminomas Puros menos uno no expresan C-erb-B2 lo que constituye un 94%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 60. C-erb-B2 agrupado en Agrupación 1

AGRUPA 1	C-erb-B2		Total
	-	Agrupación +	
Grupo 1	17	1	18
Grupo 2	16	8	24
Grupo 3	5	4	9
Total	38	13	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión – de C-erb-B2 en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminoma Puro con una $p < 0,04$.

Los Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros de Saco Vitelino presentan positividad en un 60%

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 61. C-erb-B2 agrupado en Agrupación 2

AGRUPA 2	C-erb-B2		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	17	1	18
Grupo 2	6	9	15
Grupo 3	15	3	18
<i>Total</i>	38	13	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de C-erb-B2 en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros de Saco Vitelino con una $p < 0,001$.

Los Tumores Mixtos Seminomatoso o Seminomas Puros o Displasia no expresan C-erb-B2 en un 91%. Los Tumores No seminomatosos lo hacen en un 39%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 62. C-erb-B2 agrupado en Agrupación 3.

AGRUPA 3	C-erb-B2		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	21	2	23
Grupo 2	17	11	28
<i>Total</i>	38	13	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no

expresión – de C-erb-B2 en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: Tumores Mixtos Seminomatoso o Seminomas Puros o Displasia y la expresión agrupada + de C-erb-B2 en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 2: Los Tumores No seminomatosos con una $p < 0,01$.

Los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endoermico o Puros de estos dos últimos expresan en un 37%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 63. C-erb-B2 agrupado en Agrupación 4

AGRUPA 4	C-erb-B2		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	17	1	18
Grupo 2	17	10	27
Grupo 3	4	2	6
<i>Total</i>	38	13	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de C-erb-B2 en la Agrupación 4 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endoermico o Puros con una $p < 0,05$.

El 77% del los Tumores no Teratomatosos no expresan C-erb-B2 y el 66 % de los Teratomas tampoco pero no es significativo.

EFGR

En nuestra muestra los Seminomas no expresan un 94%. El 78% de los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o de Coriocarcinoma y éste último Puro expresan EFGR.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 64. EFGR agrupado en Agrupación 1

AGRUPA 1	EFGR		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	17	1	18
Grupo 2	18	6	24
Grupo 3	2	7	9
<i>Total</i>	38	13	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión – de EFGR en la Agrupación 1 está asociado al Grupo 1: Seminomas no expresan y que la expresión agrupada + en la Agrupación 1 está asociada en el Grupo 3: Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o de Coriocarcinoma con una $p < 0,0001$.

El 44% de los Tumores Mixtos sin componente de Seno Endodérmico + Puros no Seminoma ni Seno Endodermico lo expresan.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 65. EFGR agrupado en Agrupación 2

AGRUPA 2	EFGR		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	17	1	18
Grupo 2	10	5	15
Grupo 3	10	8	18
<i>Total</i>	37	14	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de EFGR en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 3: Tumores Mixtos sin componente de Seno Endodérmico + Puros no Seminoma ni Seno Endodermico con una $p < 0,02$.

En el 53% de los Teratomas Puros o Mixtos hay positividad a la EFGR. Sin embargo el 83% de los No Teratomas no lo expresan

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 66. EFGR agrupado en Agrupación 6.

AGRUPA 6	EFGR		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	7	8	15
Grupo 2	30	6	36
<i>Total</i>	37	14	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de EFGR en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 1: Teratomas Puros o Mixtos y que la no expresión – en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 2: Tumores No Teratomas con una $p < 0,008$.

AE1/AE3

En el 89% de los Seminomas Puros no se han expresado. En los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcioma Embrionario y/o Saco Vitelino y los Puros de estos dos últimos se expresa en el 92%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 67. AE1/AE3 agrupado en Agrupación 1

AGRUPA 1	AE1/AE3		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	16	2	18
Grupo 2	2	22	24
Grupo 3	3	6	9
<i>Total</i>	21	30	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión – de la AE1/AE3 en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas Puros y que la expresión agrupada + en la Agrupación 1 está asociada

al Grupo 2: Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcioma Embrionario y/o Saco Vitelino y los Puros de estos dos últimos con una $p < 0,0001$.

En el 100% de los Tumores Mixtos con Componente del Seno Endodémico o Saco Vitelino Puro se expresa.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 68. AE1/AE3 agrupado en Agrupación 2

AGRUPA 2	AE1/AE3		Total
	-	Agrupación +	
Grupo 1	16	2	18
Grupo 2	0	15	15
Grupo 3	5	13	18
<i>Total</i>	21	30	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de AE1/AE3 en la Agrupación 2 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con Componente del Seno Endodémico o Saco Vitelino Puro con una $p < 0,0001$.

Los Tumores Seminomatosos Puros o Mixtos con algún componente de Seminoma o Displasia no presentan positividad en un 83% a AE1/AE3. Los Tumores No Seminomatosos expresan en el 93%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 69. AE1/AE3 agrupado en Agrupación 3

AGRUPA 3	AE1/AE3		Total
	-	Agrupación +	
Grupo 1	19	4	23
Grupo 2	2	26	28
<i>Total</i>	21	30	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la no expresión - de AE1/AE3 en la Agrupación 3 está asociada al Grupo 1: Tumores

Seminomatosos Puros o Mixtos con algún componente de Seminoma o Displasia y que la expresión agrupada + de AE1/AE3 no expresen y en el Grupo 2: Tumores No Seminomatosos con una $p < 0,0001$.

Los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos lo expresan en un 93%.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 70. AE1/AE3 agrupado en Agrupación 4

AGRUPA 4	AE1/AE3		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	16	2	18
Grupo 2	2	25	27
Grupo 3	3	3	6
<i>Total</i>	21	30	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + en la Agrupación 4 está asociada al Grupo 2: Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos con una $p < 0,0001$.

Los Tumores con componente de Teratoma o Puros expresan en un 87% AE1/AE3. Un 53% de Los Tumores No Teratomas no expresan este marcador.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 71. AE1/AE3 agrupado en Agrupación 6

AGRUPA 6	AE1/AE3		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	2	13	15
Grupo 2	19	17	36
<i>Total</i>	21	30	51

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de AE1/AE3 en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 1: Tumores con componente de Teratoma o Puros y que no exprese – en la Agrupación 6 está asociada al Grupo 2: Tumores No Teratomas con una $p < 0,009$.

4.4.2. RESULTADOS DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LAS AGRUPACIONES DEL TP DE LOS TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES

βHCG

El Tejido Peritumoral (TP) de los Seminomas no expresa βHCG en el 72%, ni en el 86% del TP de los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma y Puros no Seminomas ni Coriocarcinomas pero no es significativo.

En el TP de los Tumores Mixtos con componente de Coriocarcinoma y/o componente Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro *βHCG se expresa en un 55%*.

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 72. βHCG agrupado en TP de Agrupación 1

AGRUPA 1	<i>βHCG</i>		<i>Total</i>
	-	Agrupada +	
Grupo 1	13	5	18
Grupo 2	19	3	22
Grupo 3	4	5	9
<i>Total</i>	36	13	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada + de βHCG en TP en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 3: Tumores Mixtos con componente de Coriocarcinoma y/o componente Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro con una $p < 0,05$.

En el TP de los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino puro el 79% no lo expresa sin tener significación.

En nuestra muestra en el TP de los Tumores no Seminomatosos solo el 19% expresan βHCG y en el TP del conjunto de los Tumores Seminomatosos, Puros o Mixtos el 35% sin llegar a ser significativo.

En el TP de los Tumores no Teratomas no se expresa en el 77%, mientras que sí aparece en el TP de los Teratomas en un 36%., pero no es significativo

αFP

En ningún TP de los Seminomas Puros ni de los Tumores Mixtos con componente Seminomatoso aparece positividad a α FP y solo el 9% de los Tumores Mixtos sin Componentes de Seminoma, sin Coriocarcinoma y Puros no Seminomas y no Coriocarcinomas.

En el TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodérmico o los del Saco Vitelino la expresión es del 14%.

En el TP de los Tumores No seminomatoso solo un 12% expresan el marcador aunque no tiene significación. En el TP de los Tumores Mixtos con Componente Seminomatoso y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodérmico o puros de estos dos últimos solo lo expresan el 8%.

En el 93% del TP de los Teratomas no se expresa y en el 5% de los No Teratomatosos sí.

En todos los casos, la expresión o no de α FP en el TP de los TCG no alcanza significación.

C-kit

En el 78% del TP de los Seminomas Puros se expresa C-kit. El 89% del TP de los Tumores Mixtos con Coriocarcinoma y/o componentes Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro expresa C-kit.

En el TP de los Tumores Mixtos de Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino lo expresa en un 71%.

En el TP de los Tumores No Seminomatosos se expresa C-kit en el 69% y en el de los Tumores Seminomatosos, Mixtos o Puros, el 83%. En el 86% del TP de los Teratomas Mixtos o Puros se expresa y en un 71% de los No Teratomas. En todos los casos de nuestra muestra, la expresión o no del C-Kit en el TP de los TCG no alcanza significación.

Ki-67

En el TP de los Seminomas Puros el 78% expresan Ki-67 y en el 100% de lo Tumores Mixtos con Coriocarcinoma y/o con Seminoma o Coriocarcinoma Puro.

Un 86% del TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino y un 94% de los Tumores Mixtos sin Saco Vitelino o Puros No Seminoma ni Saco Vitelino.

En el 83% del TP de los Tumores Mixtos o Puros con Seminoma el Ki 67 es positivo y en el 88 % de los no Seminomatosos.

En todos los TP de los Teratomas puros o Mixtos con Teratoma es positivo. En el 80% del TP de los No Teratomas también se presenta. En todos los casos, la expresión o no del Ki-67 en el TP de los TCG no alcanza significación.

C-erb-B2

Solo en el 11% hay expresión en el TP de los Seminomas Puros a C-erb-B2. En el 72% del TP de los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni Coriocarcinoma ni Puro de estos dos hay positividad a dicho marcador.

El 35% del TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodermico o Puros del Saco Vitelino expresan y el 76% de los Tumores Mixtos sin componentes de Seno Endodérmico ni Puros No Seminomatosos ni Saco Vitelino no lo hacen.

El 87% del TP de los Tumores Seminomatosos no presentan positividad y solo el 31% de los No Semitomatosos si lo hacen.

La expresión en el TP de los Tumores con Teratoma o Puros es del 21%, mientras en los No Teratomatosos es del 23%.

En todos los casos, la expresión o no del C-erb-B2 en el TP de los TCG no alcanza significación.

EFGR

En el 100% del TP de los Seminomas Puros no se expresa, ni tampoco en ninguno del TP de los Tumores Mixtos sin Componentes de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni Puros de Seminoma ni coriocarcinoma.

Solo se presenta en un solo caso del grupo de los Mixtos con Coriocarcinoma y/o con Componente Seminomatoso o Coriocarcinoma puro. El único positivo es un Mixto Seminomatoso con componente Teratomatoso. En todo caso sin significación.

AE1/AE3

El 50% del TP de los Seminomas Puros no expresa AE1/AE3,

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 73. AE1/AE3 agrupado en TP de Agrupación 1

AGRUPA 1	AE1/AE3		Total
	-	Agrupada +	
Grupo 1	9	9	18
Grupo 2	5	17	22
Grupo 3	1	8	9
<i>Total</i>	15	34	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que la expresión agrupada de AE1/AE3 en TP en la Agrupación 1 está asociada al Grupo 1: Seminomas con una $p < 0,05$.

El 77% del TP de los Tumores Mixos sin Componentes de Seminoma ni Coriocarcinoma y Puros no Seminoma y no Coriocarcinoma expresan y el 89% de los Mixtos con Coriocarcinoma y/o componente Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro también sin significación.

En el TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodermico o Puros del Saco Vitelino se expresa el 86% sin nivel de significación.

En el 81% del TP de los Tumores No Seminomatosos hay expresión, pero no es significativo.

En el 86% del TP de los Teratoma se expresa y en el 37% de los no Teratomas no lo hacen sin ser significativo.

4.4.3.RESULTADOS DE LA RELACION EN LA EXPRESION DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICO EN TCG Y TP

Buscando respuesta a uno de los Objetivos de este trabajo de Investigación se ha querido correlacionar el grado de expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos utilizados en TCG y en el TP por lo que hemos realizado Tablas de Contingencia entre el mismo marcador en Tumor y en Tejido Peritumoral.

βHCG

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 74. Relación en la expresión de βHCG agrupado en TP y TCG

<i>βHCG en TCG</i>	<i>βHCG en TP</i>		<i>Total</i>
	<i>-</i>	<i>Agrupada +</i>	
<i>-</i>	17	2	19
<i>Agrupada +</i>	19	11	30
<i>Total</i>	36	13	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que en los TCG que no expresan *βHCG* tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP con un nivel de significación $p < 0,04$.

A destacar que en TCG con marcador negativo, hay 2 que en el TP sí lo expresan.

αFP

Se aprecia que en aquellos Tumores de Células Germinales donde la *αFP* es negativo, 74% también lo es en el 72% en el tejido peritumoral. De los positivos de los TCG, 14, un 29%, solo 4 tienen positivo el TP, pero no alcanza nivel de significación

C-kit

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 75. Relación en la expresión de C-kit agrupado en TP y TCG

<i>C-kit en TCG</i>	<i>C-kit en TP</i>		<i>Total</i>
	-	Agrupación +	
-	10	13	23
Agrupación +	2	24	26
<i>Total</i>	12	37	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que en los TCG que no expresan C-kit tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP con un nivel de significación $p < 0,004$.

Ki-67

En los TCG el 96% fue positivo, mientras que en el TP era el 86%. Solo 1 de los TCG negativos fue positivo en el TP, pero no alcanza la significación estadística.

C-erb-B2

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 76. Relación en la expresión de C-erb-B2 agrupado en TP y TCG

<i>C-erb-B2 en TCG</i>	<i>C-erb-B2 en TP</i>		<i>Total</i>
	-	Agrupación +	
-	33	3	36
Agrupación +	5	8	13
<i>Total</i>	38	11	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que en los TCG

que no expresan C-erb-B2 tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP con un nivel de significación $p < 0,0001$.

EFGR

En los TCG el 76% fue negativo, mientras que en el TP era el 98%. Solo en uno de los TCG positivo también lo fue en el TP, pero no alcanza la significación estadística.

AE1/AE3

Los resultados correspondientes a la muestra se refleja en la siguiente Tabla

Tabla 77. Relación en la expresión de AE1/AE3 agrupado en TP y TCG

<i>AE1/AE3 en TCG</i>	<i>AE1/AE3 en TP</i>		<i>Total</i>
	-	Agrupación +	
-	11	10	21
Agrupación +	4	24	28
<i>Total</i>	15	34	49

Mediante análisis de esta Tabla de Contingencia con el Test de χ^2 de Pearson y complementado con análisis de residuos podemos decir que en los TCG que no expresan AE1/AE3 tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP con un nivel de significación $p < 0,004$.

VI. DISCUSSION

1.VARIABLES CLINICAS

. En España la **incidencia** de TCG se sitúa entre 0,5 y 1,9 casos por cada 100.000 habitantes/año. (16), si lo comparamos con nuestro trabajo esos datos son similares, ya que en 15 años de los recogidos en el Hospital General Universitario de Murcia se obtuvieron 35 tumores (2,3 tumores/año), aunque fueran válidos para el estudio 33; teniendo en cuenta la población que atendía era similar a la incidencia española. En el Área del Hospital General Universitario “Morales Meseguer” de Murcia en 8 años se presentaron 18 tumores, lo que suponía 2,25 tumores/año con cifras similares al país en cuanto a la incidencia.

Las neoplasias de células germinales predominan en jóvenes (35-45 años), con excepción del *seminoma espermatocítico* La **edad** de aparición está por encima de 16 años en nuestro trabajo, con un pico máximo entre 24-28 años. Hay un solo tumor que aparece a los 50 años. Es el tipo de cáncer más frecuente entre los 15 y 34 años y los picos de incidencia son similares a la literatura.(2).

En relación con la **lateralidad** no establece una dominancia siendo en éste estudio izquierdo el 54,9 % de los tumores estudiados. Respecto a la **localización** dentro del testículo más de la mitad del total ocupaban todo el Testículo. Hoy en día se podrían haber beneficiado con cirugía parcial un 11,8% porque había 6 pacientes cuyo tumor estaba en polo inferior exclusivamente y ocupaban menos de un 25% del total del testículo cumpliendo así los criterios establecidos para poder indicar la posibilidad de una Orquiectomía Parcial o Cirugía Testicular Conservadora (182)

2.VARIABLES ANATOMATOPATOLOGICAS

El 86,3% eran organoconfinados pT1 limitado al testículo y epidídimo sin invasión linfático/vascular; En los Seminomas el tumor podría invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginal, eso ocurre en menos del 10%. La literatura describe sin embargo que los Carcinomas Embrionarios son hasta en un 66% de los casos metastásicos al diagnóstico.

A pesar de seguir siendo imprescindible el estudio histopatológico de los TCG, tanto macroscópico de la pieza de extirpación quirúrgica y su clasificación histológica, se ha hecho imprescindible actualmente la inmunopatología, ya que gracias a la utilización de técnicas de inmunohistoquímica nos permite conocer características antigénicas tumorales que definen clones y subclones de células neoplásicas con distinto significado histogénico e incluso con distinto comportamiento clínico y biológico y nos permite ayudar a diferenciar los distintos tipos de TCG (9).

En nuestro trabajo de Investigación encontramos diferencias entre el diagnóstico inicial anatomopatológico con uso exclusivo de técnicas convencionales, hecho por diferentes patólogos, y el mismo tras la utilización de marcadores inmunohistoquímicos, y uno solo. ***Todas las muestras han sido visto por un sólo Patólogo.*** La diferencia afecta a pocos casos pero consigue diagnosticar más "fino". Podemos también afirmar que la variabilidad observada dependiente es relativamente baja.

La ***distribución de los TCG*** ha sido de 27 Tumores de Células Germinales Puros: 18 Seminomas (35,3%), 4 Carcinomas Embrionarios (7,8%), 3 (5,9%) Tumores del Saco Vitelino o Seno Endodérmico y 2 (3,9%) Teratomas Inmaduros. Entre 69 y 91% de los tumores de células germinales no seminomatosos son de tipo mixto aunque en este trabajo tenemos 24 que supone un 47,1%. El Carcinoma Embrionario es raro como neoplasia "pura" y supone el 2 % de los tumores de células germinales según las series, pero alcanza el 87 % como "componente" de neoplasias testiculares no seminomatosas. Está constituido por células epiteliales primitivas con un patrón sólido, papilar o glandular. El Teratoma Maduro constituye el 5-10 % de todas las neoplasias testiculares. El Coriocarcinoma también es excepcional, menos del 0.3 % de todos los tumores testiculares, pero se identifica como componente de un 16 % de los tumores mixtos de células germinales

La ***Prevalencia*** de los TCG es muy baja por lo que para realizar la Investigación decidimos realizar, como comentamos en el capítulo de Resultados,

Agrupaciones (tanto de los Tumores de Células Germinales como del Tejido Periférico), basándonos en determinadas características para conseguir potencia en nuestros resultados y conseguir datos para la Discusión. .

Los **Márgenes Macroscópicos** son en un 52,95 % bien delimitados coincidiendo la distribución de nuestra Serie sin poder establecer ninguna relación con el tipo de tumor con la expresada en la Literatura.

En nuestra muestra, 21 tumores (41,2%) presentan **Hemorragia Intratumoral**. La gran mayoría de los Seminomas no la presentan, un 72%. Los Tumores del Seno endodérmico o Mixtos con componente del Saco Vitelino presentan un 73% de hemorragia. Focos puntuales de hemorragia pueden reflejar la presencia de trofoblasto. Si se observan áreas hemorrágicas o quísticas, debe sospecharse un componente no seminomatoso.

En nuestra muestra el 66,7% del total de los tumores no **infiltran** estructuras anexas ni la albugínea testicular. 7(13,7%) infiltran la albugínea, y solo 4 (7,8%) infiltran la albugínea y el epidídimo y solo otros 4 (7,8%) afectan al cordón testicular.

La **Necrosis Macroscópica** en nuestra muestra, aparece en el 70,6% (36 tumores). Los Seminomas y los Tumores Mixtos con componente de Seminoma no presentan Necrosis macroscópicamente en un 73% y los No Seminomatosos sí en un 66%,

En los Seminomas se aprecia **Necrosis Microscópica Focal** en un 38%. En los Tumores no Seminomatosos y sin coriocarcinoma hay **Necrosis Microscópica Extensa** en el 79%. Los Tumores Mixtos con Componente del Saco Vitelino o Puros del mismo presenta una Necrosis microscópica en el 93% siendo el 86% Extensa. Los Tumores No Seminomatosos presenta **Necrosis Extensa** en un 82%.

En el 76,5% (39 tumores) presentan **Mitosis** superiores a $>10 \times 10$ c.ga. Los Tumores con alto índice de proliferación como son los Seminomas y los Carcinoma Embrionario y Seno Endodermico presentan Necrosis. Los Tumores Mixtos con Seminoma y/o con Carcinoma Embrionario y/o con Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos tienen Necrosis Extensa en el 85%.

La **Apoptosis** está presente en el 100% de los Tumores Seminoma Puros y Mixtos con dicho componente y en el 100% de los Tumores mixtos con Componente del seno Endodérmico o Saco Vitelino puro en nuestra muestra. El 27% de los Tumores Mixtos sin Componente de Seno Endodermico o Seminomatosos o Puros No Seminomatosos ni Seno Endodermico la tienen.

Los Seminomas no presentan **Cuerpos Embrioides** en el 100%. En los Tumores No Seminomatosos los hay en 32%. En los Tumores con componente del Seno Endodérmico o Tumores del Saco Vitelino la presencia de Cuerpos Embrioides es del 53%. (Imagen 23)

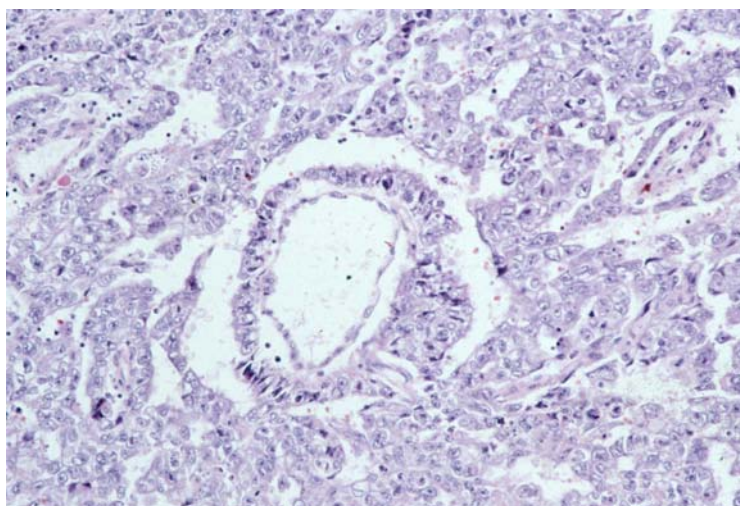


Imagen 23. Cuerpos Embrioides

En ningún Seminoma Puro aparecen **Cuerpos de Schiller**. Aparecen en un 87 % los Tumores Mixtos del Seno Endodérmicos o Puros del Saco Vitelino. Los Tumores mixtos con componente de Teratoma o Teratomas Puros los presentan en nuestra muestra en el 60% y los que no los son están ausentes en un 69%.

En todos los Grupos de Tumores hay mayor **Fibrosis**. En los Seminomas puros un 88%, en los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino un 93 %. En los Teratomas Puros o Mixtos con componente de Teratoma alcanzan un 80%, sin alcanzar significación estadística.

El **Grado** en todos los Grupos de Tumores es mayor el de alto grado. Un 72% de los Seminomas Puros y un 80% de los que tienen Seno Endodermico en su composición o los son Puros de éste último. Los Tumores con Teratoma o Mixtos con componente del mismo la presenta en un 67%. Los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puros de estos dos últimos presentan alto grado en un 88%.

Existe la teoría de que la **Atrofia** testicular puede ser el paso común, al que conducen los distintos factores etiológicos implicados en este tipo de tumor. La atrofia testicular reduciría la inhibición feedback que normalmente produce el

testículo sobre el hipotálamo, debido a la falta de producción de inhibina, originando un incremento de la liberación de gonadotropinas a nivel hipotalámico e hipofisario, particularmente la FSH. Esta hormona acelera la proliferación celular de las espermatogonias residuales y, por tanto, incrementa el riesgo de pérdida cromosómica a partir de células tetraploídicas inestables de una NICG. En nuestra serie la presentan un 35% del TP de los Tumores Seminomas Puros o Mixtos con componente de Seminoma sin embargo en el 96% del TP de los Tumores No Seminomatoso no la hay. Tampoco en el 86% del TP de los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodérmico o Puro de él y en el 93% de los TP de los Teratomas o Mixtos con dicho componente, por lo que nuestros resultados no apoyan inicialmente esa teoría.

En todos los TP de los TCGs y en los grupos establecidos es nuestra serie la presencia de **NICG** está en al menos en un 90%. Eso apoya la teoría de la histogénesis común. Con un menor tiempo para reparar la lesión del DNA causado por mutágenos ambientales, las gonadotropinas promueven, que estaban más elevadas en la Atrofia entre otras causas, la evolución clonal de estas células y la transformación de una NICG en un carcinoma testicular invasivo. Este hecho suele suceder en el 50-70% de los casos a los 5 años. La pérdida inicial de cromosomas (material genético) convertiría una NICG inestable (tetraploide, 4,2,N) en un seminoma invasivo (3,6,N) y las pérdidas sucesivas en un tumor no seminomatoso (2,8,N). De la célula germinal se desarrollaría la NICG, de ésta el seminoma, después tipos combinados. (*Imagen 24*)

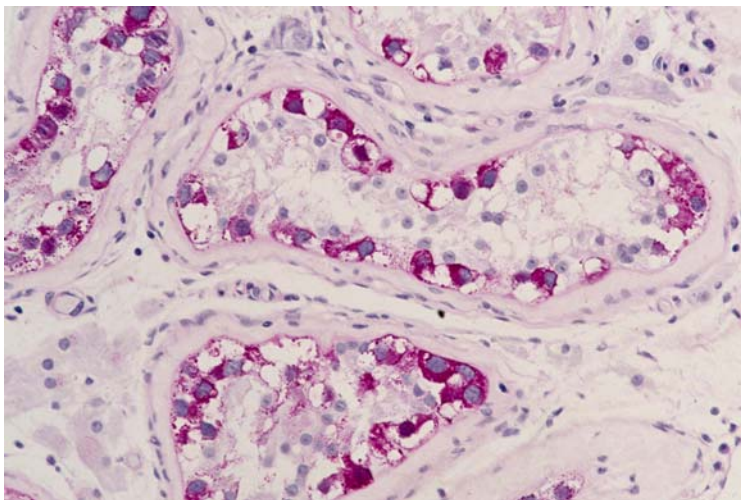


Imagen 24. NICG

Ulbright presenta la patogénesis de los tumores a partir de NICG que es el de mayor aceptación (23,24)

Los TCG son pluripotenciales mostrando una diferenciación a tejidos embrionarios y extraembrionarios (25). Histológicamente, y de manera sencilla se clasifican en *seminomas* y tumores *no seminomatosos*, derivando ambos de un estadio preinvasivo llamado neoplasia intratubular de células germinales (26). Este término se refiere a la lesión iniciamente descrita por Skakkebaek (27) como “carcinoma in situ” o formas “diferenciadas” de neoplasia intratubular de células germinales (NICG) y sirve como paradigma para el concepto de progresión desde neoplasia incipiente o preinvasiva.

Es claro que la NICG es la lesión precursora de todos los tipos de TCG, al menos aquellos derivados de las gónadas en la época postpuberal. Fueron un grupo de patólogos entre los que se encontraban los Dres. Scully, Juan Rosai, FKK Mostofi y Robert Lurman los que establecieron que la nomenclatura correcta era en ese tipo de lesión la de Neoplasia Intratubular de Células Germinales (NICG) inclasificado porque no procedía de diferenciación epitelial y estaba asociada a todos los tipos de TCG con la excepción de seminoma espermatocítico(23,26,27,28,50,51).

Pacientes con NICG desarrollan tumores de células germinales en un 50 % de casos en 5 años y se identifica NICG en pacientes con alto riesgo de tumores de células germinales (criptorquidia, etc). (*Imagen 25*)

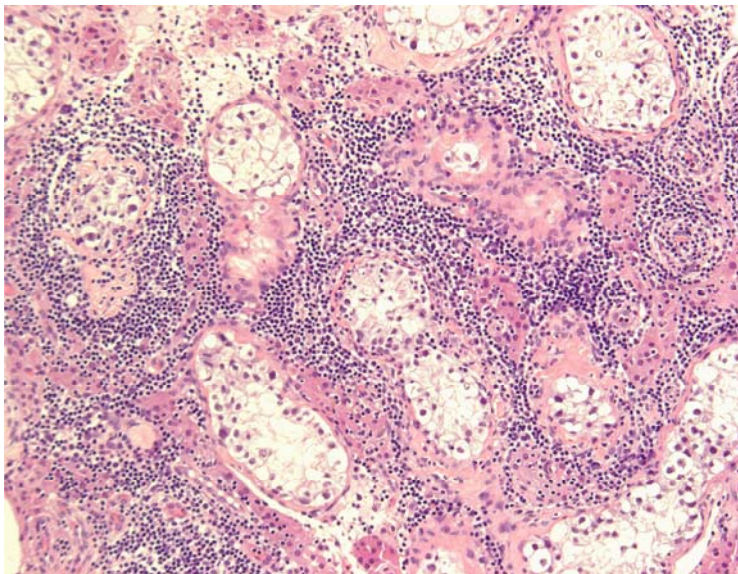


Imagen 25. NICG con componente inflamatorio

Recientes avances en la comprensión de la patología molecular ha permitido identificar nuevos marcadores que no son objeto de este trabajo de Investigación por ser posteriores al diseño del mismo: OCT3/4 y NANOG que tiene alta sensibilidad y especificidad para identificar NICG, así como Seminomas y Carcinoma Embrionario (183).

3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

βHCG

El anticuerpo marca a las células que contienen gonadotropina coriónica humana (67) y puede utilizarse para demostrar la presencia de elementos trofoblásticos, como en los tumores de células germinales (68). (*Imagen 26*)

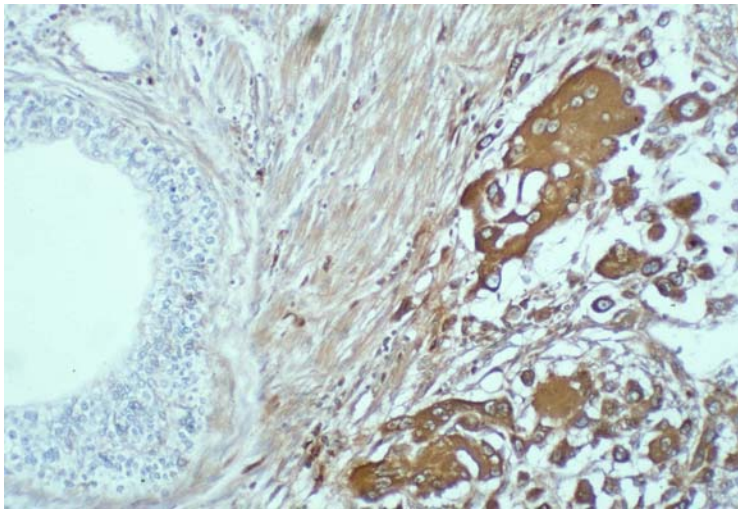


Imagen 26. βHCG en Sincitio y Trofoblasto

La HCG es una glicoproteína de 40 kDa compuesta de dos subunidades: α y β . La subunidad α es común a la HCG, LH, hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona estimulante del tiroides (TSH), mientras que la subunidad β es exclusiva de la HCG, aunque su secuencia de aminoácidos es parcialmente idéntica a la de la subunidad β de la LH (69,70). La β HCG es el marcador más importante de las células trofoblásticas gestacionales, estando presente en las células sincitiotrofoblásticas y células del trofoblasto intermedio, y *ausente en los citotrofoblasto*.

En los TCG se expresaba en el 62,7%, es decir en 32 tumores. En el TP resultaron sin expresión 36 casos (73,5%)

Los ***Seminomas Puros expresan βHCG en grado + en el 78%***. (*Imagen 27*)

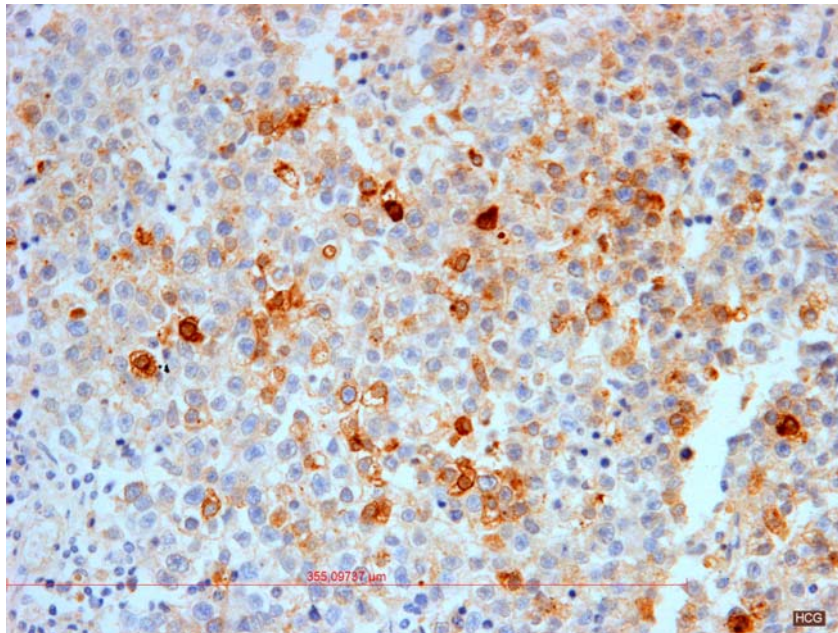


Imagen 27 . β HCG en Seminoma

Los Tumores Mixtos No Seminomatosos y sin componente de Coriocarcinoma o Puros de ninguno de estos dos componentes no lo hacen en un 54%. Los Tumores Mixtos con componente Seminomatoso o de Coriocarcinoma o Puro de éste último expresan grado +++ en el 44%, como se observa en la imagen 26.

Los Tumores Mixtos sin componente de Saco Vitelino y en Puros no Seminoma ni Seno Endodérmico no se expresan en un 61%. El 73% de los Tumores Mixtos con componente de Saco Vitelino lo presentan, tuvieran o no también componente de Seminoma.

Hay estudios utilizando el anticuerpo en 189 muestras de orquiectomía con tumores de células germinales (95 seminomas puros y 94 no seminomas), demostrándose la presencia de β HCG en todos los componentes de coriocarcinoma, en los sincitiotrofoblastos y en las células de tipo sincitiotrofoblasto en el 8% de los seminomas y en el 30% de los no seminomas (68). (*Imagen 28*)

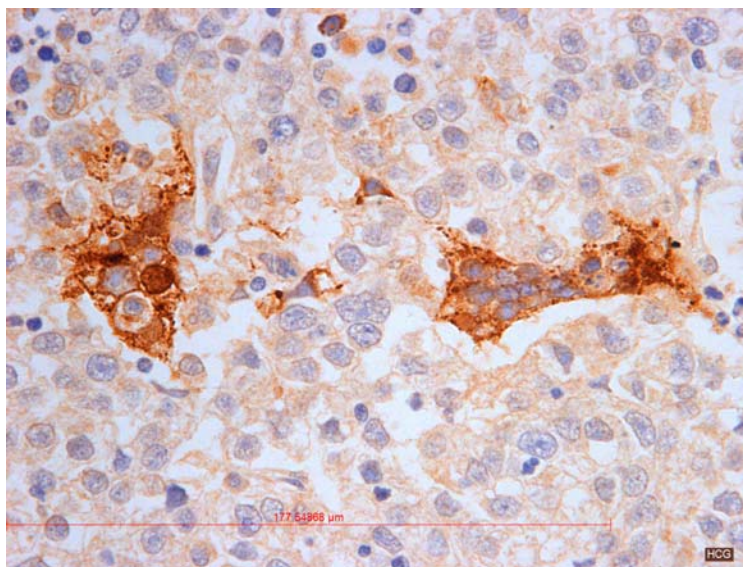


Imagen 28. βHCG en sincitio en Seminoma

El Tejido Peritumoral (TP) de los Seminomas no expresa βHCG en el 72%, ni en el 86% del TP de los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma y Puros no Seminomas ni Coriocarcinomas. En el TP de los Tumores Mixtos con componente de Coriocarcinoma y/o componente Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro *βHCG se expresa en un 55%*. En el TP de los Tumores Mixtos con componente de Seno Endodermico o Saco Vitelino puro el 79% tampoco lo expresa.

En nuestra muestra en el TP de los Tumores no Seminomatosos solo el 19% expresan βHCG y en el TP del conjunto de los Tumores Seminomatosos, Puros o Mixtos el 35%. En el TP de los Tumores no Teratomas no se expresa en el 77%, mientras que sí aparece en el TP de los Teratomas en un 36%..

En unos pocos casos, los NICG presentes en los túbulos seminíferos adyacentes a los tumores dieron positivo a la βHCG(68). En nuestro estudio de Investigación además de lo anteriormente referidos *hay que destacar que en TCG con marcador negativo, hay 2 que en el TP sí lo expresan.*

αFP

La αFP es una glicoproteína de 70 kDa que contiene 590 aminoácidos. Las células del saco vitelino embrionario, el hígado fetal y el tracto intestinal fetal sintetizan esta glicoproteína (77,78). Es un marcador muy útil para la detección de

numerosos defectos de desarrollo y diversas patologías (79). Se ha demostrado la expresión en aproximadamente un 44% de los carcinomas hepatocelulares, así como en tumores de células germinales gonadales y extragonadales, incluidos tumores del saco vitelino. La α FP no se ha detectado en tejido adulto normal utilizando inmunotinción (77).

En los TCG era negativo en el 68,6%, lo que suponían 35 tumores y en el TP fueron negativos 46 (93,9%).

En todos los Seminomas puros no se expresa este marcador. En la mitad de los Tumores Mixtos sin Componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni Puros de cualquiera de ellos. En el 95% de los Tumores mixtos con componente de Seminoma y Seminomas puros y Displasia no se expresa, En el resto de tumores un 53% son positivos.

El 87% de los Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino expresan y un 40% con +++. Es la neoplasia testicular más frecuente en niños, seguida del teratoma. (Imagen 29)

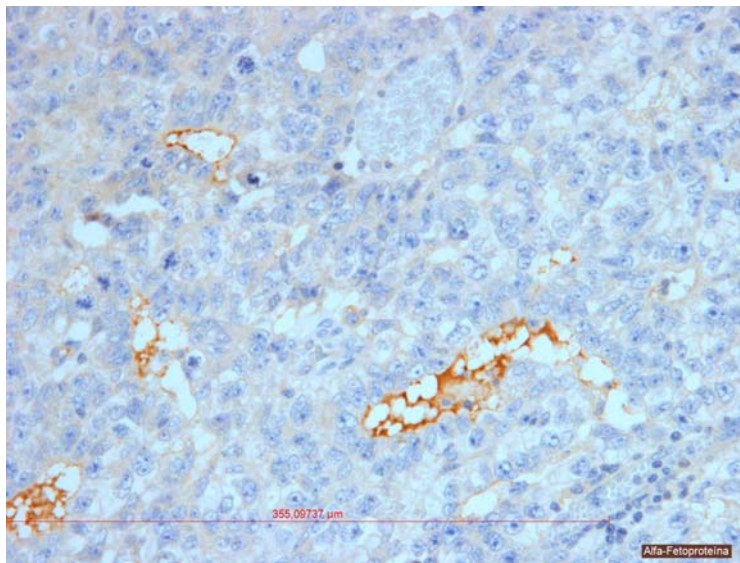


Imagen 29. α FP en Seno Endodermico

Los resultados positivos pueden contribuir a la identificación de tumores del Saco Vitelino y TCG mixtos. Se estudiaron con el anticuerpo 189 muestras de orquiectomía con tumores de células germinales (95 seminomas puros y 94 no seminomas). Todos los seminomas fueron α FP negativos, mientras que en un 66% de los no seminomas la α FP sí tiñó positivamente. Un 21% de los carcinomas

embrionarios puros, un 25% de los componentes de los carcinomas embrionarios en tumores mixtos, todos los componentes de los tumores del saco vitelino, un 20% de los teratomas puros y un 27% de los componentes de los teratomas fueron α FP positivos (68).

En nuestra serie ningún TP de los Seminomas Puros ni de los Tumores Mixtos con componente Seminomatoso aparece positividad a α FP y solo el 9% de los Tumores Mixtos sin Componentes de Seminoma, sin Coriocarcinoma y Puros no Seminomas y no Coriocarcinomas.

Sólo En el TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodérmico o los del Saco Vitelino la expresión es del 14%.

En el TP de los Tumores No seminomatoso solo un 12% expresan el marcador. En el TP de los Tumores Mixtos con Componente Seminomatoso y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodérmico o puros de estos dos últimos solo lo expresan el 8%. En el 93% del TP de los Teratomas no se expresa y en el 5% de los No Teratomatosos sí.

En la literatura ninguno de los casos tiñó la α FP tiñó positivamente en los carcinomas localizados presentes en los túbulos seminíferos adyacentes a los tumores (73). En nuestro estudio de Investigación sí que aparece y ayuda a valorar la decisión en el caso que se decidiera a realizar o no una cirugía conservadora.

Se aprecia que en aquellos Tumores de Células Germinales donde la α FP es negativo, 74% también lo es en el 72% en el tejido peritumoral. De los positivos de los TCG, 14, un 29%, solo 4 tienen positivo el TP.

C-kit

El anticuerpo policlonal de conejo contra el CD117 humano, C-kit marca al receptor de la tirosinquinasa transmembranal CD117/c-kit, localizado en las células madre hematopoyéticas, melanocitos, mastocitos, células de Cajal, células germinales, células basales de la piel y el epitelio de los conductos mamarios.(83,87)

Se ha demostrado que la vía del receptor c-kit de la tirosinquinasa es importante para el crecimiento tumoral y la progresión de varios cánceres (86) y mutaciones en el gen *c-kit* que conduce a la fosforilación independiente del ligando (activación) del gen c-kit de la tirosinquinasa, y se cree que tiene un papel patogenético central en muchos los tumores. (89)

En los TCG no se expresaba en 49%. En el TP se expresó en alguno de sus tres grados en el 75,5%, es decir en 37 casos.

El 83% de los Tumores Mixtos sin componentes de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni los Puros de esos dos tipos no expresan C-kit. Los Seminomas Puros expresan +++ el 39%. En 20 % de los Seminomas se identifican grandes células trofoblásticas (diferenciar del Coriocarcinoma por la pérdida de la proliferación nodular de las células trofoblásticas y la ausencia de citotrofoblasto).

El 89% los Seminomas expresan el marcador. (Imagen 30)

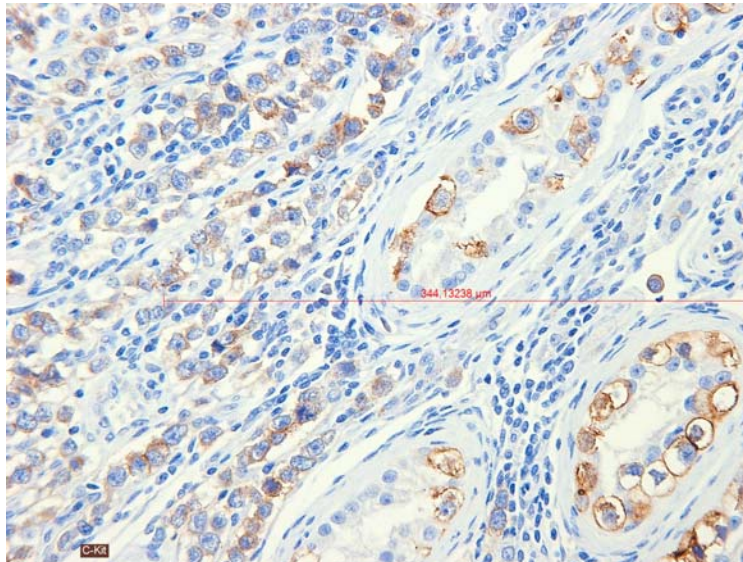


Imagen 30. C-Kit en Seminoma

El anticuerpo marcó 50 de 56 seminomas en diferentes estudios (83) confirmando nuestros hallazgos. Los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni los Puros de ellos son negativos en un 83%.

En los Tumores Mixtos con Componentes del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino el C-kit no se expresa en el 80 %. No se observó marcado en 17 tumores de células germinales, con excepción de seminomas según la literatura (90,91,92)

Los Seminomas y los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y Displasia el marcador se expresan en el 91%. Los Tumores Mixtos no

Seminomatosos o Puros no Seminoma no lo hace en el 82%. *Podemos considerar que realizar el C-kit es muy importante para confirmar Seminoma.*

El 70% de los Tumores Mixtos sin Componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Saco Vitelino o Puro de estos dos últimos no expresan C-kit tanto agrupados por expresión exclusivamente o por grados de expresión. Hay que tener en cuenta que el Carcinoma Embrionario puede ser positivo para C-kit, para confirmarlo y sobre todo en las metástasis hay recordar que la α FP es positiva en 0-33 % y AE1/AE3 positiva en 95-100 % de casos.

El 66% los Teratoma o Tumores Mixtos con componente Teratomatoso no expresan C-kit pero no es significativo

En el 78% del TP de los Seminomas Puros se expresa C-kit. El 89% del TP de los Tumores Mixtos con Coriocarcinoma y/o componentes Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro expresa C-kit.

En el TP de los Tumores Mixtos de Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino lo expresa en un 71%.

En el TP de los Tumores No Seminomatosos se expresa C-kit en el 69% y en el de los Tumores Seminomatosos, Mixtos o Puros, el 83%. En el 86% del TP de los Teratomas Mixtos o Puros se expresa y en un 71% de los No Teratomas.

En los TCG que no expresan C-kit tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP

Ki-67

El anticuerpo MIB-1 monoclonal reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 (doble banda de 345 y 395 kD en el procedimiento de inmunoblotting de la proteína extraída de las células proliferativas) asociado a la proliferación celular, presente en todo el ciclo celular (fases G1, S, G2 y M) y ausente en las células en reposo (fase G0). (94) El anticuerpo reconoce el antígeno Ki-67 nativo y los fragmentos recombinantes de la molécula Ki-67. (95)

En los TCG se expresaba en todos excepto en 2 en diferente porcentaje, lo que significaba que el 96,1% lo tenían positivo. En el TP El *Ki-67* obtuvo positividad en 85,7 % del total de los estudiados, es decir 42 especímenes,

En los *Seminoma Puros* el 89 % presentan expresión de *Ki-67*.

En los Tumores Seminomatosos Puros o Mixtos y Displasia expresan Ki-67 en un 91 % y lo hacen en el 100% de los no Seminomatoso aunque no es significativo en ninguno de los dos Grupos

En el TP de los Seminomas Puros el 78% expresan Ki-67 y en el 100% de lo Tumores Mixtos con Coriocarcinoma y/o con Seminoma o Coriocarcinoma Puro. El índice mitótico de los Coriocarcinoma es alto en los elementos de citotrofoblasto, pero no se observan mitosis en los elementos de sincitiotrofoblasto

Un 86% del TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino y un 94% de los Tumores Mixtos sin Saco Vitelino o Puros No Seminoma ni Saco Vitelino.

En el 83% del TP de los Tumores Mixtos o Puros con Seminoma el Ki-67 es positivo y en el 88 % de los no Seminomatosos.

En todos los TP de los Teratomas puros o Mixtos con Teratoma es positivo. En el 80% del TP de los No Teratomas también se presenta. En todos los casos, la expresión o no del Ki-67 en el TP de los TCG no alcanza significación.

En los TCG el 96% fue positivo, mientras que en el TP era el 86%. Solo 1 de los TCG negativos fue positivo en el TP

La medición de la capacidad proliferativa de un tumor se pueden realizar con técnicas de inmunohistoquímica tales como el MIB-1 (Ki67) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). La expresión de ambos ha mostrado su importancia como factor pronóstico en los TCG. En un estudio de Fernández et al (36) se analizó la expresión de PCNA y hallazgos histológicos como la invasión vascular y presencia de carcinoma embrionario en tumores de células germinales testiculares no seminomatosos en los estadios I y II. Siguiendo un algoritmo basado en criterios histológicos (volumen de carcinoma embrionario), radiológicos (tamaño de ganglios linfáticos en las zonas de drenaje), e inmunohistológicos (porcentaje de células que expresan MIB-1), se establecen grupos de alto y bajo riesgo dentro del Estadio I para presentar metástasis ocultas.

C-erb-B2

El gen humano *HER2* (también conocido como *ERBB2* o *NEU*) codifica una proteína a menudo llamada proteína HER2 o p185 *HER2*. La proteína HER2 es una tirosinquinasa del receptor de membrana homóloga con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1) (103-110). La proteína HER2

es un componente normal expresado por una variedad de tipos de células epiteliales (110)

La sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de las células con cáncer sugería que podría tratarse de un objetivo de una terapia con anticuerpos. Herceptin™ (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado (112) que se liga con gran afinidad a la proteína HER2 y que ha demostrado ser un inhibidor de la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan la proteína HER2 in vitro e in vivo (113-115).

En los TCG no se expresaba en el 74,5%, 38 tumores. En el TP en 38 de 49 (77,6%) no se expresa

Todos los Seminomas Puros menos uno no expresan C-erb-B2 lo que constituye un 94%. Los Tumores Mixtos con Componente de Seno Endodérmico o Puros de Saco Vitelino presentan positividad en un 60%

Los Tumores Mixtos Seminomatoso o Seminomas Puros o Displasia no expresan C-erb-B2 en un 91%. Los Tumores No seminomatosos lo hacen en un 39%.

Los Tumores Mixtos con componentes de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodérmico o Puros de estos dos últimos expresan en un 37%.

El 77% de los Tumores no Teratomatosos no expresan C-erb-B2 y el 66% de los Teratomas tampoco pero no es significativo.

Solo en el 11% hay expresión en el TP de los Seminomas Puros a C-erb-B2. En el 72% del TP de los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni Coriocarcinoma ni Puro de estos dos hay positividad a dicho marcador.

El 35% del TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodérmico o Puros del Saco Vitelino expresan y el 76% de los Tumores Mixtos sin componentes de Seno Endodérmico ni Puros No Seminomatosos ni Saco Vitelino no lo hacen.

El 87% del TP de los Tumores Seminomatosos no presentan positividad y solo el 31% de los No Semitomatosis si lo hacen.

La expresión en el TP de los Tumores con Teratoma o Puros es del 21%, mientras en los No Teratomatosos es del 23%.

Solo en el 11% hay expresión en el TP de los Seminomas Puros a C-erb-B2. En el 72% del TP de los Tumores Mixtos sin componente de Seminoma ni Coriocarcinoma ni Puro de estos dos hay positividad a dicho marcador.

El 35% del TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodermico o Puros del Saco Vitelino expresan y el 76% de los Tumores Mixtos sin componentes de Seno Endodérmico ni Puros No Seminomatosos ni Saco Vitelino no lo hacen.

El 87% del TP de los Tumores Seminomatosos no presentan positividad y solo el 31% de los No Semitomatosos si lo hacen.

La expresión en el TP de los Tumores con Teratoma o Puros es del 21%, mientras en los No Teratomatosos es del 23%.

En los TCG que no expresan C-erb-B2 tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos la expresión también la tienen en el TP

EFGR

Identifica la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en tejidos fijados de la forma habitual para su evaluación histológica. EGFR detecta específicamente la proteína EGFR (HER1) en células que expresan el EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico es un receptor transmembrana de 170 kD codificado por el gen *HER1* humano. La proteína EGFR contiene un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosinquinasa intrínseca. La proteína EGFR es homóloga a otros miembros de la familia erbB/receptor EGF entre los que se incluyen el HER2/erbB2 o neu, HER3/erbB3 y HER4/erbB4 (133,134).

En los TCG era negativo en el 72,5%. En el TP sólo uno de las muestras de tejido peritumoral expresó

En nuestra muestra los Seminomas no expresan un 94%. El 78% de los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o de Coriocarcinoma y éste último Puro expresan EFGR.

El 44% de los Tumores Mixtos sin componente de Seno Endodérmico + Puros no Seminoma ni Seno Endodermico lo expresan.

En el 53% de los Teratomas Puros o Mixtos hay positividad a la EFGR. Sin embargo el 83% de los No Teratomas no lo expresan

En el 100% del TP de los Seminomas Puros no se expresa, ni tampoco en ninguno del TP de los Tumores Mixtos sin Componentes de Seminoma ni de Coriocarcinoma ni Puros de Seminoma ni coriocarcinoma.

Solo se presenta en un solo caso del grupo de los Mixtos con Coriocarcinoma y/o con Componente Seminomatoso o Coriocarcinoma puro. El único positivo es un Mixto Seminomatoso con componente Teratomatoso.

En los TCG el 76% fue negativo, mientras que en el TP era el 98%. Solo en uno de los TCG positivo también lo fue en el TP.

La mayoría de los tejidos analizados de otras estructuras dieron una tinción positiva de fibroblastos en tejido del estroma (1+, fibroso) así como los fibroblastos perineurales y las células mioepiteliales. Ocasionalmente, se observó la tinción de eosinófilos inducida por la peroxidasa endógena, en los estudios de TCG la expresión es mayoritariamente negativa (142).

AE1/AE3

El AE1/AE3 es una mezcla de dos anticuerpos monoclonales que se obtuvieron mediante la inmunización de ratones con queratinas de callos humanos (159). Se ha demostrado que el AE1/AE3 identifica a la mayoría de las citoqueratinas y, por lo tanto, se lo puede utilizar como un instrumento para la identificación positiva por IHQ de las células originadas en epitelios simples y estratificados (158,159,161).

El anticuerpo AE1 reacciona inmunológicamente con un determinante antigénico que se encuentra presente en la mayoría de las citoqueratinas de la subfamilia A, que incluyen a las citoqueratinas con designación 10, 13, 14, 15, 16 y 19 de Moll4 (PM 56,5, 54', 50, 50', 48 y 40 kD, respectivamente) pero no con los números 12, 17 y 18 (55, 47 y 45 kD). (161) El anticuerpo AE3 reacciona con un determinante antigénico compartido por las citoqueratinas de la subfamilia B que incluyen los números 1 y 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (PM de 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54 y 52 kD, respectivamente) (162).

Los resultados positivos ayudan a la clasificación de los tejidos normales y neoplásicos como de origen epitelial (158-160) y sirven como complemento de la histopatología convencional.

En los TCG expresaba positividad en algún grado en el 58,8%, esto es en 30 tumores. En el TP el 69,4% (34 casos) expresa de uno u otro grado, lo que supone que en 15 casos (30,6%) no lo hace.

En el 89% de los Seminomas Puros no se han expresado. (*Imagen 31*)

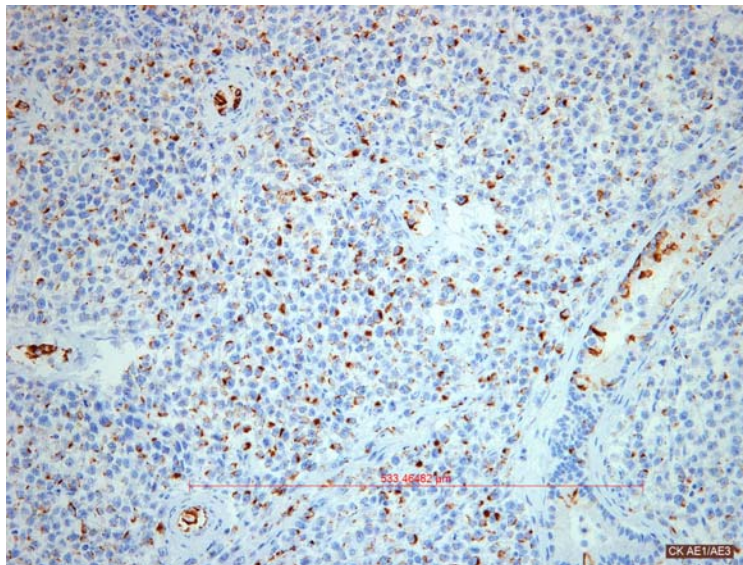


Imagen 31. AE1/AE3 en Seminoma

En los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcioma Embrionario y/o Saco Vitelino y los Puros de estos dos últimos se expresa en el 92%.

En el 100% de los Tumores Mixtos con Componente del Seno Endodémico o Saco Vitelino Puro se expresa. En los Seminomas hay que hacer diagnóstico diferencial con el patrón sólido del tumor del saco vitelino en el que habitualmente se observa la presencia de los otros patrones de este tumor en áreas próximas. En el caso del Seminoma con edema, Además las CTK AE1/AE3 son habitualmente positivas así como α FP. Los glóbulos hialinos y el material intercelular como membrana basal, son frecuentes en el tumor del saco vitelino, como rasgos específicos y diferenciadores.

Los Tumores Seminomatosos Puros o Mixtos con algún componente de Seminoma o Displasia no presentan positividad en un 83% a AE1/AE3. Los Tumores No Seminomatosos expresan en el 93%.

Los Tumores Mixtos con componente de Seminoma y/o Carcinoma Embrionario y/o Seno Endodermico o Puros de estos dos últimos lo expresan en un 93%. (*Imagen 32*)

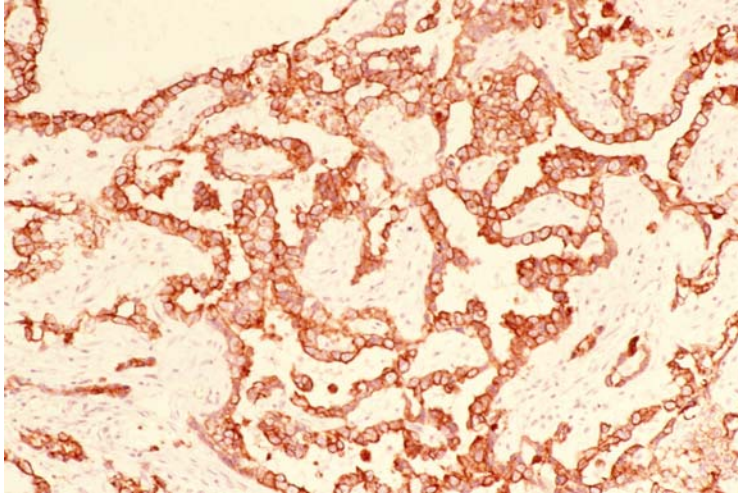


Imagen 32. AE1/AE en Carcinoma Embrionario

Las citoqueratinas como la AE1/AE3 pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial entre el Seminoma y el patrón solido del Carcinoma Embrionario. Este último tiene bordes citoplasmáticos mal definidos, solapamiento, irregularidad y pleomorfismo nuclear, que no se observan en el Seminoma bien fijado. Además, no tiene las trabéculas fibrosas del Seminoma.

Los Tumores con componente de Teratoma o Puros expresan en un 87% AE1/AE3. Un 53% de Los Tumores No Teratomas no expresan este marcador.

El 50% del TP de los Seminomas Puros no expresa AE1/AE3,

El 77% del TP de los Tumores Mixos sin Componentes de Seminoma ni Coriocarcinoma y Puros no Seminoma y no Coriocarcinoma expresan y el 89% de los Mixtos con Coriocarcinoma y/o componente Seminomatoso o Coriocarcinoma Puro también .

En el TP de los Tumores Mixtos del Seno Endodermico o Puros del Saco Vitelino se expresa el 86%. En el 81% del TP de los Tumores No Seminomatosos hay expresión.

En el 86% del TP de los Teratoma se expresa y en el 37% de los no Teratomas no lo hacen .En los TCG que no expresan AE1/AE3 tampoco la expresan en el TP y a la inversa que en los TCG que son positivos

Los TCG han sido los tumores urológicos menos estudiados desde el punto de vista de la patología molecular e inmunohistoquímica, tal vez por su baja incidencia y por el gran impacto que ha representado la poliquimioterapia en los protocolos terapéuticos actuales, con cifras de curación cercanas al 95%.

Existen sin embargo, ciertos elementos que hacen sospechar la importancia de las bases moleculares y genéticas en la etiología de estos tumores (8,29), entre ellos encontramos:

- Diferencias raciales en su incidencia, siendo mas frecuente en países del norte de Europa.
- La aparición de casos bilaterales y familiares.
- Elevada incidencia en individuos con malformaciones genitales (disgenesia gonadal).
- El probable origen del tumor a partir de una célula totipotencial.
- La convivencia de diferentes tipos celulares en un mismo tumor.
- La existencia de una pequeña proporción de pacientes que muestran una resistencia a la quimioterapia.

Todo esto implica que el estudio de la patología molecular de los tumores de células germinales es importante, para caracterizar la patogenia de los diversos tumores y alcanzar una mayor comprensión en su desarrollo y diagnóstico precoz.

Actualmente hay nuevos marcadores que junto con los utilizados en nuestra Investigación ayuda a diferenciar tipos y subgrupos de tumor y valorar posible respuesta a diferentes tratamientos. Destacamos OCT3/4, SALL4, SOX2, SAX 17 (184,185). Otros como HMGA1, HMGA2, PATZ1, GPR30, Aurora B, receptor β estrogénico abren vía para podere discriminar las lesiones (186)

.

VII.CONCLUSIONES

- El estudio macroscópico muestra una mayoría de tumores organoconfinados con márgenes expansivos y focos de necrosis. En el estudio microscópico destaca la mayor frecuencia de crecimiento sólido y/o en cordones con un alto índice de proliferación y alto grado citológico asociado a focos de necrosis y apoptosis (más frecuente en tumores con componentes de Saco Vitelino).
- En los TCG el estudio inmunohistoquímico demuestra que los Tumores Seminomatosos presentan una elevada positividad, mayor del 75% a β HCG, C-Kit y C-erb-B2, mientras que el resto de los tumores muestran una elevada positividad a EFGR y Citoqueratinas de bajo peso molecular (AE1/AE3) en el Saco Vitelino 100% y los Teratomas 89%.
La positividad a α FP pone de manifiesto el componente de Saco Vitelino que además muestra también una alta positividad a β HCG. Todos los Tumores mostraron un alto índice proliferativo Ki-67 positivo.
- En el TP de los Tumores Mixtos con diferenciación Coriocarcinomatosa se expresa β HCG en el 50%, disminuyendo cuando el componente es Seminomatoso al 35% y a menos del 15% en el resto.
La mayor parte del TP expresa C-Kit y Ki-67 independientemente del tipo del TCG, lo que puede ser un marcador de NICG. La expresión de α FP, EFGR y C-erb-B2 es mínima en el TP, estando esta última sólo asociada a Tumores Mixtos sin componente Seminomatoso ni de Coriocarcinoma. Destacar igualmente que el 50% de TP asociado a Tumores seminomatosos muestra positividad a AE1/AE3.
- La relación entre la expresión de los marcadores en Tejido Tumoral y Peritumoral muestra que, hasta en el 50% en algunos casos, existe expresión de β HCG, C-erb-B2, C-Kit y Citoqueratinas AE1/AE3 a pesar de la negatividad en el Tumor. La valoración de estos marcadores inmunohistoquímicos en TP es necesaria ante la posibilidad de una Cirugía Conservadora.
Es por ello que el uso de un panel de anticuerpos es imprescindible en relación con el estudio clinicopatológico para la determinación de los diferentes componentes tanto en los TCG como en el TP lo que tendrá implicaciones en la respuesta al tratamiento y pronóstico de estos Tumores.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. MODELO DEFINITIVO DE RECOGIDA VARIABLES

1. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO
2. MARGENES
3. HEMORRAGIA
4. NECROSIS
5. INFILTRACION DE
6. TIPO DE CRECIMIENTO
7. NECROSIS
8. APOPTOSIS
9. CUERPOS EMBRIOIDES
10. CUERPOS DE SCHILLER-DUVAL
11. FIBROSIS
12. INFILTRADO INFLAMATORIO
13. CALCIFICACIONES
14. CITOPLASMA
15. NUCLEO
16. GRADO
17. MITOSIS
18. PAS
19. CONCLUSION INMUNOHISTOQUIMICA
20. HCG
21. ALFA-FETO
22. C-KIT
23. Ki-67
24. C-erb-B2
25. EGFR
26. AE1/AE3
27. ESTUDIO MICROSCOPICO DE TEJIDO PERITUMORAL
28. ATROFIA
29. ONLY SERTOLI CELLS
30. NITGI
31. PAS
32. HCGp
33. ALFA-FETOp

34. C-KIT p
35. Ki-67p
36. C-erb-B2p
37. EGFRp
38. AE1/AE3 p
39. Edad
40. Estadio T patológico
41. Lado
42. Localización

Anexo 2. VARIABLES DE RECOGIDA.OPCIONES Y ASIGNACION DE VALORES NUMERICOS PARA CONFECCION DE HOJA EXCEL

1. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

- 1: SEMINOMA CLASICO
- 2: SEMINOMA ESPERMATOCITICO
- 3: CARCINOMA EMBRIONARIO
- 4: SENO ENDODERMICO O SACO VITELINO
- 5: CORIOCARCINOMA
- 6: TERATOMA MADURO
- 7: TERATOMA INMADURO
- 8: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO
- 9: SEMINOMA CLASICO+ CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA
- 10: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+TERATOMA INMADURO
- 11: SEMINOMA CLASICO +CARCINOMA EMBRIONARIO
- 12: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+ TERATOMA MADURO
- 13: SACO VITELINO+TERATOMA INMADURO
- 14: CARCINOMA EMBRIONARIO +TERATOMA INMADURO
- 15: SEMINOMA CLASICO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA
- 16: SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA
- 17: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO
- 18: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA MADURO
- 19: CARCINOMA EMBRIONARIO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
- 20: CORIOCARCINOMA+TERATOMA MADURO
- 21: CORICOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
- 22: SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
- 23: CARCINOMA EMBRIONARIO+TERATOMA MADURO
- 24: SEMINOMA CLASICO+TERATOMA MADURO
- 25: TUMOR ESTROMAL MIXTO
- 26: SEMINOMA CLASICO + TERATOMA INMADURO
- 27: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
- 28: DISPLASIA

29: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+TERATOMA
MADURO

2. MARGENES

- 1: EXPANSIVO (BIEN DELIMITADO)
- 2: INFILTRATIVO (MAL DELIMITADO)

3. HEMORRAGIA

- 0: NO
- 1: SI

4. NECROSIS

- 0: NO
- 1: SI

5. INFILTRACION DE

- 0: NO
- 1: ALBUGINEA
- 2: EPIDIDIMO
- 3: CORDON TESTICULAR
- 4: ALBUGINEA+EPIDIDIMO
- 5: ALBUGINEA+CORDON TESTICULAR
- 6: EPIDIDIMO+CORDON TESTICULAR
- 7: ALBUGINEA+EPIDIDIMO+CORDON TESTICULAR

6. TIPO DE CRECIMIENTO

- 1: SOLIDO
- 2: CORDONAL
- 3: TUBULO/GLANDULAR
- 4: SOLIDO+CORDONAL
- 5: SOLIDO+TUBULO/GLANDULAR
- 6: CORDONAL+TUBULO/GLANDULAR
- 7: SOLIDO+CORDONAL+TUBULO/GLANDULAR
- 8: QUISTICO
- 9: TUBULO/GLANDULAR+QUISTICO
- 10: SOLIDO+QUISTICO

7. NECROSIS

- 0: NO
- 1: EXTENSA
- 2: FOCAL

8. APOPTOSIS

0: NO

1: SI

9. CUERPOS EMBRIOIDES

0: NO

1: SI

10. CUERPOS DE SCHILLER-DUVAL

0:NO

1:SI

11. FIBROSIS

0: NO

1: SI

12. INFILTRADO INFLAMATORIO

0: NO

1: LINFOCITOS

2: CELULAS PLASMATICAS

3: MACRÓFAGOS

4: INFILTRADO AGUDO

5: LINFOCITOS+CELULAS PLASMATICAS

6: LINFOCITOS+MACROFAGOS

7: LINFOCITOS+INFILTRADO AGUDO

8: CELULAS PLASMATICAS+MACROFAGOS

9: MACROFAGOS+INFILTRADO AGUDO

10: LINFOCITOS+CELULAS PLASMATICAS+MACROFAGOS

11. LINFOCITOS+CELULAS

PLASMATICAS+MACROFAGOS+INFLAMACION AGUDA

13. CALCIFICACIONES

0: NO

1: SI

14. CITOPLASMA

1: VACUOLADO

2: GRANULAR

3: GLOBULOS HIALINOS

- 4: VACUOLADO+GRANULAR
- 5: VACUOLADO+GLOBULOS HIALINOS
- 6: GRANULAR+GLOBULOS HIALINOS
- 7: VACUOLADO+GRANULAR+GLOBULOS HIALINOS

15. NUCLEO

- 1: MULTINUCLEACION
- 2: PLEOMORFICOS
- 3: NUCLEOLO
- 4: MULTINUCLEACION+PLEOMORFICOS
- 5: VACUOLADO+NUCLEOLO
- 6: PLEOMORFICOS+NUCLEOLO
- 7: MULTINUCLEACION+PLEOMORFICOS+NUCLEOLO

16. GRADO

- 1: ALTO
- 2: BAJO

17. MITOSIS

- 1: <2X10 C.G.A.
- 2: 3-5X10 C.G.A.
- 3: 6-10X10 C.G.A.
- 4: >10X10 C.G.A.

18. PAS

- 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

19. CONCLUSION INMUNOHISTOQUIMICA

- 1: SEMINOMA CLASICO
- 2: SEMINOMA ESPERMATOCITICO
- 3: CARCINOMA EMBRIONARIO
- 4: SENO ENDODERMICO O SACO VITELINO
- 5: CORIOCARCINOMA
- 6: TERATOMA MADURO
- 7: TERATOMA INMADURO
- 8: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO
- 9: SEMINOMA CLASICO+ CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA

10: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+TERATOMA INMADURO
11: SEMINOMA CLASICO +CARCINOMA EMBRIONARIO
12: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+ TERATOMA MADURO
13: SACO VITELINO+TERATOMA INMADURO
14: CARCINOMA EMBRIONARIO +TERATOMA INMADURO
15: SEMINOMA CLASICO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA
16: SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA
17: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO
18: SEMINOMA CLASICO+CARCINOMA EMBRIONARIO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA MADURO
19: CARCINOMA EMBRIONARIO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
20: CORIOCARCINOMA+TERATOMA MADURO
21: CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
22: SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
23: CARCINOMA EMBRIONARIO+TERATOMA MADURO
24: SEMINOMA CLASICO+TERATOMA MADURO
25: TUMOR ESTROMAL MIXTO
26: SEMINOMA CLASICO + TERATOMA INMADURO
27: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+CORIOCARCINOMA+TERATOMA INMADURO
28: DISPLASIA
29: CARCINOMA EMBRIONARIO+SACO VITELINO+TERATOMA MADURO

20. HCG

0: -
1: +
2: ++
3: +++

21. ALFA-FETO

0: -
1: +
2: ++
3: +++

22. C-KIT

0: -

- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

23. Ki-67

- 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

24. C-erb-B2

- 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

25. EGFR

- 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

26. AE1/AE3

- 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

27. ESTUDIO MICROSCOPICO DE TEJIDO PERITUMORAL

- 0: NO
- 1: SI

28. ATROFIA

- 0: NO
- 1: SI

29. ONLY SERTOLI CELLS

- 0: NO
- 1: SI

30. NITGI

- 0: NO

1: SI

31. PAS

0: -
1: +
2: ++
3: +++

32. HCGp

0: 0: -
1: +
2: ++
3: +++

33. ALFA-FETOp

0: -
1: +
2: ++
3: +++

34. C-KIT p

0: -
1: +
2: ++
3: +++

35. Ki-67p

0: -
1: +
2: ++
3: +++

36. C-erb-B2p

0: -
1: +
2: ++
3: +++

37. EGFRp

0: -

- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

38. AE1/AE3 p

- 0: 0: -
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++

39. Edad

40. Estadio T patológico

- 0: pTx
- 1: pT0
- 2: pTis
- 3: pT1
- 4: pT2
- 5: pT3
- 6: pT4

41. Lado

- 1: DERECHO
- 2: IZQUIERDO

42. Localización

- 1: POLO SUPERIOR
- 2: MEDIO
- 3: POLO INFERIOR
- 4: POLO SUPERIOR+MEDIO
- 5: POLO SUPERIOR+MEDIO+POLO INFERIOR
- 6: MEDIO+POLO INFERIOR

IX.BIBLIOGRAFIA

1. Richie JP: Neoplasms of the testis. En Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED. (*Editores*). Campbell's Urology. 7 ed. Philadelphia: Saunders Co; 2411-2416. 1998
2. Swedlow AJ: Epidemiology of testicular cancer. En : Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, Lange PH (*Editores*). Principles and Practice of Genitourinary Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven;643-652.1997
3. García A, Duarte JM. Leiva O. Tumores de testículo. En: Resel L. (*Editor*) Urología : Libro del Residente. Asociación Española de Urología.: 317-331.1998
4. Torre Holguera, P., Villavicencio Mavrich, H: "Tumor testicular. Estudio por ecografía". Arch. Esp de Urol 53 (6):423-432.2000
5. "Management of Adult Testicular Germ Cell Tumours. Scottish Intercollegiate Guidelines Network .Edinburgh:SIGN; 2011 (<http://www.sign.ac.uk>)
6. Albers P., Albrecht W., Algaba F, et al. Guidelines on Testicular Cancer. European Association of Urology.2015
7. Testicular Cancer. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.v.2.2015. National Comprehensive Cancer Network.2015
8. Pellín A. Bases moleculares de la transformación neoplásica: protooncogenes y genes supresores. Rev Esp Patol 31 (4):427-434. 1998
9. Iczkowski KA, Butler S. New Immunohistochemical Markers in Testicular Tumors. Anal Quant Cytol Histol ;28:181–187. 2006
10. Netter F H, Vest S, Oppeheimer, E. Desarrollo del tracto genital y relaciones funcionales de las gónadas. Homologías de los genitales internos. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Sistema Reprodutor. Tomo 2. pag.:2.Masson-Salvat. 1993
11. Netter F H, Vest S, Oppeheimer, E. Desarrollo del tracto genital y relaciones funcionales de las gónadas. Homologías de los genitales externos. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Sistema Reprodutor. Tomo 2. pag.:3.Masson-Salvat. 1993
12. Netter F H, Vest S. Anatomía normal del tracto genital masculino. Descenso Testicular. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Sistema Reprodutor. Tomo 2. pag.:26.Masson-Salvat. 1993

13. Williams P, Warwick. Organos Reproductores Masculinos en Capitulo 8: Esplacnologia. Gray Anatomy. Tomo II. Salvat. 1985
14. Johnson AD, Gomers WR. The Testis, volume I. Academic Press: New York. 1977
15. Ross KFA. Phase Contrast and Interference Microscopy for Cell Biologists, Arnold. London. 1976
16. Ramirez JR.: Patología molecular en el cáncer de testículo. Urol Integr Invest 7 (3):333-339. 2002
17. Germa Lluich, JR, García del Muro, X., Galan MC.: Utilidad de los marcadores tumorales en el tratamiento de los tumores germinales. Arch Esp de Urol 53 (6): 460-468. 2000
18. Forman D, Oliver RTD, Brett AR, Marsh SGE, Moses JH, Bodmer JG, Chilvers CED, Pike MC: Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and HLA class 1 sib-pair analysis. Br.J.Cancer. 65:225-262. 1992
19. Pitot HC: Caracterización de los estadios de progresión en hepatocarcinogénesis en la rat. In Sudilovsky O, Pitot HC, Liotta LA (eds): Boundaries between promotion and progression during carcinogenesis. Basic Life Sciences. New York, Plenum Press. 57:3-18. 1991
20. Dean RC, Moul JW.: "Nuevos marcadores tumorales del cáncer de testículo". En Carroll PR, Presti JC (*Editores*). Testicular Cancer. The Urologic Clinics of North America. Mc Graw-Hill. Interamericana. Vol 3/98 :397- 407. 1998
21. Cozar JM, Tallada M, Espejo E: Etiopatogenia, historia natural y clínica de las neoplasias testiculares. Tratado de Oncología Urológica: 71.935-944. 2003
22. Mostofi FK, Sesterhenn IA. Anatomy and pathology of testis cancer. In Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology. Vogelzang, Scardino, Shipley and Coffey. Ed, Williams & Wilkins. Baltimore. USA, 953-967. 1996
23. Ulbright TM. Testicular and paratesticular tumors. In: Diagnostic Surgical Pathology, 3rd ed SS Stemberg, ed Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1977. 1999

24. Algaba F. Claves morfológicas para la interpretación de la biología de los tumores germinales de testículos. Arch Esp Urol 53:407-421.2000
25. Möller H: Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology. Eur Urol 23:8-15.1993
26. Scully RE: Intratubular germ cell neoplasia (carcinoma in situ): what it is and what should be done about it. World Urology Update Series 1.1982.
27. Skakkebaek NE. Atypical germ cells in the adjacent "normal" tissue of testicular tumours. Acta Pathol Microbiol Scand 83:127-130.1975
28. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. Modern Pathology 18, S51-S60.2005
29. Ramirez JR. Patología molecular en el cáncer de testículo. Urol Integr Invest 7 (3):333-339.2002
30. Forman D, Oliver RTD, Brett AR, Marsh SGE, Moses JH, Bodmer JG, Chilvers CED, Pike MC: Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and HLA class 1 sib-pair analysis. Br.J.Cancer.65:225-262. 1992
31. Pitot HC: Characterization of the stages of progression in hepatocarcinogenesis in the rat. In Sudilovsky O, Pitot HC, Liotta LA (eds): Boundaries between promotion and progression during carcinogenesis. Basic Life Sciences. New York, Plenum Press. 57:3-18.1991
32. Dean RC, Moul JW.: Nuevos marcadores tumorales del cáncer de testículo. En Carroll PR, Presti JC (*Editores*). Testicular Cancer. The Urologic Clinics of North America. Mc Graw-Hill. Interamericana. Vol 3/98 :397- 407.1998
33. Kessel van G, Suijkerbuijk RF, Sinke RJ: Molecular cytogenetics of human germ cell tumors: i(12p) and related chromosomal anomalies. Eur Urol 23: 23-36. 1993
34. De Reise WT, Albers P, Walker EB: Predictive parameters of biological behavior of early stage nonseminomatous germ cell tumors. Cancer, 74:1335-1338.1994
35. Fossa S, Nesland JM, Waehre H: DNA ploidy in the primary testicular cancer. Br J Cancer 65: 297-3 10.1992

36. Fernandez EB, Sesterhenn I, McCarthy WF: Proliferating cell nuclear antigen expression to predict occult disease in clinical stage 1 nonseminomatous germ cell tumors. *J Urol* 152: 1133-1138.1994
37. Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP: Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod.Pathol.*7:435-439. 1994
38. Korman HJ, Schultz DS, Linden MD, Miles BJ, Peabody JO: Proliferating cell nuclear antigen and mutant p53 staining in testicular nonseminomatous germ cell tumours. A pilot study. *J.Urol.Pathol.*2:327-336. 1994
39. Lewis DJ, Sesterhenn IA, McCarthy WF, Moul JW: Immunohistochemical expression of p53 tumor suppressor gene protein in adult germ cell testis tumors: clinical correlation in stage 1 disease. *J.Urol.*152:418-423.1994
40. Martín R, Nistal M, Santamaría L.: Neoplasias testiculares. Clasificación y anatomía patológica (I). *Urol Integr Invest* 7(3):309-324.2002
41. Friedman NB, Moore RA. Tumors of the testis: a report on 922 cases. *Milit Surgeon* 99:573-593.1946
42. Dixon FJ, Moore RA. Tumors of the male sex organs. Atlas of Tumor Pathology, 1st series, Fascicles 31b and 32. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1952.
43. Dixon FJ, Moore RA. Testicular tumors: a clinicopathologic study. *Cancer* 6: 427-454.1953
44. Melicow MM. Classification of tumors of the testis: a clinical and pathological study based on 105 primary and 13 secondary cases in adults, and 3 primary and 4 secondary cases in children. *J Urol* 73:547-554. 1955
45. Mostofi FK, Price EBJr. Tumors of the male genital system. Atlas of Tumor Pathology, 2nd series, Fascicle 5. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1973.
46. Pugh RC. Testicular tumours-introduction. In: Pugh RC, ed. *Pathology of the testis*. Oxford: Blackwell Scientific, 139-59.1976

47. Collins DH, Pugh RC. Classification and frequency of testicular tumours. *Br J Urol* 36(Suppl):1-11.1964
48. Willis RA. Pathology of tumours. 4th ed. London: Butterworth, 959-1003.1967
49. Mostofi FK. Comparison of various clinical and pathological classifications of tumors of testes. *Semin Oncol* 1979;6:26-30.1979
50. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord, and scrotum. In Atlas of tumor pathology, Third Series, Fascicle 25. Published by The Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC, 1999.
51. Pugh RC, Parkinson C. The origin and classification of testicular germ tumours. *Int J Androl* 4(Suppl): 15-25. 1981
52. Diagnostic Surgical Pathology. S.S.Sternberg. Raven Press, 2nd edition.(1885-1934). 1994
53. Ackerman's Surgical Pathology. J.Rosai. Mosby, 8th edition. (1265-1289). 1996.
54. Uropatología Tumoral. F.Algaba. Pulso Ediciones S.A, 1ª edición. (291-339).1996
55. Burke AP, Mostofi FK. Spermatocytic seminoma. A Clinicopathologic study of 79 cases. *J Urol Pathol*;1:21-32. 1993
56. Sironi M, Assi A, Quaglia G et al. Pure yolk salk cell tumors in genital and extragenital sites : study of three pediatric cases, with cytological findings on two. *Arc Clin Path*;3:55-62.1999
57. Ulbright TM, Srigley JR, Reuter VE et al. Sex-cord stromal tumors of the testis with entrapped germ cells: a lesion mimicking unclassified mixed germ cell sex cord-stromal tumors. *Am J Surg Pathol*;24:535-542. 2000
58. Martin R, Nistal N, Santamaria L. Neoplasias testiculares. Clasificación y anatomía patológica (II). *Urol Integr Invest*; 7 (3):325-332 .2002
59. Santonastmo C, Oliva A, Schiavo M, De Sio M, D'Armiento M. Leydig cell tumor of the testis. Report of 3 clinical cases. *Arch Ital Urol Androl*;71:303-305. 1999

60. Gulbahee HE, Lindeland AT, Engel W, Lillemoe TJ. Metastatic Leydig cell tumor with sarcomatoid differentiation. *Arch Pathol Lab Med*;123:1104-1107. 1999
61. Takekawa Y, Kimura M, Sakakibara M, Yoshii R, Ato M, Nemoto N, Sakurai I. Immuno histochemical study of Sertoli-stromal cell tumor; comparasion between the tumor arising from the gonad of a testicular feminization syndrome bearing patient and from ovaries of non-bearing patients. *Rinsho Byori*;47:1070-1074. 1999
62. Xiao SY, Rizzo P, Carbone M. Benign papillary mesothelioma of the tunica vaginalis testis. *Arch Pathol Lab Med*; 124:143-147. 2000
63. Bisogno G, Roganovich J, Sotti G, Ninfo V, di Montezemolo LC, Donfrancesco A, Mascarin M, Carli M. Desmoplastic small round cell tumour in children and adolescents. *Med Pediatr Oncol*;34:338-342. 2000
64. Kasai T, Moriyama K, Tsuji M, Uema K, Sakurai N, Akazawa S. Metachronous bilateral primary lymphoma of the testis: a case report. *Nippon ffinyokika Gakkai Zasshi*;91:526-529. 2000
65. Lasota J, Nordling S, Miettinen M. Testicular diffuse large cell lymphoma with tubule preservation-molecular genetic evidence of transformation from previous follicular lymphoma. *Virchows Arch*;436:276-283. 2000
66. Womack C, Turner AG, Fisher C. Paratesticular liposarcoma with smooth muscle differentiation mimicking angiomyolipoma. *Histopathology*;36:221-223. 2000
67. Morrish DW, Marusyk H, Siy O. Demonstration of specific secretory granules for human chorionic gonadotropin in placenta. *J Histochem Cytochem* 1987;35:93-101.
68. Jacobsen GK, Jacobsen M. human chorionic gonadotropin (HCG) in testicular germ cell tumours. A prospective immunohistochemical study. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1983;91:165-76.
69. Mehta HC, MacDonald DJ. A sensitive enzyme immunoassay specific for human chorionic gonadotrophin. *Clin Chim Acta* 1982;121:245-50.
70. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology; London:Oxford University Press; 1999. p. 25-6.

71. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Choriongonadotropin testing: Nomenclature, reference preparations, assay performance, and clinical application; Approved guideline. NCCLS document I/LA10-A (1-56238-314-0) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1996.
72. Hau J, Nilsson M, Skovgaard-Jensen H-J, de Souza A, Eriksen E, Wandall LT. Analysis of animal serum proteins using antisera against human analogous proteins. *Scand J Lab Anim Sci* 1990;17:3-7.
73. Jacobsen GK, Jacobsen M. Alpha-fetoprotein (AFP) in testicular germ cell tumours. A prospective immunohistochemical study. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1983;91:165-76.
74. Kodama T, Kameya T, Hirota T, Shimosato Y, Ohkura H, Mukojima T, et al. Production of alphafetoprotein, normal serum proteins, and human chorionic gonadotropin in stomach cancer: Histologic and immunohistochemical analyses of 35 cases. *Cancer* 1981;48:1647-55.
75. Perrone T, Steeper TA, Dehner LP. Alpha-fetoprotein localization in pure ovarian teratoma. An immunohistochemical study of 12 cases. *Am J Clin Pathol* 1987;88:713-17.
76. MacDonald DJ, Kelly AM. The rapid quantitation of serum alpha-fetoprotein by two-site micro enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 1978;87:367-72.
77. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology; London: Oxford University Press; 1999. p. 9-10.
78. Mizejewski GJ. α -fetoprotein as a biologic response modifier: Relevance to domain and subdomain structure (minireview). *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215:333-62.
79. Nunez EA. Biological role of alpha-fetoprotein in the endocrinological field: Data and hypotheses. *Tumor Biol* 1994;15:63-72.
80. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1995. p. 236-38.

81. Hau J, Nilsson M, Skovgaard-Jensen H-J, de Souza A, Eriksen E, Wandall LT. Analysis of animal serum proteins using antisera against human analogous proteins. *Scand J Lab Anim Sci* 1990;17:3-7.
82. Jacobsen GK, Jacobsen M, Henriksen OB. An immunohistochemical study of a series of plasma proteins in the early human conceptus. *Oncodev Biol Med* 1981;2:399-410.
83. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, et al. Preferential localization of *c-kit* product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424:135–41
84. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola ED, Dimitrijevic S, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001;358: 1421–3
85. Hornick JL, Fletcher CDM. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:188–93
86. Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:486–92
87. Bühring H-J, Ashman LK, Gattei V, Kniep B, Larregina A, Pinto A, et al. CR2.7. Stem-cell factor receptor (p145(*c-kit*)) summary report (CD117). In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3–7; Boston, USA.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 1882–8
88. Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6:3341–51
89. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetics features and differential diagnosis (review). *Virchows Arch* 2001; 438:1-12

90. Huss R, Moosmann S. The co-expression of CD117 (c-kit) and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases. *Br J Haematol* 2002; 118:305–12
91. Center for Disease Control Manual Guide – Safety Management, No. CDC-22, Atlanta, GA. “Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts.” April 30, 1976
92. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ. No. 78–127, Current 13. August 16, 1976
93. Gerdes J, Becker MHG, Key G, Cattoretti G. Immunological detection of tumor growth fraction (Ki-67 Antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168:85
94. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4):1710
95. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad, HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Amer J Pathol* 1991; 138:867
96. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976
97. Report on normal tissue immunohistochemical testing using DAKO Ki-67, Code No. N1633. DakoCytomation. January 2001
98. Gerdes J, van Baarlen J, Pileri S, Schwarting R, van Unnik JAM, Stein H. Rapid communication: Tumor cell growth fraction in Hodgkin’s Disease. *Amer J Pathol* 1987; 128(3):390
99. Gerdes J, Stein H, Pileri S, Rivano MT, Gobbi M, Ralfkiaer E, Nielsen KM, Pallesen G, Bartels H, Palestro G, Delsol G. Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin’s lymphomas. *Lancet* 1987; 2:448

100. Rudolph P, Lappe T, Hero B, Berthold F, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D. Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma. *Amer J Pathol* 1997; 150(1):133
101. Papadopoulos I, Rudolph P, Wirth B, Weichert-Jacobsen K. p53 expression, proliferation marker Ki-S5, DNA content and serum PSA: Possible biopotential markers in human prostatic cancer. *Urol* 1996; 48(2):261
102. Kreipe H, Alm P, Olsson H, Hauberg M, Fischer L, Parwaresch MR. Prognostic significance of a formalin-resistant nuclear proliferation antigen in mammary carcinomas as determined by the monoclonal antibody Ki-S1. *Amer J Pathol* 1993; 142(2):651
103. Beer T, Buchanan R, Matthews A, Stradling R, Pullinger N, Pethybridge R. Prognosis in malignant mesothelioma related to MIB1 proliferation index and histological subtype. *Human Pathol* 1998; 29:246
104. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 1985;230:1132-9.
105. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A *v-erbB*-related protooncogene, *c-erbB-2*, is distinct from the *c-erbB-1*/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6497-501.
106. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human *c-erb-B-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-4.
107. Schechter AL, Hung M-C, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, et al. The *neu* gene: an *erbB*-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985;229:976-8.
108. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319:226-30.
109. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Slamon DJ, Fendly BM, et al. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 1990;45:457-61.

110. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/*neu* proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990;5:953-62.
111. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal *erbB-2* product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990;2:992-1003.
112. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-9.
113. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-72.
114. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:255-63.
115. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/*neu* overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58:2825-31.
- 116 a. Medical Laboratories – Particular requirements for quality and competence, ISO 15189:2003. b. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57CFR7163, February 28, 1992.
117. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 1980.
118. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory & practice. New York: Pergamon Press; 1981.
119. DakoCytomation California Inc., Data on file.
120. Naish SJ, Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. Handbook: Immunochemical Staining Methods. DakoCytomation California Inc.; 1989.
121. Leong AS-Y, Milios J, Leong FJ. Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem* 1996;4:201-7.

122. "Procedures for decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides", Department of Health, Education, and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD, 1976.
123. "Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts." Center for Disease Control Manual Guide: Safety Management, No. CDC-22, Atlanta, GA, April 30, 1976.
124. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; Approved guideline. NCCLS document M29-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1997.
125. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1999.
126. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special report: quality control in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1989;92:836-43.
127. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: Part I. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 1983;14:767-71.
128. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980;73:626-32.
129. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194-9.
130. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/*neu* antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54: 2771-7.
131. Tubbs RR, Gephardt GN, Petras RE. Specimen processing and quality assurance. In: *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press; 1986:16-27.

132. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis.
133. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265:7709
134. Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; 20:41
135. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1132
136. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319:230
137. Schechter AL, Hung M-C, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: An erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 229:976
138. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Intl Rpts* 1984; 8(8):649
139. Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991; 47(1):87
140. Sainsbury JRC, Farndon JR, Sherbet GV, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985; 1(8425):364
141. Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol* 1986; 149:9
142. Werner MH, Nanney LB, Stoscheck CM, King LE. Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptors in human nervous system. *J Histochem Cytochem* 1988; 36:81

143. Pii K, Andersen FG, Jensen S, Spaulding B. Characterization of a new monoclonal antibody, clone 2-18C9, for the measurement of Epidermal Growth Factor Receptor expression in solid tumors. Am Assoc Canc Res 95th annual meeting, Abst #5029 Orlando, Fl Mar 27 – 31 2004
144. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR7163, February 28, 1992
145. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: The C. V. Mosby Co. 1980
146. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS and Störkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: Variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. (submitted for publication 2003)
147. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: Theory and practice. New York: Pergamon Press 1981
148. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. Handbook: Immunochemical Staining Methods. 3rd Edition. DakoCytomation 2001
149. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976
150. NCCLS (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved guideline. Villanova, PA 2001. Order code M29-A2
151. NCCLS (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. Villanova, PA 1999. Order code MM4-A.
152. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986
153. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Special report: quality control in immunohistochemistry. Amer J Clin Pathol 1989; 92:836

154. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. *Biotech Histochem* 1991; 66:194
155. Tubbs RR, Gephardt GN, Petras RE. Specimen processing and quality assurance. In: *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986; 16
156. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. *Amer J Clin Pathol* 1980; 73:626
157. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54:2771
158. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. *Cell* 1982; 30:361
159. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1982; 95:580
160. Moll R, Franke WW, Schiller DI. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11
161. Sun T-T, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model. In: Levine A, Topp W, Vande Woude G, Watson JD (eds.). *Cancer cells 1 the transformed phenotype*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1984
162. Eichner R, Bonitz P, Sun T-T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *J Cell Biol* 1984; 98:1388
163. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976

164. Franke WW, Moll R. Cytoskeletal components of lymphoid organs. *Differentiation* 1987; 36:145
165. Gown AM, Boyd HC, Chang Y, Ferguson M, Reichler B, Tippens D. Smooth muscle cells can express cytokeratins of "simple" epithelium. *Amer J Pathol* 1988; 132:223
166. Zarbo RJ, Gown AM, Nagle RB, Visscher DW, Crissman JD. Anomalous cytokeratin expression in malignant melanoma: One- and two-dimensional western blot analysis and immunohistochemical survey of 100 melanomas. *Mod Pathol* 1990; 3:49
167. Brown DC, Theaker JM, Banks PM, Gatter KC, Mason DY. Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumors. *Histopathol* 1987; 11:477
168. Bacchi CA, Zarbo RJ, Jiang JJ, Gown AM. Do glioma cells express cytokeratin? *Appl Immunohistol* 1995; 3:45
169. Pinkus GS, O'Connor EM, Etheridge CL, Corson JM. Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsinization. *J Histochem Cytochem* 1985; 33:465
170. Pinkus GS, Etheridge CL, O'Connor EM. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? *Amer J Clin Pathol* 1986; 85:269
171. Listrom MB and Dalton LW. Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK 6, AE1:AE3 and CAM-5.2. *Amer J Clin Pathol* 1987; 88:297
172. Report of Normal Tissue Immunohistochemical testing using DakoCytomation Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clone AE1/AE3. DakoCytomation June 1998
173. Montag AG, Pinkus GS, Corson JM. Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: An immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum Pathol* 1988; 19:336
174. Nelson WG, Battifora H, Santana H and Sun T-T. Specific keratins as molecular markers for neoplasms with a stratified epithelial origin. *Canc Res* 1984; 44:1600
175. Testis. In: American Joint Committee on Cancer.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer, pp 317-322.2002

176. Naish SJ, Boenish T, Farmilo AJ et al. Immunohistochemical staining methods. DAKO CORPORATION. 1989.
177. Failini B, Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med 107:105-116.1983.
178. Taylor CR, Shang-Rong S, Chaiwun B et al. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections. Hum Pathol 25:263-270.1994
179. Fisher CJ, Gillet CE, Vojtesek B et al. Problems with p53 immunohistochemical staining : the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. Br J Cancer 69:26-31. 1994
180. Alvaro T, Salvadó MT, Martínez S et al. Desenmascaramiento antigénico no enzimático. Estudio comparativo entre horno microondas y olla a presión en secciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina. Rev Esp Patol 29:217-227.1996
181. Gourgoulis V, Rassidakis G, Karameris A et al. Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. Virchows Arch 425:481-489.1994.
182. Fernández Aparicio T, Miñana Lopez B, Chaves A. Guzmán Martínez-Valls et al. Conservative Treatment of germ cell tumor of the testis. Actas Urol Esp. 2000 Nov-Dec;24(10):810-5.2000
183. Emerson RE, Ulbright TM. Intratubular germ cell neoplasia of the testis and its associated cancer: the use of novel biomarkers. Pathology 2010 Jun; 42 (4):344-55.
184. Chieffi P, Chieffi S. An up-date on newly discovered immunohistochemical biomarkers for the diagnosis of human testicular germ cell tumors. Histol Histopathol, 2014 Aug; 29(8):99-1006
185. Chieffi P, Chieffi S. Molecular biomarkers as potential targets for therapeutic strategies in human testicular germ cell tumor: an overview. J Cell Physiol. 2013 Aug; 228 (8):1641-6

186. Ulbright TM, Tickoo SK et al. Best Recommendation in the Application of Immunohistochemistry in Testicular Tumors: Report From the International Society of Urological Pathology Consensus Conference. American Journal of Surgical Pathology August 2014 38 (8): 50-59