

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Evaluación Inmunohistoquímica de  
la Expresión de Aurora Quinasas  
en los Tumores de Células  
Germinales del Testículo Humano**

**TESIS DOCTORAL**

**Oralia Barboza de Cuellar**

**Madrid, 30 de marzo de 2009**



**JAVIER FRANCISCO REGADERA GONZÁLEZ, PATÓLOGO Y PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DAVID ALONSO HARDISSON HERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID y**

**MANUEL NISTAL MARTÍN DE SERRANO, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID**

**CERTIFICAN QUE:** Dña. **ORALIA BARBOZA DE CUELLAR**, Licenciada en Medicina por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México , ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación "**Evaluación Inmunohistoquímica de la Expresión de Aurora Quinasas en los Tumores de Células Germinales del Testículo Humano**", estudio que consideramos completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Lo que firmamos en Madrid a 30 de marzo de 2009

Fdo.: Javier Regadera  
Director

Fdo.: David Hardisson  
Director

Fdo.: Manuel Nistal  
Director

## ***AGRADECIMIENTOS:***

al Prof. **Javier Regadera**, por haber sido el motor que culminó en el convenio entre ambas Universidades, que permitió con su incondicional y desinteresado apoyo académico, así como la inversión de su valioso tiempo, culminar esta Tesis Doctoral y abrir el camino a futuras generaciones en todos los ámbitos del conocimiento

al Prof. **David Hardisson**, por sus enseñanzas metodológicas, asesoría personalizada y sobre todo por su valiosa amistad

al Prof. **Manuel Nistal**, por haber aceptado tan desinteresadamente asesorarme en mi proyecto de investigación y por transmitir a sus alumnos no solo su amplio conocimiento de la patología testicular sino el interés por la investigación, y la constante búsqueda de la verdad

Al Prof. **Jesús Áncer** por haberme motivado con su espíritu y liderazgo a continuar con mis estudios de postgrado en tan prestigiada Universidad

a mis compañeros y amigos del **Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Hospital Universitario “José Eleuterio González”**

a las **Autoridades Académicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y de la Universidad Autónoma de Madrid**, cuyo generoso esfuerzo hizo posible llevar a cabo el Convenio entre ambas Universidades para la obtención del grado doctoral en múltiples disciplinas

a mi Alma Mater:  
**la Universidad Autónoma de Nuevo León**

***DEDICATORIA:***

a mi **esposo Alfredo**

a mis hijos **Alfredo y Adrián**

a mi madre **Agripina**, *in memoriam*

y a todos mis queridos hermanos y, de modo especial, a mis hermanas **Mary y Juany**

Mi esposo ejemplo de apoyo, mis hijos fuente de inspiración y motor de mi existencia, mi madre ejemplo de vida y amor que junto con mis hermanas hicieron posible mi desarrollo como mujer y como profesional

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<i>Clasificación de los Tumores Testiculares</i>	5
<b>TUMORES GERMINALES</b>	8
<i>Histogénesis de los TCGT</i>	9
<i>Clasificación Clínica de los TCGT</i>	13
<i>Varietades Histológicas de los TCGT</i>	17
Seminoma	17
Carcinoma Embrionario	20
Tumor de Seno Endodérmico	21
Coriocarcinoma	22
Teratoma	22
Tumores Germinales Mixtos	23
<i>Tratamiento de los Tumores Germinales Testiculares</i>	25
<i>Marcadores Biológicos Séricos en Tumores Testiculares</i>	26
Alfa Feto Proteína	26
Gonadotropina Coriónica Humana	26
<i>Factores Pronósticos de los TCGT</i>	26
<i>Nuevas Moléculas en el Cáncer Testicular</i>	27
<i>Expresión de MAGE en los Tumores Testiculares</i>	42
<i>Expresión de Aurora A y de Aurora B en los Tumores Testiculares y Otras</i>	
<i>Enfermedades Neoplásicas</i>	42
<i>Expresión de Survivina en los Tumores Testiculares y Otras Enfermedades</i>	
<i>Neoplásicas</i>	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	50
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	52
<b>MATERIAL</b>	53
<b>MÉTODOS</b>	54
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	54
Fijación de las Piezas	54
<i>Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas</i>	54
<i>Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica</i>	55

Método Inmunohistoquímico de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)	56
Método Inmunohistoquímico de Envision	57
<i>Técnicas Fotográficas</i>	57
<b>RESULTADOS</b>	58
<b>DISCUSIÓN</b>	82
<b>CONCLUSIONES</b>	95
<b>RESUMEN</b>	98
<b>SUMMARY</b>	101
<b>REFERENCIAS</b>	104

# **INTRODUCCIÓN**

La frecuencia del cáncer testicular es menor del 1% de todas las lesiones malignas en el hombre.<sup>36</sup> Los tumores de células germinales testiculares (TCGT) son el tipo de cáncer más frecuente en hombres de 20 a 35 años de edad.<sup>32</sup> En la de la última década, la incidencia anual de cáncer testicular fue de 2,9 por cada 100.000 hombres de raza blanca y de 0,8% en el grupo de hombres afro-americanos, sin embargo, incluso se ha sugerido que la incidencia de TCGT puede alcanzar la alarmante cifra de un caso por cada 500 hombres, aunque la incidencia varía según las áreas geográficas. En Europa del Este, la incidencia se ha duplicado en los últimos 50 años, lo que sugiere que en el desarrollo de los tumores testiculares están implicados factores ambientales y genéticos.<sup>38</sup> Ciertos países tienen mayor incidencia, como Suiza, países Escandinavos, Alemania y Nueva Zelanda, y más baja Asia y África. La etiología del cáncer testicular esporádico común implica factores ambientales que incluyen el estilo de vida materno y posiblemente una exposición temprana a alteradores endocrinos. Los efectos de los factores ambientales parecen estar modulados por la variación genómica (polimorfismos), explicando, así, la susceptibilidad individual y la diferente incidencia de cáncer testicular en la población.<sup>221</sup>

El 90% de los tumores testiculares corresponden al grupo de TCGT. La mayor incidencia de TCGT se observa entre los 15 y 34 años de edad: mientras que el segundo grupo de edad de presentación ocurre en individuos ancianos, entre los 80 y 90 años de edad. Pero con todo, en ancianos los TCGT son extremadamente infrecuentes y su comportamiento es menos agresivo.<sup>28</sup>

Los TCGT son los tumores más comunes en el adulto joven, y se desarrollan como consecuencia de una transformación neoplásica de las células germinales primordiales (PGC) también denominadas como gonocitos embrionarios. Esto es, se piensa que los TCGT del adulto provienen de una célula precursora tumoral.<sup>62,263</sup> A pesar de que su origen es una célula presente ya desde la primera semanas de gestación, el tumor suele manifestarse clínicamente después de la pubertad, objetivándose células germinales malignas en el interior de los tubos seminíferos, las cuales han sido denominadas células de Carcinoma *in situ* Testicular, termino ya completamente reconocido en la literatura médica internacional con las siglas de CIS.<sup>151,153,263</sup> Recientemente en USA se ha denominado a las células del CIS bajo el término de neoplasia intratubular de células germinales inclasificada (ITGCNU), sin embargo en Europa, tanto en las publicaciones científicas como en la jerga clínica, persiste el uso del término CIS.



Los TCGT se clasifican en dos grandes grupos bien establecidos: seminomas y TCGT no seminomas; ambos grupos tienen diferencias clínicas y terapéuticas. En la actualidad está completamente establecido que el carcinoma in situ (CIS) testicular es el precursor común de todos los tumores malignos de células germinales de adolescentes y adultos, esto es, de los seminomas y de los no seminomatosos.<sup>221,264</sup> Sin embargo, la clasificación de los TCGT desarrollados en niños ha sido motivo de numerosas controversias, dado que en este grupo de edad se mantienen como grupos especiales de TCGT, de modo que en niños se considera, de una parte a los teratomas, y de otra al denominado tumor de seno endodérmico de tipo infantil, el cual se presenta a todo lo largo de la edad pediátrica, desde niños recién nacidos, hasta el periodo prepuberal. De otra parte, en hombres viejos también se puede desarrollar otro tipo especial de tumor testicular, denominado seminoma espermatocítico. Dado que se han descrito anomalías cromosómicas distintas en estos diferentes tipos de tumores testiculares, se sugiere que se trate de entidades de diferente histogénesis.<sup>151,153</sup>

Un alto porcentaje de TCGT, incluido el CIS, se desarrollan en pacientes que tienen alteraciones del desarrollo embrionario de los genitales internos y externos, siendo frecuente la presencia de criptorquidia e hipospadias, por ello, se ha definido un nuevo síndrome que se denomina síndrome de disgenesia testicular.<sup>21,46</sup> También se han descrito TCGT en otros síndromes asociados a malformaciones y cromosopatías, tales como la disgenesia gonadal mixta (45,X/46,XY) y la disgenesia pura (46,XY).<sup>46,256</sup> Existen diferencias entre la población general<sup>6</sup> y la de países como Dinamarca, en el que la incidencia de cáncer testicular es alta y se asocia con un mayor número de malformaciones testiculares, las cuales se acompañan de infertilidad en hombres jóvenes, con recuentos espermáticos bajos;<sup>2,292</sup> por el contrario, en Finlandia, la incidencia de cáncer testicular es tres veces menor<sup>2</sup> y las malformaciones genitourinarias son relativamente infrecuentes,<sup>292</sup> así mismo, la concentración de espermatozoides de la población de Finlandia es significativamente más alta que en Dinamarca.<sup>130,131</sup>

Avances inmunohistoquímicos y moleculares recientes confirman que el CIS se origina en los gonocitos, los cuales tienen muchas de las características de las células germinales primordiales.<sup>10,223,238,264</sup> En efecto, la detención de la diferenciación de la célula germinal es el primer evento clave que sucede a la transformación y al cáncer de células germinales en adultos jóvenes, lo que ocurre generalmente después de la pubertad. En la mayoría de los casos

con CIS se asocia una parada o retraso de la diferenciación de las células germinales, desarrollándose así el denominado síndrome de disgenesia testicular, un síndrome complejo y multifactorial de amplio espectro de fenotipos, que comprende desde un deterioro moderado de la espermatogénesis hasta alteraciones graves del desarrollo y diferenciación sexual. Los casos más graves se deben a aberraciones genéticas hereditarias.<sup>221</sup>

Se sugiere que el CIS se origina a partir de células germinales diploides durante la vida fetal. El CIS se inicia con una aneuploidía acompañada de una extensa inestabilidad cromosómica. En los tumores seminomatosos y no seminomatosos existen muchas alteraciones genómicas en las mismas regiones, aunque su frecuencia es variable y los niveles de expresión génica de los dos subtipos histológicos son bastante distintos.<sup>266</sup> Asimismo, los dos subtipos histológicos tienen bastante diferencia epigenómica, lo cual se hace evidente por sus diferentes patrones de expresión génica. El CIS se desarrolla de células que tienen el fenómeno de “imprinting”, además, el genoma del seminoma está menos metilado, en comparación con el genoma de los tumores no seminomatosos. Con la tecnología de microarray de alto rendimiento, ya se han localizado con toda precisión varios genes implicados en TCGT; sin embargo, aún no se sabe de qué manera se regulan y desregulan los genes específicos y sus vías, durante las diferentes etapas de la tumorigénesis de los tumores germinales.

Probablemente, la aneuploidia precede a la expresión completa del fenotipo del CIS. Esto es particularmente importante si se tiene en cuenta la heterogeneidad citológica de la espermatogonia infantil normal,<sup>158</sup> por ello, deben analizarse cuidadosamente las células germinales en las biopsias de los testículos disgenéticos o criptorquídicos. Cuando este cambio no es obvio, se recomienda utilizar densitometría de DNA para confirmar o descartar su naturaleza neoplásica. Se ha sugerido que el primer cambio reconocible en la tumorigénesis de las células germinales es la poliploidía de las células germinales fetales, seguido de pérdida de cromosomas y otros cambios como hiperdiploidia, aneuploidía o triploidía.<sup>308</sup> Todos estos hallazgos determinarían la expresión del fenotipo típico del CIS en las células germinales aisladas y dispersas en los túbulos seminíferos infantiles que, posteriormente, en el adulto, proliferan al patrón clásico del CIS.

La clasificación del CIS incluye el tipo indiferenciado (ITGCNU) y también otras formas específicas como son el seminoma y el carcinoma embrionario intratubular. El seminoma intratubular se ha considerado como precursor primariamente del seminoma clásico puro y

también de aquellos TCGT mixtos con componente seminomatoso, pero también se observó patrones de seminoma intratubular en TCGT mixtos con componente no seminomatosos. El carcinoma embrionario intratubular se ha encontrado exclusivamente en tumores no seminomatosos, todos los casos de carcinoma embrionario intratubular fueron identificados por sus característica morfología nuclear.<sup>146</sup> La presencia de seminoma intratubular en tumores no seminomatosos sugieren que es una lesión realmente pre-invasiva, más que una manifestación de la diseminación intratubular de un seminoma previamente establecido. La baja incidencia de carcinoma embrionario intratubular está en consonancia con la teoría de que muchos de los TCGT no seminomatosos se originan inicialmente en los seminomas, más que directamente a partir de una lesión ITGCNU.<sup>146</sup> Y esta hipótesis se basa en la asociación de ITGCNU con los distintos tipos de TCGT; en concreto, la presencia de IGCNU se ha observado en el 88% de los casos de TCGT, de otra parte, el seminoma intratubular y el carcinoma embrionario se ha encontrado, respectivamente, en el 19% y 7% de los casos. Aunque se reconoce que el ITGCNU es un precursor de los tumores germinales, la asociación de los tipos específicos con su contraparte invasora no está aun bien establecida.<sup>146</sup> De hecho, las células preinvasivas del cáncer testicular tienen características morfológicas específicas, las cuales pueden utilizarse para un primer diagnóstico basado en el análisis morfológico. A veces, este análisis puede verse apoyado por el empleo de técnicas inmunohistoquímicas, utilizando el marcador inmunohistoquímico OCT3/4, el cual tiene elevada especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de ITGCNU y además permite caracterizar esta lesión en fases preinvasivas.<sup>300</sup>

### ***Clasificación de los Tumores Testiculares***

Numerosas clasificaciones de los tumores testiculares han sido utilizadas durante la segunda mitad del siglo XX, con base en los trabajos de investigadores relevantes como: Friedman y Moore<sup>76</sup> Dixon y Moore<sup>64</sup> y Mostofi y Price.<sup>187</sup> En muchos países de Europa, se utilizó en la segunda mitad del siglo XX la clasificación propuesta por el Grupo Británico de Tumores Testiculares (BTTP), cuya división más importante se centraba en considerar dos grandes grupos: el seminoma y el teratoma, y este último se dividía, a su vez, en indiferenciado, intermedio y trofoblástico. Por otra parte, el Instituto de las Fuerza Armadas de Patología de los Estados Unidos de Norteamérica en 1999 publicó una clasificación casi definitiva que en los últimos años ha sido ampliamente utilizada en USA y la mayoría de los países del mundo (Tabla 1), reemplazando a la clasificación más admitida en Europa, la

británica BTTP, ya que ésta última agrupaba tumores de diferentes subtipos y con diferente comportamiento biológico y además las categorías histológicas no se correlacionaban con los marcadores séricos, que son la base en el momento actual del seguimiento de estos pacientes y de la valoración de la respuesta a los distintos tratamientos.

**Tabla 1.** Clasificación de los Tumores Testiculares

<b>Tumores de Células Germinales</b>	<b>Tumores de Células Germinales con Más de Un Tipo Histológico</b>
Lesiones precursoras NITG NOS NITG tipo específico	Tumor de células germinales mixto Poliembrioma Embrioma difuso
<b>Tumores de Células Germinales de Un Tipo Histológico</b>	Tumor de células germinales en regresión Solo cicatriz Cicatriz con NITG Cicatriz con un pequeño residual de cualquier tipo de tumor
Seminoma Variante: con células del sincitotrofoblasto Seminoma espermatocítico Variante: con componente sarcomatoso; tipo anaplásico Carcinoma embrionario Tumor de senos endodérmicos Tumores trofoblásticos Coriocarcinoma Tumor del sitio placentario No clasificado Teratoma Teratoma maduro Variante: quiste dermoide Teratoma Inmaduro Teratoma con malignización secundaria Teratoma monodérmico Carcinoide Tumor neuroectodérmico primitivo Otros	<b>Tumores de los Cordones Sexuales-Estromales</b> Tumor de células de Sertoli Variante: de células grandes esclerosante, calcificante Tumor de células de Sertoli-Leydig Tumor de células de Leydig Tumor de células de la granulosa Tipos: adulto y juvenil Tumores del grupo Fibroma-Tecoma Mixtos No clasificables Tumores mixtos germinales y de los cordones sexuales Gonadoblastoma No clasificable

NITG NOS: Neoplasia Intratubular Germinal No Específica. Tomada de Ulbrigh et al.<sup>297</sup>.

**Tabla 2.** Clasificación Histológica de los Tumores Testiculares WHO 2004 de la Organización Mundial de la Salud

<b>Tumores de Células Germinales</b>	
Neoplasia intratubular de células germinales, inclasificada	9064/2 <sup>1</sup>
Otros tipos	
<b>Tumores de Un Tipo Histológico (Formas Puras)</b>	
Seminoma	9061/3
Seminoma con células sincitiotrofoblásticas	
Seminoma espermatocítico	9063/3
Seminoma espermatocítico con sarcoma	
Carcinoma Embrionario	9070/3
Tumor de saco vitelino	9071/3
Tumores trofoblásticos	
Coriocarcinoma	9100/3
Neoplasmas trofoblásticos diferentes del coriocarcinoma	
coriocarcinoma monofásico	
Tumor trofoblástico del sitio placentario	9104/1
Teratoma	9080/3
quiste dermoide	9084/0
Teratoma monodérmico	
Teratoma con malignización de tipo somático	9084/3
<b>Tumores de Más de Un Tipo Histológico (Formas Mixtas)</b>	
Carcinoma embrionario mixto y teratoma	9081/3
Teratoma mixto y seminoma	9085/3
Coriocarcinoma y teratoma/carcinoma embrionario	9101/3
Otros	

<sup>1</sup> Código morfológico de la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología (ICD-O) {808} y la Nomenclatura Sistematizada de Medicina (<http://snomed.org>). El comportamiento se codifica como /0 para tumores benignos, /2 para carcinomas in situ y grado III neoplasia intraepitelial, /3 para tumores malignos, y/1 para comportamiento límite o incierto.

## TUMORES GERMINALES

Existen numerosas enfermedades testiculares que se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer testicular. Entre estas destacan la criptorquidia y sobretodo el denominado síndrome de disgenesia testicular. También la infertilidad y los factores ambientales pueden contribuir al aumento que en la actualidad se está constatando de la incidencia del cáncer testicular. De hecho, la frecuencia de TCGT en hombres infértiles es del 0,4% al 1,1%.<sup>98</sup>

La criptorquidia es uno de los factores de riesgo más conocidos como lesión que favorece el desarrollo del cáncer testicular, aproximadamente el 12% de las neoplasias testiculares se desarrollan en testículos no descendidos,<sup>4</sup> y se considera que el riesgo aumenta de 3,5 a 5 veces, en comparación con la población general,<sup>89</sup> sobre todo para el caso de los seminomas. De los 1.500 pacientes que tenían biopsia testicular negativa para ITGCNU y que fueron seguidos durante un periodo superior a 5 años, sólo 1 desarrolló cáncer, en contraste con el 50% de los que tenían biopsia positiva para ITGCNU.<sup>92,264</sup> En los testículos criptorquídicos que posteriormente han desarrollado una ITGCNU, se ha demostrado que existen alteraciones morfológicas de las células germinales;<sup>119</sup> así, el 8% de los casos presentan espermatogonias multinucleadas; sin embargo el 77% de estos pacientes tienen un número normal de espermatogonias basales.<sup>53,54</sup> Sin embargo, en otros estudios de criptorquidia, la presencia de espermatogonias multinucleadas ocurre en el 50% de los casos (en 3 de 6 casos con CIS, y en 2 niños con criptorquidia).<sup>55,56</sup> Se ha sugerido que la presencia de células germinales multinucleadas se debe a la parada espermatogénica,<sup>176</sup> ya que es bastante común en testículos no descendidos.<sup>53</sup> No obstante, no se considera que los gonocitos multinucleados sean el equivalente del CIS, sino que parece más probable que ambos tipos de células sean el resultado de una diferenciación anormal de los gonocitos.

Existe una predisposición familiar relacionada con el cáncer testicular, ya que se ha reportado una mayor incidencia de tumores germinales en gemelos; de hecho, Buerger et al.,<sup>37</sup> en 1987, observaron un 30% en contraste con la población general<sup>37</sup> y para otros grados de parentesco el riesgo de predisposición del cáncer testicular es de un 2%.<sup>62,74,214</sup> Asimismo, la disgenesia testicular, sin duda, predispone con mayor frecuencia al desarrollo de tumores germinales invasivos, sobre todo al seminoma. Se sabe que en paciente pseudohermafroditas masculinos también se puede encontrar con cierta frecuencia la presencia de un gonadoblastoma en un cintilla ovárica, y también cuando estos pacientes alcanzan la vida

adultas pueden desarrollar todos los tipos de TCGT. De otra parte, el 5-10% de los pacientes con síndrome de insensibilidad a andrógenos (AIS) pueden desarrollar algún tipo de tumor germinal.<sup>241</sup>

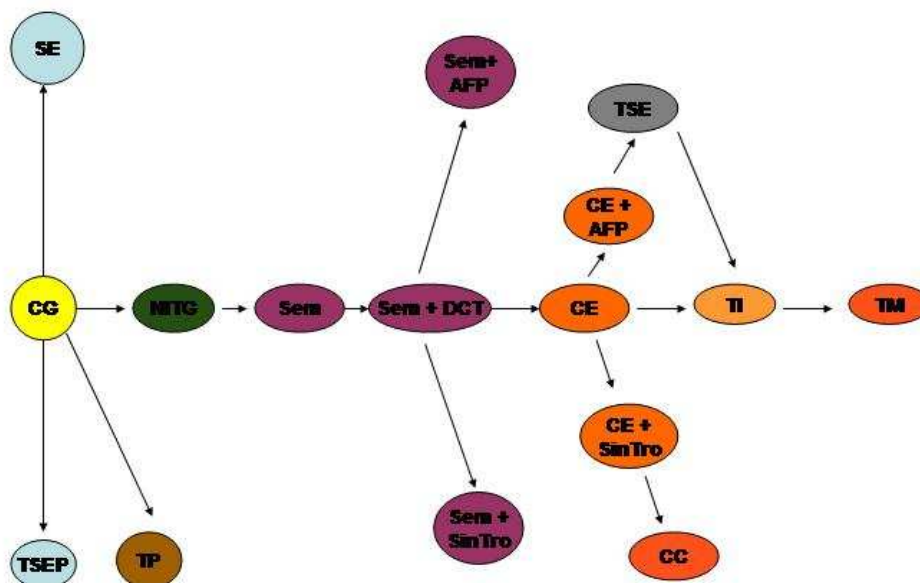
La bilateralidad del cáncer testicular no es un hecho fortuito, puesto que se ha demostrado que del 1,9% al 5% de los pacientes con TCGT desarrollan un tumor bilateral<sup>251</sup> y el riesgo es aún mayor si el testículo es criptorquídeo o atrófico.<sup>86</sup> En la actualidad aún persiste la controversia sobre la indicación de practicar biopsia del testículo contralateral en un paciente con un TCGT clínicamente unilateral, ya que desde el punto de vista práctico no determina cambios en la conducta quirúrgica, dado que lo que solamente se recomienda es que se efectúe un seguimiento estrecho y pormenorizado de cada paciente.<sup>93</sup> De hecho, células de CIS se pueden detectar en el 5% de los testículos contralaterales de pacientes con tumores germinales. En estos casos de bilateralidad del cáncer testicular, no siempre los tumores de ambos testículos muestran la misma histología, aunque sigue siendo el seminoma el tumor bilateral más frecuente.

### ***Histogénesis de los TCGT***

La histogénesis de los TCGT aún es motivo de discusión, surgiendo hipótesis controvertidas. Una hipótesis se basó en que el CIS se originaba de una parada de las células germinales fetales; por lo tanto, el cáncer testicular sería una enfermedad del desarrollo de la diferenciación de las células germinales. Esta sugerencia se hizo teniendo en cuenta estudios comparativos de expresión de proteínas, de expresión de genes y de expresión de RNA, los cuales demostraron una gran similitud del CIS con las células germinales primordiales y los gonocitos, los cuales también comparten muchas características de las células madres embrionarias.<sup>221</sup>

Tradicionalmente se describió que la célula germinal tenía dos caminos divergentes de diferenciación: uno terminal que era el seminoma y otro hacia la formación de un carcinoma embrionario, el cual posteriormente podría diferenciarse en otro u otros componentes no seminomatosos.<sup>316</sup> Sin embargo, Ulbrigh et al.<sup>297</sup> desarrollaron una nueva teoría de la histogénesis de estos tumores (Fig. 1), en la cual el seminoma no es una diferenciación terminal y puede actuar como precursor de algunos o de todos los tumores no seminomatosos.<sup>297</sup>

Fig. 1. Histogénesis de los tumores germinales de testículo



SE: Seminoma Espermatocítico, CG: Célula Germinal, TSEP: TSE Pediátrico, NITG: Neoplasia Intratubular Germinal, Sem: seminoma, Sem + DCT: Seminoma + Diferenciación Carcinomatosa Temprana, Sem + AFP: seminoma + AFP, Sem + SincTro: Seminoma + Sincitotrofoblasto, CE: Carcinoma Embrionario, CE + SincTro: Carcinoma Embrionario + Sincitotrofoblasto, CC: Coriocarcinoma, CE + AFP: Carcinoma Embrionario + AFP, TSE: Tumor de Seno Endodérmico, TI: Teratoma Inmaduro, TM: Teratoma Maduro. Tomado de Ulbrigh et al.<sup>297</sup>

El seminoma es un tumor de histogénesis controvertida, ya que no tiene una contrapartida embriológica, no existen modelos de tumorigénesis animal y no crece en cultivos de tejidos.<sup>187,188</sup> Recientemente, en estudios de citometría de flujo, se ha encontrado que tanto los seminomas como los tumores no seminomatosos y el CIS son aneuploides. El desarrollo simultáneo de un seminoma y de un tumor no seminomatoso, así como las hallazgos genéticos sobre el contenido de DNA, apoyaría la hipótesis de que el seminoma representaría un paso intermedio en la progresión de los TCGT.<sup>187,188</sup> En definitiva, aunque se desconoce la etiología de los TCGT, los estudios citogenéticos sugieren una patogénesis diferente para cada grupo de TCGT: TCGT infantiles/prepuberales, TCGT postpuberales y seminoma espermatocítico. La ITGCNU, el CIS, es la precursora de todos los TCGT, excluyendo el seminoma espermatocítico y los TCGT infantiles/prepuberales.



El seminoma es el TCGT más común en adultos y no aparece antes de los 5 años de edad. El seminoma espermatocítico, un tumor de hombres mayores, típicamente tiene un comportamiento clínico lento y rara vez experimenta una transformación sarcomatosa, la cual se asociaría a un comportamiento agresivo. El carcinoma embrionario es el componente más común de los TCGT mixtos. En la fase clínica I de los TCGT, se reconocen como predictores de metástasis oculta tanto la invasión vascular, como la presencia del componente de carcinoma embrionario cuando es igual o superior al 80% de la masa tumoral. En la mayoría de los pacientes con tumores prepuberales del saco vitelino, el TCGT pediátrico más común, la presentación de la enfermedad es en fase I, de ahí su buen pronóstico. La mayoría de los coriocarcinomas se presentan ya desde el momento del diagnóstico con evidentes síntomas de metástasis, debido a su propensión a desarrollar una rápida diseminación hematógena. Los teratomas en niños, sin tener en cuenta el grado de madurez, y los quistes dermoides en adultos, se consideran tumores benignos; por el contrario, los teratomas en adultos tienen frecuentemente un comportamiento maligno. Con todo, la mayoría de los TCGT con predominio del componente teratomatoso se curan con una terapia adecuada.<sup>14</sup>

Los TCGT infantiles difieren en muchos aspectos de los del hombre adulto y de los del viejo, por lo que, desde el punto de vista patogénico, se ha sugerido que pueden constituir un subgrupo aparte.<sup>210</sup> Estos aspectos incluyen: 1) lugar de presentación, 2) histología, 3) célula de origen, y 4) citogenética. La mayoría de los tumores de células germinales que ocurren antes de los 5 años de edad son extragonadales. Mientras que en pacientes adultos, más del 90% de los tumores germinales se desarrollan en las gónadas.<sup>59,105</sup> La localización más común de los tumores germinales extragonadales es la región sacrococcígea.<sup>95,253</sup> Si bien se ha sugerido ampliamente que el origen de los TCGT es en la célula primordial germinal; sin embargo, los TCGT infantiles se originan de las mismas células, pero en diferente estadio de maduración, con respecto a los TCGT desarrollados en adultos. Estos excepcionales casos infantiles pueden ser útiles para investigar acerca de los distintos genes que pudieran estar relacionados con el desarrollo de los TCGT infantiles y, de otra parte, investigar qué genes están involucrados en el desarrollo de un TCGT durante la vida adulta.

Atendiendo a la histología, la edad y los datos clínicos, los TCGT pueden dividirse en cuatro grupos:<sup>210,244</sup>

1. Teratomas maduros e inmaduros y Tumor del Seno Endodérmico de neonatos e infantiles (< 5 años)
2. TCGT de tipo adulto (seminomas y no seminomas)
3. Quiste dermoide (teratoma quístico adulto)
4. Seminoma espermatocítico de hombres viejos.

En un tumor germinal extragonadal, su diferenciación muy probablemente sea el resultado de una migración aberrante de células primordiales durante la embriogénesis.<sup>45,106</sup> Sin embargo, esto no excluye que estas células puedan tener una función en estos sitios extragonadales, por otra parte los tumores germinales extragonadales pueden no originarse de una célula germinal primordial, sino a partir de células madre indiferenciadas pluripotenciales, embrionarias o extraembrionarias, que hayan escapado a la influencia de los organizadores del desarrollo gonadal primario durante el periodo fetal.<sup>246</sup> De otra parte, la célula de origen de los TCGT infantiles y espermatocíticos permanece aún en debate. Sin embargo, y aunque numerosos estudios han comenzado a elucidar el origen celular de los diferentes subtipos de TCGT,<sup>271</sup> los seminomas parecen ser hipertriploides o tetraploides; contrariamente, los TCGT no seminomatosos parecen estar en un rango hipotriploide peritriploide.<sup>58,209,244,262</sup> Los tumores germinales del ovario son diploides, independientemente del grado de inmadurez, con excepción de los quistes dermoides.<sup>280</sup> Los teratomas sacrales infantiles son diploides, independientemente del grado de inmadurez.<sup>115,142,262</sup> Por último, los tumores del seno endodérmico de tipo infantil, son aneuploides, aunque también se han descrito algunos diploides.<sup>42,115,116</sup>

Los tumores infantiles, excepto por algunas publicaciones aisladas,<sup>124,270</sup> no parecen estar asociados con CIS, al menos en el estudio histopatológico de la biopsia testicular;<sup>107,133</sup> estos datos morfológicos determinan una diferencia sustancial entre los tumores germinales infantiles y los del adulto. Recientemente, Schneider et al.<sup>254</sup> describen un perfil de marcadores bastante constante, tanto de los tumores germinales gonadales como de los extragonadales. Este perfil molecular heredado de las células primordiales se borra supuestamente durante la migración de dichas células germinales desde el saco vitelino al surco gonadal, esto es, se produce antes de que las células germinales entren en meiosis.<sup>162</sup>

En definitiva, el seminoma clásico prolifera a partir de la línea de células germinales, mientras que los carcinomas embrionarios retienen características embrionarias que les

permiten diferenciarse hacia teratomas, los cuales diferencian varias líneas somáticas. Con todo, recientemente la revisión de la expresión génica del CIS y su comparación con la de las células germinales normales sugiere que CIS es el precursor común de los seminomas y de los TCG no-seminomatosos. La marcada heterogeneidad en el fenotipo de las células del CIS podría deberse a una parada o detención de la diferenciación celular, ya que esto provocaría que se retuviesen sólo parcialmente las características embrionarias, produciéndose, a la vez, un incremento en la inestabilidad genómica. Dependiendo del grado de diferenciación y de pluripotencialidad, las células del CIS encontradas en los pacientes adultos parecen estar predestinadas a seguir una progresión maligna en cualquiera de los dos tipos principales de tumores testiculares. Por último, la expresión persistente de rasgos embrionarios en las células del CIS, unida a la alta expresión de reguladores del ciclo celular -típica de las células germinales mitóticas- apoya la hipótesis, mantenida durante largo tiempo, de que las células del CIS se originan a partir de las células germinales primordiales o gonocitos, y no desde las células germinales del adulto. De otra parte, poco después del descubrimiento del CIS, se publicó que existía una sorprendente similitud morfológica entre las células del CIS y los gonocitos fetales, además, las células del CIS no sólo son muy similares a los gonocitos, sino también a las células del seminoma<sup>3,97,118,200</sup>

### ***Clasificación Clínica de los TCGT***

Clásicamente, la clasificación más utilizada en la última década del siglo XX fue la propuesta en 1997 por The American Joint Committee on Cancer y por la Union Internationale Contre le Cancer Tumor-node-metastasis (TNM) y en este sistema se incluyó por primera vez la invasión vascular y los marcadores séricos en la etapificación.<sup>5</sup> (Tablas 3 y 4). Pero en la actualidad la clasificación clínica universalmente admitida por todos los oncólogos es la Clasificación TNM de los Tumores de Células Germinales Testiculares WHO 2004 de la Organización Mundial de la Salud (Tablas 5 y 6)

**Tabla 3.** Clasificación clínica de los tumores germinales testiculares

<b>Sistema TNM (AJCC y UICC)</b>			
pTX Estado del testículo no conocido			
pT0 Primario no aparente (incluye cicatrices)			
pTis Tumor intratubular, sin invasión			
pT1 Solo testículo y epidídimo; sin invasión vascular			
pT2 Testículo y epidídimo con invasión vascular, o que atraviesa la albugínea y la túnica vaginalis.			
pT3 Cordón espermático			
pT4 Escroto			
pNx Estado de los ganglios linfáticos no conocido			
pN0 Sin metástasis ganglionares			
pN1 masa ganglionar o nódulo único $\leq 2$ cm, o múltiples ganglios afectados y ninguno $> 2$ cm			
pN2 masa ganglionar $> 2$ cm pero $\leq 5$ cm, o múltiples ganglios $> 2$ cm pero $\leq 5$ cm, o con extensión extraganglionar			
pN3 masa ganglionar $> 5$ cm			
Mx Metástasis no conocidas			
M0 Sin metástasis			
M1 a ganglios regionales negativos, o pulmón negativo			
M1b metástasis a distancia otras que ganglios regionales o pulmón.			
Sx Marcadores séricos no disponibles			
S0 Marcadores séricos normales			
	<b>LDH</b>	<b>HCG (mIU/ml)</b>	<b>AFP (ng/ml)</b>
S1	$< 1,5 \times N$	y $< 5000$	y $< 1000$
S2	1,5-10xN	ó 5.000-50.000	ó 1.000-10.000
S3	$> 10 \times N$	ó $> 50.000$	ó $> 10.000$
pTX Estado del testículo no conocido			

**Tabla 4.** Clasificación clínica de los tumores germinales testiculares

Etapa Clínica	
EC 0	Tis N0 M0 S0
EC IA	T1 N0 M0 S0
EC IB	T2-T4 N0 M0 S0
EC IS	cualquier T N0 M0 S1-S3
EC IIA	cualquier T N0 M0
EC IIB	cualquier T N2 M0 S0-S1
EC IIC	cualquier T N3 M0 S0-S1
EC IIIA	cualquier T y N M1a S0-S1
EC IIIB	cualquier T y N M0-M1a S2
EC IIIC	cualquier T y N M1a S3
	cualquier T y N M1b
	cualquier S

**Tabla 5.** TNM de los Tumores de Células Germinales Testiculares WHO 2004

Clasificación TNM
<p><b>T – Tumor primario</b></p> <p>Excepto para pTis y pT4, donde la orquiectomía radical no siempre es necesaria para propósitos de clasificación; la extensión del tumor primario se clasifica después de la orquiectomía radical; ver pT. En otras circunstancias, se usa TX si no se ha realizado orquiectomía radical</p>
<p><b>N – Nódulos linfáticos regionales</b></p> <p>NX No pueden establecerse nódulos linfáticos regionales</p> <p>NO Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales</p> <p>N1 Metástasis con masa en nódulo linfático <math>\leq 2</math> cm, o nódulos linfáticos múltiples pero ninguno <math>&gt; 2</math> cm</p> <p>N2 Metástasis con masa en nódulo linfático <math>&gt; 2</math> cm y <math>\leq 5</math> cm, o nódulos linfáticos múltiples, siendo cualquier masa <math>&gt; 2</math> cm pero <math>\leq 5</math> cm</p> <p>N3 Metástasis con masa en nódulo linfático <math>&gt; 5</math> cm</p>
<p><b>M – Metástasis distantes</b></p> <p>MX No pueden establecerse metástasis distantes</p> <p>MO Sin metástasis distantes</p> <p>M1 Metástasis distantes</p> <p>M1a Sin nódulos linfáticos regionales o en pulmón</p> <p>M1b Otros lugares</p>

**Tabla 6.** Clasificación TNM de los Tumores de Células Germinales Testiculares WHO 2004 de la Organización Mundial de la Salud

<b>Clasificación Patológica pTNM</b>			
<b>pT – Tumor primario</b>			
pTX	No puede establecerse el tumor primario (ver T-tumor primario, Tabla 3)		
pT0	Sin evidencia de tumor primario (scar histológico en testículo)		
pTis	Neoplasia intratubular de células germinales (carcinoma in situ)		
pT1	Tumor limitado a testículo y epidídimo sin invasión vascular/linfática; el tumor puede invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginalis		
pT2	Tumor limitado a testículo y epidídimo sin invasión vascular/linfática, o tumor que se extiende a través de la túnica albugínea con afectación de la túnica vaginalis		
pT3	El tumor invade el cordón espermático con o sin invasión vascular/linfática		
pT4	El tumor invade el escroto con o sin invasión vascular/linfática		
<b>pN – Nódulos linfáticos regionales</b>			
pNX	No pueden establecerse nódulos linfáticos regionales		
pNO	Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales		
pN1	Metástasis con una masa en nódulo linfático $\leq 2$ cm y 5 o menos nódulos positivos, ninguno $> 2$ cm		
pN2	Metástasis con una masa en nódulo linfático $>2$ cm $\leq 5$ cm, o más de 5 nódulos positivos ninguno $> 5$ cm; o evidencia de extensión extranodal del tumor		
pN3	Metástasis con una masa en nódulo linfático $> 5$ cm		
<b>S – Marcadores tumorales del suero</b>			
SX	Estudio de marcadores del suero no disponibles o no realizados		
S0	Estudio de marcadores del suero con niveles dentro de los límites normales		
	<b>LDH</b>	<b>hCG (mIU/ml)</b>	<b>AFP (ng/ml)</b>
S1	$>1,5xN$	and $>5.000$	and $>1.000$
S2	$1,5-10xN$	or $5.000-50.000$	or $1.000-10.000$
S3	$>10xN$	or $>50.000$	or $>10.000$

### ***Variedades Histológicas de los TCGT***

La ITGCNU, esto es, el CIS, es el precursor de todos los tumores germinales invasivos, con excepción de las siguientes variedades de TCGT: el seminoma espermatocítico, el tumor del seno endodérmico infantil y el teratoma infantil. La ITGCNU se caracteriza por la presencia de células germinales malignas dentro del tubo seminífero, las cuales se asemejan a las células del seminoma. El CIS es posible encontrarlo en casi todos los TCGT invasivos en los que quedan tubos seminíferos residuales, se observa también en el 5-8% de los testículos criptorquídicos<sup>87,215</sup> y en el 5% de los testículos contralaterales de los pacientes con un tumor germinal<sup>306</sup> y aún es más frecuentemente en las gónadas disgenéticas. El 50% de los pacientes en los que se detecta una ITGCNU pueden desarrollar una neoplasia invasora en 5 años.<sup>265</sup> Con frecuencia, la ITGCNU invade en forma pagetoide la rete testis, y con menor frecuencia el epidídimo. Microscópicamente, las células del CIS son semejantes a las del seminoma y se encuentran cerca de la membrana basal de la pared peritubular, la cual suele estar engrosada y, por ello, se reduce el diámetro de los tubos seminíferos; además por lo general, estas células de CIS no llenan la luz tubular. Sin embargo, en aquellos casos en los que toda la superficie tubular está ocupada por células malignas, se utilizan términos, dependiendo de la morfología celular, de seminoma intratubular, o de carcinoma embrionario intratubular, etc. Histoquímicamente, de igual forma que en el seminoma, las células del CIS y de los seminomas intratubulares son PAS positivas y diastasa lábiles y son positivas para la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), y, por último, las células de CIS muestran un característico patrón de membrana para c-Kit (CD117).<sup>40,291</sup>

### **Seminoma**

El seminoma, también denominado como seminoma clásico o seminoma puro, es el tumor testicular más frecuentemente diagnosticado, y su incidencia es superior a

l 50% de todos los tumores germinales.<sup>140,307</sup> La edad media de presentación es de 40,5 años, es extremadamente raro en niños menores de 10 años de edad y poco común en adolescentes<sup>136</sup> y en mayores de 60 años de edad. Al momento de la presentación, el 75% de los pacientes tienen enfermedad limitada al testículo, 20% tienen enfermedad retroperitoneal y 5% tienen enfermedad supradiafragmática o visceral.<sup>297</sup> El cuadro clínico más común es un

aumento del tamaño testicular detectado por el propio paciente, el 10% pueden tener dolor agudo y menos del 3% tienen síntomas asociados a metástasis.

Los niveles de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica ( $\beta$ HCG) están elevados entre el 7-25% de los casos de pacientes con seminoma, sobre todo si tienen células del sincitotrofoblasto o si el paciente tiene metástasis.<sup>87</sup> Los niveles de  $\beta$ HCG se correlacionan con la presencia de metástasis más que con el pronóstico.<sup>122</sup> De otra parte, si se encuentran niveles elevados de alfa feto proteína (AFP) debe muestrearse mejor el tumor en busca de un componente no seminomatoso.

El tamaño medio de los seminomas varía de 3,5 a 5 cm. aunque pueden llegar a medir hasta 10 cm. de diámetro, y rara vez el testículo puede ser de tamaño normal o aún más pequeño. El 90% de los casos se encuentran confinados macroscópicamente al testículo. En la superficie de corte, los seminomas son de color crema o café claro, homogéneos, lobulados, y pueden verse focos de necrosis y hemorragia, sobre todo en tumores grandes.

Microscópicamente, las células del seminoma tienen de abundante citoplasma claro, de límites bien definidos, el núcleo es central, grande, con cromatina granular bien distribuida con uno o más nucleolos prominentes, generalmente las mitosis son frecuentes pero aún si son muy abundantes esto, no tienen influencia pronóstica; es posible observar células del sincitotrofoblasto alrededor de focos de hemorragia, la diferencia con el coriocarcinoma es que no existe citotrofoblasto. Los seminomas se caracterizan por la formación de nidos celulares, rodeados por septos generalmente finos de tejido conectivo; ocasionalmente pueden verse trabéculas o cordones y más raro aún una disposición tubular; asimismo, muchos tumores obliteran por completo los túbulos seminíferos en el centro del tumor, pero pueden dejar una corona residual en la periferia de parénquima testicular no infiltrado por el tumor. Los tabique conjuntivos intratumorales contienen abundantes linfocitos maduros que pueden llegar a formar centros germinales, rara vez puede haber eosinófilos y células plasmáticas, histiocitos e incluso una reacción granulomatosa con células gigantes tipo Langhans; la mayoría de los linfocitos son T con un fenotipo  $\gamma/\delta$ .<sup>315,325</sup>

Mediante métodos inmunohistoquímicos se demuestra que las células del seminoma son usualmente negativas para citoqueratinas o puede verse positividad aislada en gotas, son positivas para la fosfatasa alcalina placentaria, denominada como PLAP.<sup>40</sup> Las células del



sincitotrofoblasto son positivas para CK y para  $\beta$ HCG. Si un seminoma es positivo para CK indica una diferenciación inicial de un carcinoma embrionario.

El diagnóstico del seminoma, dadas sus típicas características microscópicas, es fácil y generalmente no plantea dudas diagnósticas; sin embargo, cuando los seminomas se encuentran mal conservados por falta de fijación pueden confundirse con un carcinoma embrionario, aunque la diferencia radica en que este último es francamente pleomórfico, con un alto índice mitótico. Otro diagnóstico diferencial debe establecerse entre los seminomas y algunos casos con predominio de patrón sólido del tumor del seno endodérmico; con todo, deben buscarse áreas clásicas de tumor del seno, en el que las células son de núcleo más pequeño, sin nucleolo prominente y existen globos hialinos, además, inmunohistoquímicamente las células de los tumores del seno endodérmico son positivas para CK, AFP y  $\alpha_1$ antitripsina. Rara vez los seminomas se confunden con linfomas, sin embargo los linfomas suelen ser bilaterales y presentarse en hombres mayores de 60 años; tiene un patrón de crecimiento intersticial y no se encuentra asociado a ITGCNU, la cual es una neoplasia positiva para antígeno común leucocitario y negativo para PLAP.

El seminoma espermatocítico fue descrito por Masson<sup>166</sup> en 1946, quien lo refirió como un tumor que semejava la espermatogénesis;<sup>166</sup> ocupa el 1% de los seminomas, la edad media de presentación es a los 55 años, y el 9% son bilaterales.<sup>41</sup> A diferencia del seminoma clásico, el seminoma espermatocítico es más frecuente en hombres mayores, no ocurre fuera del testículo y no tiene contraparte en el ovario; no se asocia con NITG, criptorquidea y casi nunca metastatiza.<sup>297</sup> Existe evidencia de que las células de este tumor tienen la capacidad de madurar al estadio de espermatogonia-espermatocito.<sup>271</sup> Se han descrito casos excepcionales de transformación sarcomatosa que pueden causar la muerte,<sup>294</sup> fuera de esta eventualidad tienen un pronóstico excelente.

Macroscópicamente los seminomas espermatocíticos están bien limitados, generalmente más grandes que los seminomas clásicos, multilobulados y blandos con áreas quísticas. Histológicamente, las células están dispuestas en sábanas con escaso estroma, este puede ser edematoso y dar un aspecto de pseudoquistes o pseudoglandular, la neoplasia está formada por tres tipos de células: pequeñas, intermedias y gigantes; los bordes celulares son poco prominentes, el índice mitótico es alto, y son atípicas cuando se ha producido una degeneración

sarcomatosa<sup>294</sup> Son negativos para glucógeno, PLAP y CK, aunque pueden dar positividad aislada en forma de gotas como el seminoma.

### **Carcinoma Embrionario**

Los carcinomas embrionarios puros son poco frecuentes y comprenden el 2% de las neoplasias germinales;<sup>297</sup> cuando se trata de un tumor germinal mixto, el 90% de ellos contiene carcinoma embrionario.<sup>140</sup> Los carcinoma embrionarios puros ocurren en jóvenes entre los 20 y 30 años de edad y es muy raro en pre-púberes.<sup>107</sup> En el 80,5% de los pacientes se presenta por masa testicular y solo en el 40% de los pacientes se presenta cuando el tumor está limitado al testículo, dos terceras partes de los pacientes tienen enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico.<sup>234</sup> Cuando son puros no elevan la AFP, si se encuentra elevada puede significar que un TSE pasó inadvertido o bien que se trata de una transformación inicial a TSE.<sup>317</sup>

Macroscópicamente, el tumor es blando con numerosas áreas de necrosis y hemorragia y es de límites imprecisos, cerca del 25% afecta los anexos testiculares.<sup>234</sup>

Histológicamente, existen varios patrones de presentación, pueden ser sólidos, tubulares, tubulopapilares, o micropapilares. Lo frecuente es que coexistan varios patrones a la vez y el más común es el tubulopapilar. Las células contienen abundante citoplasma, rara vez es claro, con bordes mal definidos; los núcleos son grandes de cromatina grumosa, macronucleolo y membrana nuclear irregular. Las mitosis y la apoptosis es común, la asociación con NITG es frecuente sobre todo en la periferia, la invasión vascular es frecuente y se asocia con un 40% de metástasis ganglionares.<sup>112</sup> En este tipo de tumor falta el infiltrado linfoide o la respuesta granulomatosa característica del seminoma. Los métodos inmunohistoquímicos demuestran que estas células son positivas para PLAP, citoqueratinas (A1/A3, CAM 5.2) y CD30, y solo el 2% son positivas para AME.<sup>199</sup>

Los diagnósticos diferenciales de los carcinomas embrionarios deben establecerse con algunos seminomas anaplásicos, con tumores del seno endodérmico, y con linfomas anaplásicos; aunque estos últimos también expresan CD30, los linfomas suelen presentarse en hombres viejos, son bilaterales y se acompañan de enfermedad extragonadal, además tienen ausencia de una intensa positividad para CK.<sup>71</sup> Por último, otra lesión que puede confundirse es un carcinoma metastático poco diferenciado, para lo que debe buscarse producción de mucinas, además de la correlación con los datos clínicos.

## Tumor de Seno Endodérmico

El tumor de seno endodérmico representa el 80% de los tumores germinales en niños, la edad varía entre 18 meses y 17 años de edad<sup>135</sup> y casi siempre es puro; en contraste, cuando se presenta en adultos casi siempre es componente de un tumor germinal mixto y esto ocurre en el 44% de los casos.<sup>284</sup> La edad media en estos casos es de 17-70 años de edad.<sup>241</sup>

Existe diferencia en los TSE en los niños y los adultos, en los primeros el tumor se presenta con igual frecuencia en afro-americanos que en blancos, se encuentra limitado al testículo en un 84-94%,<sup>100</sup> no se asocia con criptorquidea, ni con NITG, y, además, tiene baja incidencia de metástasis a ganglios retroperitoneales, y metastatiza con mayor frecuencia a pulmón. Estas diferencias sugieren una histogénesis diferente de este tumor según el grupo de edad.

Existe evidencia de que los adultos con tumores germinales mixtos que tienen componente de TSE tienen mejor pronóstico; sin embargo, cuando este componente se presenta en las metástasis el pronóstico es malo.<sup>150</sup> Cuando existe este componente, el 95-100% tienen elevada la AFP en suero en un rango de cientos a miles nanogramos por mililitro.<sup>285</sup>

Macroscópicamente, son tumores no encapsulados, gris amarillentos, con áreas mixoides o quísticas, en los tumores germinales mixtos este componente produce áreas de hemorragia y necrosis.

Histológicamente, es un tumor muy heterogéneo, con numerosos patrones histológicos; se han descrito hasta 11 patrones diferentes:<sup>297</sup> reticular o microquístico (más común), macroquístico, de senos endodérmicos, papilar, sólido, glandular y alveolar, mixoide, sarcomatoide, polivesicular, hepatoide y parietal. Una de las características más distintivas, aunque no siempre se observa, es la presencia de cuerpos hialinos eosinófilos intra o extracelular, PAS + diastasa resistente y negativos para AFP. Por IH son positivos para AFP en un 74-100% de forma focal,<sup>199</sup> el 50% son positivos para alfa 1 Antitripsina,<sup>297</sup> además, las CK son positivas y el CD30 y AME son negativos.

El diagnóstico diferencial de los tumores del seno endodérmico es en algunos casos particularmente muy difícil: el patrón sólido del tumor del seno endodérmico puede ser confundido con un seminoma, el patrón glandular puro puede semejar un teratoma inmaduro y

la diferencia consiste en que el TSE posee glándulas más tortuosas y ramificadas. La diferencia clínica más importante es con el tumor juvenil de células de la granulosa, ya que ambos tienen áreas sólidas y quísticas, sin embargo las células del tumor del seno endodérmico son más primitivas y además el tumor juvenil de células de la granulosa es positivo para inhibina A.

### **Coriocarcinoma**

En su forma pura es un tumor muy raro, ocupa menos del 0,5% de todos los tumores testiculares<sup>160</sup> y el 16% de los tumores germinales mixtos (TGM)<sup>140</sup> y no se presenta en niños, con mayor frecuencia que los otros tumores testiculares, los pacientes se presentan con metástasis al momento del diagnóstico, en diferentes órganos por diseminación hematogena.<sup>297</sup> Existe una marcada elevación de  $\beta$ -HCG<sup>297</sup> que puede producir ginecomastia en el 10% de los pacientes. Cuando estos tumores son puros, son pequeños y hasta de aspecto atrófico, a la sección son hemorrágicos y necróticos. En los TGM se encuentran en las áreas intensamente hemorrágicas.

Histológicamente, se caracteriza por la presencia de cito y sincitotrofoblasto, con invasión vascular importante. Por IH el sincitotrofoblasto es positivo para  $\beta$ -HCG y para PLAP.<sup>160</sup> El diagnóstico diferencial es con un testículo hemorrágico por torsión y con otros tumores que contienen células de sincitotrofoblasto.

### **Teratoma**

El comportamiento biológico de estos tumores es distinto según la edad de presentación. En niños, ocurre en menores de 4 años y es el segundo tumor germinal más frecuente con un 14-20% de los casos, es puro e invariablemente benigno, aunque existan elementos inmaduros. Además de que no se asocia con NITG. En los adultos, se presenta en el 50% de los TGM<sup>297</sup> y, cuando son puros, son malignos a pesar de su apariencia madura, y tienen el potencial de dar metástasis de elementos teratomatosos o no teratomatosos, soportado por la hipótesis de que existen elementos precursores en el tumor primario (carcinoma embrionario),<sup>297</sup> la incidencia de metástasis es de un 25-63%.<sup>147</sup>

Los teratomas macroscópicamente son lobulados, con áreas sólidas y quísticas, puede haber quistes de queratina, pero no se observa pelos. Histológicamente están formados por elementos que semejan tejido embrionario, no siempre de las tres capas germinales y con

diferente grado de maduración; en contraste con el ovario, la cantidad o la graduación del tejido inmaduro no tiene importancia pronóstica. Puede ocurrir malignización secundaria, los sarcomas son los más comunes, principalmente Rbdomiosarcoma o tumor neuroectodérmico primitivo<sup>189</sup> Casi nunca es necesario recurrir a la IH sin embargo se ha reportado positividad para AFP en los elementos glandulares y hepatocelulares, el PLAP puede ser positivo en el 4-27% de los casos.<sup>297</sup> El diagnóstico diferencial de los teratomas debe establecerse con quistes dermoides, los cuales no tienen potencial metastático, la diferencia consiste en que los quistes dermoides contienen elementos de origen epidérmico y pelos y ausencia de elementos sólidos o atipia.<sup>298</sup>

### **Tumores Germinales Mixtos**

Es el segundo tumor germinal más común y representa entre un 40-45% de los casos, está formado por más de un tipo de tumor germinal, y se presentan alrededor de los 30 años de edad. Las combinaciones más comunes son: CE y teratoma (26%), CE y seminoma (16%) y CE, TSE y teratoma (11%).<sup>140</sup> La elevación de los marcadores séricos depende de los tipos que forman el tumor. Macroscópicamente son muy heterogéneos y reflejan la mezcla de tumores, histológicamente los tumores son idénticos a los descritos con anterioridad, es importante describir en el reporte la presencia y cantidad de cada elemento porque tiene implicación pronóstica.

Los parámetros que deben ser incluidos en el informe anatomopatológico de un TCGT, con el fin de establecer futuros criterios pronóstico y pautas terapéuticas, vienen recogidos en la Tabla 7; siendo de especial relevancia el constatar el tipo histológico del tumor, el tamaño tumoral, la infiltración a los tejidos adyacentes, las metástasis loco-regionales y a distancia, y, de una manera preeminente, el establecer el estadio patológico del tumor, que deberá después cotejarse con el estadio clínico.

**Tabla 7.** Información que debe ser incluida en el reporte anatomopatológico de un tumor germinal testicular.

<b>Tumor Primario</b>
Tamaño tumoral
Tipo histológico:
puro
mixto (indicar: componentes y porcentajes)
Invasión vascular:
presente
ausente
indeterminada
Extensión del tumor:
confinado al testículo
túnica albugínea
túnica vaginalis
epidídimo
cordón espermático
escroto
Márgenes del cordón espermático
NITG
<b>Tumor Metastático</b>
Número de ganglios linfáticos examinados
Número de ganglios linfáticos positivos
Tamaño del ganglio metastático más grande
Extensión extranodal:
presente
ausente
Tipo histológico:
si es mixto: indicar componentes y porcentajes

### ***Tratamiento de los Tumores Germinales Testiculares***

Los nuevos protocolos de tratamiento de los TCGT han obtenido resultados muy satisfactorios y, en la época actual, más del 90% de los TCGT se curan, de modo que la sobrevida global es superior al 95%.<sup>72</sup>

El tratamiento de elección para cualquier tumor testicular es la orquiectomía radical, vía inguinal, seguida de un estudio histopatológico que debe contener todos los parámetros señalados en la tabla 3, seguido de etapificación clínica con estudios de imagen, marcadores tumorales, para conocer la extensión de la enfermedad y poder establecer tratamiento.<sup>231</sup> Para los seminomas estadio I, que corresponde al 80% de los seminomas testiculares<sup>67</sup> la orquiectomía proporciona una tasa de supervivencia del 85%. Si se agrega radioterapia postorquiectomía a ganglios paraórticos y pélvicos bilaterales la tasa de supervivencia aumenta al 95-97% con muy pocas complicaciones, siempre y cuando se protejan adecuadamente los hilios renales, sobre todo el del lado izquierdo.<sup>163</sup> Para los pacientes con EC II y III se agrega a la radioterapia, quimioterapia con Cisplatino.<sup>323</sup>

El tratamiento de los TCGNS está basado sobre todo en la cirugía y la quimioterapia, aunque la radioterapia puede ser útil en algunos casos. Fung et al., en 1988,<sup>78</sup> proponen cirugía y vigilancia si no existe ninguno de los factores de riesgo y si existen todos, disección radical de ganglios retroperitoneales y quimioterapia, y si son positivos 1 ó 2 ganglios, disección radical de ganglios retroperitoneales. Según Marks et al.,<sup>163</sup> la radioterapia infradiafragmática es una opción aceptable de tratamiento para el estadio I, ya que la tasa de supervivencia en todos los casos es prácticamente del 100%.

Los TCGNS en los estadios II y más avanzados el tratamiento está basado sobre todo en la cirugía y la poliquimioterapia en la que se incluye Cisplatino.<sup>34</sup> Con esta terapia se obtiene el 70% de remisiones. La radioterapia o la cirugía pueden usarse como coadyuvantes, sobre todo para eliminar masas residuales.<sup>242</sup> En TCGNS estadio II, sin evidencia de masa retroperitoneal, la linfadenectomía retroperitoneal radical, seguida de quimioterapia selectiva es una alternativa a la inducción de la remisión, por quimioterapia como tratamiento primario.<sup>26</sup>

## ***Marcadores Biológicos Séricos en Tumores Testiculares***

La detección en suero y en los tejidos de sustancias sintetizadas por las células tumorales ha tenido gran aplicación en la detección y seguimiento de los pacientes conTCGT, las proteínas más constantes en su expresión son la AFP y la HCG.<sup>128</sup>

### **Alfa Feto Proteína**

Los valores de esta proteína alcanzan al año de edad<sup>128</sup> 40 ng/ml, y su vida media es de 5 días. El 85-87% de los carcinoma embrionario eleva la AFP, no así los teratomas o los seminomas; si en un paciente con seminoma puro se eleva la AFP esto indica la existencia de CE en el primario o en las metástasis. Debe tenerse en cuenta que otros procesos malignos y benignos pueden elevar la AFP como son: el hepatocarcinoma, el carcinoma del páncreas, el carcinoma gástrico, el carcinoma del colon, la cirrosis, la hepatitis viral, etc. Los métodos inmunohistoquímicos realizados en los tejidos solo dan positividad para la AFP en las células embrionarias y en las células del saco vitelino.<sup>272</sup>

### **Gonadotropina Coriónica Humana**

Los valores normales en suero son de 1 ng/ml y su vida media es de 12 h. Se eleva en el 100% de los coriocarcinomas y en el 7,7% de los seminomas cuando se encuentran células del sincitotrofobalsto, esto ocurre también en el 25% de los TSE y 80% de los CE.<sup>128</sup>

## ***Factores Pronósticos de los TCGT***

La utilidad de los marcadores séricos en los TCGT puede centrarse en tres aspectos fundamentales: 1) Estadiaje de los tumores testiculares; 2) Indicadores pronósticos, y 3) Evaluación de recurrencia. Con respecto al estadiaje, se considera que un paciente se encuentra en estadio clínico II o III si después de la orquidectomía o la linfadectomía retroperitoneal persiste la elevación de estos marcadores.<sup>128</sup> Se consideran indicadores de mal pronóstico los siguientes hallazgos: niveles de AFP antes del tratamiento mayores de 500-1000 ng/ml, y también niveles de HCG mayores de 1000 ng/ml.<sup>272</sup> La elevación de estos marcadores, después de tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia, indica recurrencia tumoral y persistencia de la enfermedad tumoral activa.<sup>23</sup>



En el caso del seminoma se han hecho estudios recientes donde se demuestra que son parámetros independientes para pronóstico de recidiva tumoral los siguientes: edad menor a 30 años, tumor mayor de 6 cm, invasión vascular o linfática, invasión a la rete testis y disminución del infiltrado linfocítico tumoral (ILT), sin embargo cuando se hizo un análisis univariado solo la edad y el tamaño tumoral fueron estadísticamente significativos y la disminución del ILT estuvo en el límite del significado estadístico.<sup>212</sup>

La mayor parte de los estudios sobre factores pronósticos se centran en los TCGNS, sobre todo en los de estadio I<sup>129</sup> concluyendo que la presencia de invasión vascular linfática y/o venosa en el tumor primario es un factor pronóstico estadísticamente significativo, ligado a la mayor presencia de metástasis en ganglios retroperitoneales.

Por otra parte la presencia de carcinoma embrionario es un factor pronóstico independiente, ya que se relaciona con una mayor tasa de metástasis<sup>114</sup>. La ausencia de teratoma o de elementos de seno endodérmico fueron factores pronósticos significativos en la aparición de metástasis.<sup>114</sup> Las cifras de AFP pre-orquiectomía también tienen un valor pronóstico significativo.<sup>114</sup> Teniendo en cuenta estos datos, pacientes con estadio clínico I de TCGNS que tengan carcinoma embrionario, invasión vascular y/o linfática en el tumor primario e invasión del cordón espermático o epidídimo es probable que tengan metástasis ocultas en ganglios retroperitoneales y/o extralinfáticas. En estos casos sería de elección la linfadenectomía.<sup>194</sup>

### ***Nuevas Moléculas en el Cáncer Testicular***

En el desarrollo de un tumor maligno, incluidos los TCGT, se han identificado seis mecanismos principales que son clave en los proceso carcinogénicos: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a los inhibidores del crecimiento, presencia de apoptosis, disminución de la limitación para la replicación, angiogénesis sostenida, e invasión tisular y metástasis.<sup>104</sup>

Está completamente establecido que todos los TGCT seminomas y no seminomas así como el CIS son aneuploides, la única anomalía cromosómica estructural consistente en los tumores invasivos es la ganancia del brazo corto del cromosoma 12, principalmente debido a la formación de un isocromosoma (i(12p)), sugiriendo que un aumento en el número de copias del gen 12p está asociado con el desarrollo de las manifestaciones clínicas.<sup>153</sup>

Los tumores testiculares infantiles muestran consistentemente ganancia 12q, ya sea mediante generación de una o más copias de i(12q) o por vías alternas, como un número importante de copias de amplificaciones de partes definidas de 12q.<sup>244,277,302</sup> Los TCGT son infrecuentes en niños y representan el 3% de todas las neoplasias pediátricas.<sup>321</sup> A pesar de los numerosos genes candidatos, la identificación de un gen causal ha sido impedida por el hecho de que muchas de las ganancias de 12q involucran intervalos genómicos largos que contienen un inmanejable número de genes candidatos.<sup>153</sup>

La observación de la tendencia familiar del cáncer testicular<sup>65,110</sup> y la alta frecuencia de bilateralidad<sup>198</sup> sugiere que los tumores germinales tienen predisposición hereditaria, siguiendo un modelo de herencia recesiva sumada a aneuploidía. Atkin y Baker,<sup>11</sup> en 1982, son los primeros en describir que muchos de los genes de los tumores germinales se caracterizan por la presencia de isocromosomas 12p,i (12p). La i(12p) es común en todos los subtipos histológicos de tumores germinales, pero los no-seminomatosos tienen un número mayor de copias de esta aberración que los seminomas.<sup>235,244</sup> La i(12p) se encuentra en más del 80% de los tumores germinales y se usa como marcador diagnóstico para verificar el origen germinal. El análisis citogenético de aneuploidia del CIS sólo revela la presencia de i(12P) en algunos casos.<sup>302,309</sup> Así mismo, los datos obtenidos sugieren que la ganancia de la secuencia 12p está asociada con la supresión de la apoptosis y la independencia de la función de regulación esteroideogénica de las células de Sertoli de las células del CIS.<sup>153</sup> Hasta ahora DAD-R es uno de los genes candidatos más probables en este proceso, posiblemente por la vía N-glicosilación.<sup>153</sup>

De otra parte, estudios moleculares de citogenética no encuentran un incremento en el número de copias de 12p,<sup>239</sup> por lo que la ganancia de 12p parece estar asociada con el fenotipo invasivo de los tumores germinales; el incremento en el número de copias de 12p parece facilitar la supervivencia de las células tumorales fuera del tubo seminífero.<sup>238</sup> La inestabilidad de microsatélites no es común en los tumores germinales,<sup>216</sup> aunque se ha descrito algún sitio específico de inestabilidad.<sup>70,197</sup> Un estudio reciente de Mayer et al. encontró un microsatélite inestable en los tumores germinales, asociado con la resistencia al tratamiento sistémico.<sup>169</sup> De cualquier forma, los tumores germinales son muy aneuploides, y el patrón genómico de ganancia y pérdida es estricto y se localiza en el brazo largo del cromosoma 17.<sup>141</sup> Debido a que la expresión de genes puede ser alterada según el número de copias de ADN, la combinación de fenotipos de los genes localizados dentro de una región genómica particular

decide cuando es favorable la ganancia en los tumores germinales. Los estudios relativos a la sobre-expresión génica a pequeña escala indican que los tumores germinales sobre-expresan el protooncogén MYCN<sup>260</sup> y el CCND2.<sup>20,50,123,252,261</sup> Además, se han encontrado numerosos E-Boxes -sitio de unión del ADN a la familia de proteínas MYC- en la región promotora de CCND2, y se ha demostrado que la sobre-expresión induce inestabilidad cromosómica y extra-cromosómica de CCND2 y 12p13.<sup>157</sup> De otra parte, amplificaciones del MYCN también son frecuentes en los neuroblastomas, y así mismo se ha descrito la ganancia de 17q,<sup>145,208</sup> otra región con un número incrementado de copias en los tumores germinales.<sup>141</sup>

Estos tumores muestran consistentemente ganancia 12q, ya sea mediante generación de una o más copias de i(12q) o por vías alternas, como un número importante de copias de amplificaciones de partes definidas de 12q.<sup>244,277,302</sup>

Está, pues, completamente demostrado que los tumores invasivos de células germinales - tanto los seminomatosos como los no seminomatosos, así como el CIS- son aneuploides. La única anomalía estructural constante en los tumores invasivos es una ganancia en el brazo corto del cromosoma 12, en gran parte debida a la formación de isocromosomas i(12p). Esto sugiere un incremento en el número de copias del gen asociado con el desarrollo clínico del tumor germinal invasivo. En esta revisión, los datos que se presentan son compatibles con el modelo de ganancia de 12p, asociado con la supresión de la apoptosis y la independencia de las células de Sertoli del CIS; DAD-R es uno de los genes con más posibilidades de estar involucrado en este proceso, posiblemente mediante la N-glucosilación. Esta distribución puede ser explicada por la ruta de migración que toman las células germinales durante la embriogénesis.<sup>8</sup> El CIS está compuesto por células que se consideran la contraparte premaligna de las células germinales embrionarias, sobre todo del gonocito o célula primordial germinal. Este punto de vista está avalado por evidencias morfológicas y de IH.<sup>180,324</sup> Los seminomas están compuestos por células morfológicamente similares a las células primordiales y a las del CIS. Los tumores no-seminomatosos pueden tener diferentes elementos histológicos. El factor de transcripción OCT -también conocido como POU5F1- es significativo, este factor de transcripción se expresa específicamente en el CIS, en el seminoma y en las células de carcinoma embrionario,<sup>151</sup> lo que está en consonancia con su presumible omnipotencia.

La aberración estructural cromosómica más detectada en el TCG invasivo es la ganancia de material 12p, más frecuentemente como i(12p).<sup>244</sup> Este isocromosoma fue descrito por

primera vez en 1982 por Atkin y Baker,<sup>11,12</sup> y ahora se considera característico del TCG invasivo.<sup>177</sup> El protooncogén KRAS2 está realmente mutado y sobre-expresado en el tumor invasivo y no se considera un gen candidato.<sup>192,266,322</sup> Otro gen 12p estudiado como candidato es la ciclina D2 (CCND2),<sup>123,266,252</sup> en el que también existe un punto desregulado, en la fase G1-S, debido a la sobre-expresión de CCND2; esto ofrece una buena explicación para el desarrollo de tumores germinales invasivos de tipo II. Sin embargo, no se dispone de evidencias convincentes relacionadas con el desarrollo temprano del cáncer.

Con respecto al gen que codifica el factor de transcripción SOX5, del que ahora se sabe se expresa durante los estadios tardíos de la espermatogénesis<sup>319</sup> dentro de SROA, no se le considera un buen candidato porque no se observa sobre-regulación de la expresión en los casos de amplificación,<sup>237</sup> sumamente arracimada tanto en el lado centromérico como telomérico del lado de SROA.<sup>123,237</sup> El gen que muestra mayor amplificación es DAD-R.<sup>322</sup> Todos los tumores invasivos, tanto seminomatosos como no-seminomatosos, muestran un alto nivel de expresión comparado con el parénquima testicular y con el CIS; además, se encuentra un nivel de expresión de DAD-R significativamente alto en seminomas con amplificación restringida de 12p, comparado con los que no lo tenían. De hecho, los niveles de expresión fueron los mismos en los tumores no-seminomatosos con pérdida de la restricción de la amplificación de 12q. De otra parte, se encontraron niveles similares de expresión en líneas celulares derivadas de tumores germinales no-seminomatosos. Así mismo, estas células muestran niveles bajos de apoptosis y altos de DAD-R, encontrándose grandes copias de genes independientes.

En definitiva, hemos comparado los niveles de DAD-R y de otros genes en los tumores con diferentes copias de genes y hemos encontrado niveles altos en tumores sin amplificación de 12q y con amplificación de regiones restringidas. Hemos observado dos mecanismos para la ganancia de la secuencia 12q ¿Existe evidencia de que las células del CIS tienen mayor propensión a la apoptosis comparada con la de los tumores invasivos, seminomatosos y no-seminomatosos, que se encuentran protegidos de sufrir apoptosis por la alta expresión de DAD-R? De acuerdo a los datos, las células del CIS no tienen amplificación de 12q y, consecuentemente, no incrementan la expresión de DAD-R. No hay datos directos de la presencia de apoptosis en las células de CIS.

Estudios de genética molecular han determinado otras diferencias transcripcionales que permiten establecer el diagnóstico diferencial molecular entre los seminomas y los carcinomas embrionarios, además se han identificado los genes más característicos de cada uno de los diferentes subtipos histológicos de los TCGT.<sup>30</sup> En este sentido, se sabe que los seminomas expresan también los mismos genes asociados a la regulación de una espermatogenesis normal, esto es, el gen PRAME, el gen MAGEA4, el gen SPAG1, y el gen HPX.<sup>30</sup> De otra parte, los carcinomas embrionarios expresan genes de tipo regulatorio, tales como el gen DNMT3B y el gen SOX2; así como moléculas pequeñas de queratina (KRT8, KRT18).<sup>30</sup>

Se han identificado tres tipos de células germinales basándose en estudios con marcadores de inmunohistoquímica:

- 1.- Gonocitos que son OCT4 +/cKIT +/MAGE-A4 neg.<sup>80</sup>
- 2.- Células germinales intermedias: OCT4 debil a neg/cKITneg/MAGE-A4+.<sup>80</sup>
- 3.- Presespermatogonia:OCT4neg/cKITneg/MAGE-A4+.<sup>80</sup>

En el primer trimestre predomina el fenotipo del gonocito; sin embargo, en la semana 18 de la gestación la preespermatogonia es la célula más abundante. Estos datos abogan por una diferenciación funcional de la célula germinal testicular durante el segundo trimestre de la gestación.<sup>80</sup>

La asociación de CIS con otras alteraciones, como las malformaciones genéticas, y algunas formas que impiden una espermatogénesis normal, hacen sugerente la hipótesis de que CIS puede ser una manifestación de disgenesia testicular, desarrollada y a desde los primeros momentos de la diferenciación embrionaria gonadal.<sup>220</sup> En este sentido, se ha demostrado una similitud muy próxima del CIS a la célula primordial germinal y al gonocito, consistente con el origen pre-meiótico del CIS, puesto que los gonocitos normales y las células del CIS expresan las mismas proteínas de superficie celular (PLAP, cKIT),<sup>121,220</sup> y también algunos marcadores específicos de célula germinal (MAGEA4, VASA, TSPY, NY-ESO-1), y también los gonocitos y las células del CIS están regulados por las mismas moléculas que controlan el ciclo celular (p53, CHK2, p19-INK4d).<sup>220</sup> De hecho, el perfil de expresión génica de las células del CIS es muy semejante a la célula madre embrionaria. Pero además, existen numerosos factores que claramente se han relacionado con presencia de pluripotencialidad (NANOG, OCT3/4) celular y con un estado de indiferenciación (AP-2 gamma) celular, lo cual puede explicar la marcada pluripotencialidad de las neoplasias de células germinales, las cuales son capaces de

diferenciarse a varios tejidos somáticos, como ocurre en los distintos componentes del teratoma.<sup>220</sup>

Otras proteínas que también se expresan en el CIS, tales como VASA (proteína específica para la línea de células germinales), el TSPY (proteína específica testicular Y) y los marcadores de proliferación celular como el Ki-67, también han sido identificadas en gónadas masculinas desde el feto hasta el segundo y tercer trimestre de la gestación y están presentes en los hombre adultos con espermatogénesis conservada y el CIS.<sup>121</sup> Sin embargo, existen algunas peculiaridades de expresión; así, VASA se ha encontrado en todas las células germinales, mientras que TSYP se localizó predominantemente en la pre-espermatogonia en todas las edades; contrariamente, los marcadores como el PLAP, cKIT, OCT3/4 y Ki-67 se observaron en los estadios más tempranos del desarrollo fetal, pero su expresión disminuye gradualmente a lo largo de la gestación, y solo ocasionalmente pueden identificarse en neonatos.<sup>121</sup> Además, como se ha referido anteriormente, la amplificación de ciertas regiones del cromosoma 12p, puede facilitar la sobrevida del CIS y su progresión, los estudios genéticos hasta ahora no han identificado un polimorfismo genético predisponente en la forma más común de cáncer testicular.<sup>220</sup>

La fosfatasa alcalina placentaria-like (PLAP) fue uno de los primeros marcadores encontrados en los tumores testiculares; es una fosfatasa alcalina específica de tejido con función biológica desconocida, que se expresa también en el seminoma clásico, al igual que en las células primordiales germinales y en los gonocitos primarios.<sup>25,39,88,117,127,125,133,134,139, 159,236</sup> Actualmente, PLAP sigue siendo el marcador más comúnmente usado para CIS en las biopsias testiculares y en otras muestras patológicas de tejido testicular.<sup>213,238,267</sup> Se han identificado otros marcadores de CIS mediante anticuerpos producidos contra glucolípidos y glucoproteínas expresados por líneas celulares derivadas de tumor, como son: M2A,<sup>15,88,91,164</sup> 43-9F<sup>88,90,109</sup> y TRA-1-60.<sup>85</sup> Estos marcadores, excepto 43-9F, se han detectado también en los gonocitos normales y en las células germinales infantiles;<sup>133,134,236</sup> sin embargo, la estructura y la función de las proteínas nativas sigue siendo desconocida.

Gracias a la investigación de marcadores adicionales de CIS se ha demostrado una elevada expresión de KIT -también conocido como proto-oncogen c-kit-, un receptor tirosín-quinasa de la membrana celular para el factor de las células madre.<sup>33,126,175,226,233,274</sup> Como proteína, se encuentra una fuerte expresión de KIT en las células germinales fetales primarias y

en los gonocitos infantiles; sin embargo, en las espermatogonias adultas del testículo humano se observa una expresión muy débil, e incluso indetectable.<sup>133,134,226,233</sup> Se ha propuesto que la expresión prolongada de KIT, un potente factor antiapoptótico implicado en el retraso de desarrollo de las células germinales poco diferenciadas, podría ser uno de los mecanismos que conducen a la transformación neoplásica mediante una prolongación de su supervivencia.<sup>175,225</sup>

Dentro de las proteínas encontradas, tanto en las células germinales normales adultas como en las células del CIS, se encuentran el factor de crecimiento insulina-like I (IGF-I) y la proteína 5 que se une a IGF;<sup>66</sup> además, también se ha identificado el gen supresor específico de células epiteliales normales (NES1; KLK-10)<sup>154</sup> y la enzima de conversión angiotensina-I.<sup>75</sup>

Un gen específico de las células germinales es el VASA, el cual está presente desde el estadio de células primordiales primarias germinales hasta el de espermátidas post-meióticas.<sup>44</sup> El transcrito y el producto proteico de VASA se expresan en CIS y en otros tumores que contienen células de línea germinal, tanto en tumores germinales de hombres como en mujeres.<sup>324</sup>

Aunque no se ha descrito la expresión de DAZ en la neoplasia de células germinales, recientemente se ha demostrado, por inmunohistoquímica, el producto proteico de DAZL -homólogo autosómico de DAZ- en neoplasias testiculares de células germinales.<sup>149</sup> La proteína DAZL se ha identificado en las células del CIS, en los seminomas puros y en los componentes seminomatosos de los tumores mixtos de células germinales, pero no en los tumores germinales de tipo no-seminomas.<sup>149</sup>

Recientemente, se han detectado los antígenos MAGE-A4 y NY-ESO-1 en las células de CIS.<sup>13,250</sup> Estos antígenos -llamados antígenos "cáncer/testis"- están codificados por una familia de genes. Los genes cancer/testis codifican las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, que se expresan en varios tipos de cáncer -como el cáncer de mama, el melanoma, el cáncer de pulmón o el carcinoma de colon-; estas moléculas son reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos de pacientes con cáncer.<sup>301</sup>

Se piensa que p53 -un supresor tumoral prototipo, que funciona como regulador del ciclo celular y de la reparación del ADN- es el responsable de la elevada tendencia del CIS y del seminoma a la apoptosis.<sup>155,225</sup> El primer estudio que publicó una alta expresión de p53 en las células de CIS<sup>17</sup> desencadenó, sin mucho éxito, una serie de investigaciones que buscaban una

mutación en el gen de p53 en tumores testiculares.<sup>155,218</sup> Solamente hubo un estudio que publicara alteraciones en el gen de p53 en las células del CIS.<sup>143</sup> La acumulación de p53 en las células del CIS podría ser una característica persistente del desarrollo, ya que p53 se expresa de forma elevada en los gonocitos fetales normales humanos,<sup>219,222</sup> pero no en las células germinales normales de testículos adultos donde la expresión sólo puede detectarse a nivel de ARNm.<sup>206</sup>

En las células del CIS, también se demostró la presencia de otro supresor tumoral funcional, Chk2, el cual fosforila a p53 y se activa por un daño en el ADN.<sup>18</sup> Chk2 es abundante en los gonocitos normales y en las espermatogonias, pero cuando las células entran en meiosis su expresión queda rápidamente regulada y decae.<sup>18</sup>

La ruta implicada en el punto de control de pRB muestra cambios interesantes de expresión en los tumores de células germinales y en el CIS; de forma que se observa una llamativa regulación de pRB<sup>19,275</sup> y de p19INK4d en las células del CIS<sup>22</sup> y sobre-expresión de la ciclina D2.<sup>20,123</sup> En los gonocitos fetales, se observó un patrón similar, lo cual apoya la hipótesis sobre la relación entre los gonocitos y el CIS. Varias proteínas reguladoras, incluyendo las ciclinas -como la ciclina E-, sus respectivas quinasas y, al menos, dos proteínas inhibitoras -p16 INK4b y p18 INK4c- cambian su expresión durante la progresión de CIS hacia tumores infiltrantes.<sup>19,20</sup> Estos cambios y sus posibles implicaciones biológicas han sido discutidos con detalle en una revisión publicada por Barkova et al, en el año 2003.<sup>21</sup>

En el carcinoma embrionario, uno de los marcadores más específicos es el TRA-1-60,<sup>9</sup> el cual se expresa también en las células del CIS.<sup>85</sup> Recientemente, se encontró este marcador en células madre embrionarias humanas y en embriones pre-implantados,<sup>111</sup> pero su función biológica sigue siendo desconocida.

En los últimos años, se han encontrado varios marcadores asociados con las células madre pluripotenciales, entre ellos OCT-4, o POU5F1, un factor de transcripción que es necesario para prevenir a las células de la diferenciación.<sup>255</sup> Recientemente, se ha detectado una elevada expresión de OCT-4 en las células de CIS y en el gonadoblastoma, pero no en los TCGT de tipo no-seminomas, incluidos aquellos casos bien diferenciados.<sup>151,211</sup> Estas observaciones proporcionan evidencias adicionales que indican que las células del CIS tienen características similares a las células madre. De hecho, frecuentemente, las células del CIS son heterogéneas, de forma que, en algunos casos, una serie de genes/antígenos solo pueden



expresarse en una subclase de células de CIS, especialmente en casos de CIS adyacentes a tumores mixtos.<sup>224</sup> Nosotros pensamos que este fenómeno puede estar relacionado con los cambios relacionados con el distinto grado de diferenciación celular, incrementada por la inestabilidad genética de las células transformadas del CIS, lo cual, finalmente, lleva al aumento de proliferación, invasión y supervivencia del tumor fuera del tubo seminífero, cuando no actúan los factores morfológicos y funcionales de las células de Sertoli que intentan impedir la invasión del CIS hacia la pared peritubular.<sup>322</sup>

En definitiva, como ya se ha comentado previamente, parece quedar claro que las células del CIS expresan también una serie de genes que están presentes en las células germinales adultas. Este continuum de la línea germinal celular queda reflejado por el número creciente de proteínas que se detectan durante el desarrollo testicular, incluyendo las que regulan la proliferación de espermatogonias y, en algunos casos, la diferenciación de los espermátocitos e incluso las espermátidas. El desarrollo de errores en la división celular y de una inestabilidad genética cada vez mayor, puede desencadenar una transformación maligna, esto es, al origen de las células del CIS. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado un perfil específico, o al menos bastante característico de genes que se expresen en CIS, en seminomas, en TCGT no-seminomatosos, o, incluso en células germinales normales, y que no estén presentes en los gonocitos. Probablemente, haya genes que se expresen en los espermátocitos o en las espermátidas, especialmente genes específicos de células germinales, que no se expresen en los gonocitos y que, de otra parte, puedan estar presentes en los tumores testiculares.

Con todo, muchas de las diferencias en la expresión génica no se pueden explicar por la alteración del número de copias. Aunque, una explicación adicional al diferente epi-genotipo entre distintos tipos de tumores –incluidos los TCGT– podría ser explicarse por la existencia de diferentes patrones diferenciales de la metilación de ADN.<sup>157</sup> Las funciones moleculares de algunos de estos procesos pueden relacionarse con las vías de señalización celular de RAS y de RB; de otra parte es bien sabido que KRAS2 se localiza dentro de la misma pequeña región amplificada del cromosoma 12p<sup>186,237</sup> y éste no tiene un incremento de su expresión.<sup>123,266</sup> Las mutaciones permiten una activación de las proteínas de RAS, y tanto KRAS2 como su homólogo NRAS se han detectado en los TCGT<sup>79,190,192,207,232</sup> y en algunos CIS.<sup>207</sup> Así mismo, en el CIS se han establecido nuevos marcadores tumorales proteicos, como CGB (GTC) y AFP, además de ALPP/ALPP2 (PLAP/GCAP) y KIT.<sup>238</sup>

Las bases moleculares de la tumorigénesis no han sido bien elucidadas, pero hay que tener en cuenta los factores de crecimiento que regulan procesos básicos como son el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. En la gónada masculina, desde la vida fetal hasta la vida adulta, estos factores están involucrados en la proliferación de las células germinales y en su diferenciación. En el caso particular de muchos tumores malignos, las vías del crecimiento sufren desregulación, lo que indica la importancia de los factores de crecimiento en el desarrollo del testículo normal y en su desregulación adquirida en el cáncer humano. De esta forma, los factores de crecimiento y las moléculas de señalización pueden estar implicados en la génesis de los tumores testiculares.

Se ha detectado una mutación somática del gen SMAD4, el cual es responsable de la pérdida de la función de algunas proteínas en los seminomas.<sup>35</sup> Esta inactivación mutacional puede afectar a varios miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento TGFbeta (TGFbeta, activita, inhibina y BMP). En los seminomas, la expresión del factor de crecimiento vascular VEGF se ha demostrado que tiene un valor predictivo del desarrollo de metástasis. Se ha encontrado una asociación significativa entre la expresión de HST-1 -un miembro de los factores de crecimiento de fibroblastos-, el fenotipo de los TCGT no-seminomatosos, y el estadio clínico-patológico del tumor. Por el contrario, C-KIT sólo se expresa en los seminomas en la fase pre-invasiva. Además, la mutación activada de C-KIT ha sido poco descrita, a pesar de la intensa expresión en casi todos los seminomas. Las distintas familias de factores de crecimiento regulan diferentes procesos biológicos, incluyendo la proliferación, diferenciación, desarrollo y producción de matriz extracelular.<sup>165</sup> De forma particular en el testículo fetal, TGF beta es conocido como un factor antiproliferativo de gonocitos, este factor realiza la señalización a través de dos tipos diferentes de receptores de serina/treonina proteín-kinasas, de los receptores de TGF-beta tipo I y tipo II, y de la activación de efectores intracelulares específicos denominados SMADs.<sup>318</sup> Los SMDAs liberan la señal desde la membrana celular hasta el núcleo, donde actúan como factores de transcripción.<sup>191</sup> La vía TGF-beta SMAD puede inducir inhibidores del crecimiento y de la respuesta a la apoptosis. La inactivación de los componentes intracelulares de esta vía demuestra que contribuyen directamente en la tumorigénesis.<sup>60</sup> En un estudio de inmunohistoquímica, se ha detectado la expresión de proteínas como TGF-beta 1-2 y TGF-beta RI y II en la mayoría de los 26 tumores germinales analizados (42-80%). La inmunotinción para TGF-beta fue más intensa en las estructuras desdiferenciadas de los teratomas inmaduros que en las estructuras indiferenciadas. Además, el

patrón de tinción de TGF-beta fue difuso en los seminomas, y focal y en parches en los teratomas.<sup>43</sup> El análisis mutacional de los genes TGF-beta RI, TGF-beta RII y SMAD (SMAD1 y SMAD7), en los seminomas testiculares, demostró que SMAD4 es el único componente de la vía de TGF-beta afectada en los TCGT.<sup>35</sup> La inactivación mutacional dominante del extremo SMAD4/COOH puede afectar no sólo a la actividad de TGF-beta sino también a otros miembros de esta familia, incluyendo inhibina, activina y BMP (proteína morfogenética ósea). Verdaderamente, el análisis de la vía de señalización de la activina, de BMP y de TGF-beta demuestra que todas las respuestas estudiadas dependen de la interacción entre SMAD4 y SMADs.<sup>318</sup>

La red de señalización de TGF-beta, cuando se estudia en otros tumores, queda interrumpida por las mutaciones en SMAD4 y SMAD2. Originalmente, se identificó a SMAD4 como candidato a gen supresor tumoral 18q21. El 50% de los carcinomas pancreáticos muestran una mutación somática consistente en delección.<sup>103</sup> En el cáncer de colon también se ha descrito una inactivación bialélica de SMAD4.<sup>156</sup> Así mismo, en los tumores testiculares, se ha observado la pérdida o delección del brazo largo del cromosoma 18,<sup>61,195,217</sup> lo cual concuerda con el papel potencial del gen SMAD4 en la carcinogénesis de estos tumores. Pero además, en el desarrollo gonadal normal, otros miembros de la familia TGF-beta también han sido implicados. Así, en ratones, la deficiencia de inhibina determina el desarrollo de tumores del estroma gonadal, sugiriendo que la inhibina regula negativamente la proliferación de las células del estroma gonadal y actúa como un gen supresor.<sup>167</sup>

El receptor tirosín-kinasa del factor de crecimiento de las células madre está regulado por el proto-oncogen C-KIT.<sup>320</sup> La inactivación del factor de las células madre induce una dimerización rápida y completa del receptor que implica la activación, por autofosforilación, o la catálisis de la tirosín-kinasa. Se sabe que las células de Sertoli son la única fuente de factor de crecimiento de las células madre en el testículo.<sup>240</sup> C-Kit es detectado en las gónadas masculinas durante la embriogénesis y el desarrollo postnatal; además, SCH/KIT está involucrado en las diferentes funciones del testículo, incluyendo la migración de las células germinales, la adhesión celular, la proliferación celular y la acción de la apoptosis.

En la ausencia de células germinales de los testículos postnatales patológicos, se asocian a mutaciones homocigotas W y S1, las cuales provocan, respectivamente, ausencia de producción de C-KIT o SFC. Estas alteraciones de la espermatogénesis están relacionadas con

defectos de migración de células germinales primordiales (PGC) o con el desarrollo de apoptosis.<sup>168</sup> Se sabe que SCF/C-KIT está implicado en la proliferación de las células germinales normales durante las diferentes etapas del desarrollo testicular -etapa fetal, comienzo de la pubertad y auto-renovación del adulto-; de este modo, el complejo SCF/C-KIT parece representar uno de los reguladores clave de la espermatogénesis. Por tanto, es lógico sospechar la implicación de este sistema en las patologías gonadales humanas. En los testículos adultos humanos, las células de Sertoli son inmunoreactivas para SCF, mientras que las células germinales -células espermatogénicas primarias, gránulos acrosomales de las espermátidas redondas y acrosoma del espermatozoide- y también las células de Leydig son inmunoreactivas para C-KIT.<sup>245</sup> Sin embargo, otros estudios no han podido detectar ningún tipo de inmunoreactividad KIT en las células de Leydig,<sup>274</sup> ni en las células germinales normales o neoplásicas.<sup>226</sup>

En los TCGT, C-KIT se expresa en una proporción de 24/30 seminomas (80%), mientras que en los TCGT no-seminomas la expresión de C-KIT es de 3/40 (7%). Estos resultados se confirman en el estudio de Murty et al.,<sup>196</sup> quienes detectan mRNA de C-KIT en 3 de 10 seminomas, pero no lo encuentran en ninguno de los 12 TCGT no-seminomas. Así mismo, en todas las células seminomatosas de los TCGT estudiados se demuestra inmunohistoquímicamente la presencia de proteína KIT, mientras que ninguno de los TCGT no-seminomas muestra inmunorreacción con anticuerpo anti-KIT.<sup>226,274</sup> No obstante, todos los casos analizados de CIS presentan una fuerte patrón de tinción en la membranas celulares con el anticuerpo anti-KIT.<sup>226</sup> En contraste, no se observa mRNA de SCF en ninguno de los ocho seminomas y TCGT no-seminomas, y la proteína correspondiente muestra una presencia débil en 7 de los 18 tumores, siendo su patrón de expresión similar en los diferentes subtipos histológico de tumores de células germinales.<sup>274</sup> Estos hallazgos sugieren que C-KIT puede estar implicado en la diferenciación seminomatosa de los tumores de células germinales, desde la etapa pre-invasiva hasta la diferenciación a no-seminoma, en la que su expresión disminuye, o incluso se pierde. En este punto, Rajpert-de Meyts y Skakkebaek<sup>226</sup> han sugerido que las células del CIS pueden quedar atrapadas intratubularmente por la función adhesiva transmembrana del complejo KIT/SCF. Una disminución en la expresión de KIT en los seminomas, y una pérdida de expresión en los TCGT no-seminomas podría explicar la rápida invasión del intersticio por las células malignas de CIS.<sup>226</sup> El hallazgo de la expresión de C-KIT, tanto en las células del CIS como en los seminomas, apoya la hipótesis de su origen desde

las células germinales pre-meióticas, y concuerda con la teoría sobre la progresión tumoral. Esta teoría considera que primero ocurre la diferenciación de célula transformadas de CIS, las cuales cuando invaden la pared peritubular y el intersticio se convierten en un seminoma, esto es en una forma más agresiva de TCGT. A pesar del alto nivel de la expresión de KIT en los seminomas, el análisis mutacional del gen C-KIT ha mostrado mutaciones activas en una minoría de los TCGT.

En las células germinales normales, la detección de receptores de superficie de C-KIT y RET/GFR-1, y de sus ligandos naturales en las células de Sertoli -respectivamente, SCF y GDNF- sugieren la presencia de mecanismos tróficos reguladores complementarios al sistema del eje endocrino FSH-LH-testosterona. Parece que estas interacciones hormonales y locales desempeñan también un papel en la proliferación de los TCGT. Varios receptores con actividad tirosín-quinasa y sus ligandos específicos (C-KIT/SCF y GDNF/RET/GFR-1) han sido implicados en TCGT, tanto humanos como animales. En los últimos años, se han desarrollado drogas que inhiben proteín-quinasas individuales, como son: las pequeñas moléculas inhibitoras de EGFR utilizadas en carcinomas de pulmón, los anticuerpos monoclonales que bloquean la función del receptor ErbB2 empleados en carcinomas de mama que sobre-expresan ErbB2, y los inhibidores de C-KIT usados en los tumores estromales gastro-intestinales. Sin embargo, se necesitan realizar futuros estudios sobre el papel de los factores de crecimiento, las redes de señalización y las proteínas implicadas en la carcinogénesis de los TCGT, para permitir el desarrollo de moduladores farmacológicos específicos de señalización que puedan ser usados como agentes terapéuticos.

La angiogénesis también es indispensable para el crecimiento tumoral y la metástasis de numerosos tumores.<sup>73</sup> El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una N-glicoproteína dimérica de 32-46 Kda. VEGF es quimiotáctica y mitogénica para las células endoteliales in vitro, provoca la angiogénesis in vivo, e incrementa la permeabilidad del endotelio vascular. Este factor de crecimiento se une a los receptores tirosín-quinasa FLT-1, Flk-1/KDR, los cuales se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales.<sup>259,290</sup> La expresión de VEGF se correlaciona con la densidad de los microvasos y las metástasis en muchos tumores sólidos.<sup>81,282</sup> La timidín fosforilasa (TP) está implicada en el metabolismo de los nucleósidos pirimidínicos y se ha demostrado que es idéntica al factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF).<sup>299</sup> TP muestra actividad angiogénica in vivo,

siendo su actividad enzimática indispensable para su efecto angiogénico.<sup>178</sup> El aumento de la expresión de TP se correlaciona con la densidad de los microvasos y con un peor pronóstico en muchos tumores.<sup>283</sup> Se ha demostrado que tanto el mRNA como la expresión proteica de VEGF son significativamente mayores en los TCGT que en los testículos normales, y que su expresión se correlaciona con la densidad microvascular dentro de los tumores.<sup>77,305</sup> En estos tumores, se expresan predominantemente las isoformas VEGF121 y VEGF165, que se unen a los receptores VEGF y los activan (FLT-1 and Flk-1/KDR).<sup>305</sup> Además, los mRNAs de FLT-1 y Flk-1/KDR son casi indetectables en los testículos normales, mientras que ambos transcritos se sobre-expresan en 4 de cada 5 tumores de células germinales altamente vascularizados.<sup>305</sup> Estos hallazgos sugieren que VEGF121 y VEGF165, producidos por los TCGT, podrían activar el grupo correspondiente de receptores expresados en las células endoteliales tumorales, actuando de forma paracrina para inducir la neovascularización. De esta forma, queda demostrado que existe correlación entre la expresión de VEGF y las metástasis en los tumores testiculares de células germinales.<sup>77</sup> En este estudio, el análisis multivariante demostró que el único predictor estadísticamente significativo de metástasis en los seminomas es la expresión de VEGF; mientras que, en los TCGT no-seminomas, tanto la expresión de VEGF como el recuento de microvasos son predictores significativos.<sup>77</sup> De otra parte, se observó una intensa inmunorreactividad TP en los macrófagos y en los fibroblastos infiltrantes del estroma, pero no en ninguna de las células del carcinoma.<sup>77</sup>

En relación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas, los genes PDGF-A y PDGF-B son los que codifican la síntesis proteica de las cadenas A y B de este factor, estos dos genes se localizan, respectivamente, en los cromosomas 7p y 22q. En el testículo se ha demostrado que existe una estrecha conexión entre el sistema PDGF, el inicio de la espermatogénesis y el reinicio de la esteroidogénesis.<sup>24</sup> Las células de Leydig humanas expresan PDGF, lo que sugiere que el desarrollo embrionario y fetal de las células de Leydig podría estar regulado por PDGF,<sup>24</sup> ya que en los ratones deficientes para PDGF-A se ha observado una falta de desarrollo de las células de Leydig de tipo adulto.<sup>94</sup> En los tumores de células de Leydig, la expresión de ligandos y proteínas receptoras de PDGF sugiere una relación entre el sistema PDGF y la tumorigénesis testicular.<sup>24</sup> En 28 casos con TCGT se ha identificado un receptor aberrante de PDGF -transcrito de 1,5 kb- y también se ha encontrado en 27 parénquimas testiculares con CIS; mientras que ninguno de los tejidos testiculares normales, placenta, o semen control expresaron este transcrito, lo cual indica que el receptor

alternativo de PDGF -transcrito de 1,5 kb- podría usarse como un marcador altamente selectivo para detectar las primeras etapas del desarrollo de un TCGT.<sup>185,211</sup> Además, la expresión de este transcrito en los TCGT depende de su grado de diferenciación, y presenta una correlación positiva con el factor de transcripción embrionaria OCT4/POU5F1. Este transcrito de 1,5 kb también se expresa en células no germinales malignas y en células normales, tales como linfocitos B, gliomas y melanomas, pero sin la expresión concomitante de OCT4/POU5F1.<sup>211</sup>

La expresión del oncogén HST-1, al contrario de lo que ocurre con la expresión de C-KIT, es significativamente más frecuente en los TCGT no-seminomas (63%) que en seminomas (4%). En el grupo de los TCGT no-seminomas, también se encuentra una asociación significativa entre la expresión de HST-1 y el estadio del tumor.<sup>273</sup> Estos hallazgos sugieren que el gen HST-1 puede estar implicado en la progresión de los TCGT y la transformación de tumores bien diferenciados en fenotipos más agresivos.

Inmunohistoquímicamente se ha detectado la expresión de FGF4, FGF8 y FGFR1 en todos los carcinomas embrionarios, los coriocarcinomas y los tumores del saco vitelino (yolk sac tumors), mientras que con los anticuerpos anti-FGF4, FGF8 y FGFR1, respectivamente, solamente el 53, 38 y 46% de los seminomas mostraron una tinción positiva.<sup>281</sup> Además, no se detectó tinción en las áreas diferenciadas de teratomas maduros e inmaduros, asimismo en las células P19 de teratocarcinoma de murino, los transcritos de FGF4, FGF8, FGFR-1 desaparecían después de la diferenciación neural.<sup>281</sup> Teniendo en cuenta los resultados anteriores, Suzuki et al.<sup>281</sup> Sugieren que el bloqueo de las señales de FGF en los tumores de células germinales puede inducir la diferenciación tumoral.<sup>281</sup>

EGFR es una glucoproteína de la membrana plasmática con actividad tirosín-quinasa. Después de la unión con el ligando, tiene lugar la dimerización de EGFR, lo que provoca la autofosforilación de la tirosina y la activación de una cascada de respuestas fisiológicas bioquímicas que están implicadas en la traducción de la señal mitogénica de las células normales y malignas.<sup>1</sup> En 16 de 18 TCGT no-seminomas, se ha observado una fuerte inmunorreactividad en la membrana para EGFR1 en las células del sincitiotrofoblasto (HCG positivas) del componente de coriocarcinoma. Se ha visto la coexpresión con HER-2/neu y TGF, respectivamente, en el 25% y 36% de los casos.<sup>184</sup> Estos hallazgos indican la activación de EGFR y la estimulación autocrina en los TCGT no-seminomatosos positivos para HCG. Esta sobre-expresión de EGFR puede tener en el futuro cierta relevancia terapéutica.

La somatostatina (SRIF) es una hormona peptídica reguladora con potentes acciones antiproliferativas. Se considera que el estado funcional del receptor SRIF tiene valor diagnóstico y pronóstico.<sup>144</sup> SRIF se expresa tanto en testículos humanos normales,<sup>249</sup> como en TCGT;<sup>171</sup> de forma que el incremento en la secreción de testosterona tiene lugar sin un aumento simultáneo de secreción de LH. Todos estos datos sugieren que SRIF puede modular la secreción de testosterona en el testículo.<sup>304</sup> La presencia de SRIF y de sus receptores en los testículos humanos<sup>16</sup> apoya la existencia de bucles autocrinos o paracrinos que controlan la secreción local de testosterona.

### ***Expresión de MAGE en los Tumores Testiculares***

Se sabe que los genes MAGE se expresan en una amplia variedad de tumores y en las células germinales premeióticas del testículo normal (espermatogonia mitótica y espermatozoides primario). El MAGE se expresa intensamente en el CIS y, así mismo, también se expresa en los precursores fetales de las células madre germinales en la semana 17 de la gestación. Estos datos permiten sugerir que el CIS pudiera originarse de las prespermatogonias fetales.<sup>13</sup> En los seminomas clásicos, el MAGE se identifica de forma uniforme y específica en todas las células tumorales y, contrariamente, el MAGE es negativo en los seminomas anaplásicos. Sin embargo, curiosamente el MAGE se expresa específicamente solo en una subpoblación de células de CIS, pero en otras, no; estos datos proporcionan evidencia clara de la heterogeneidad del fenotipo de las células del CIS.<sup>13</sup>

### ***Expresión de Aurora A y de Aurora B en los Tumores Testiculares y otras Enfermedades Neoplásicas***

La investigación de nuevas moléculas reguladoras del ciclo celular y de la apoptosis en los TCGT permiten aportar nuevos conocimientos acerca del comportamiento biológico y del significado clínico-patológico de los distintos tipos de estos tumores malignos; además, estos estudios pueden ser de utilidad en el manejo de estos enfermos, en lo que se refiere a pronóstico y resistencia a tratamiento. En la actualidad ha demostrado ser muy útil el valorar la posible correlación entre los marcadores de proliferación celular, fundamentalmente ki 67, con la expresión de moléculas reguladoras de ciclo celular de la familia de Auroras (proteín-quinazas), con los datos de expresión de proteínas pro-apoptóticas (cerb-2) y con moléculas anti-apoptóticas (survivina) en los diferentes patrones histológicos de TCGT.



En relación con la investigación de la expresión inmunohistoquímica de Aurora A y de Aurora B, los objetivos de la presente Tesis se han centrado en: 1) determinar la frecuencia de la inmunoexpresión de STK15 en el cáncer testicular y su relación con variables clínico-patológicas e inmunohistoquímicas, en relación con la proliferación celular y la expresión de moléculas proapoptóticas y de moléculas inhibitoras de la apoptosis, y 2) determinar la influencia de la expresión de STK15 en la capacidad tumorigénica de los diferentes patrones histopatológicos de los tumores malignos de células germinales desarrollados en testículos de pacientes normales y en diferentes casos con infertilidad de origen congénito o adquirido.

Las Aurora quinasas son proteínas de la familia serina/treonina quinasas, cuya estructura y función está conservada en organismos eucariotas. Tres genes de la familia de Aurora quinasas se han identificado en el humano (Aurora A, B y C), y de estos STK15 -también conocido como aurora-2, aik1, btak, Aurora-A y ark1- ha sido el primero en describirse. El gen STK15/Aurora-A se considera un oncogén que se encuentra amplificado en diversas neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de mama y de ovario; sin embargo, su posible relación con las características clínico-patológicas y la evolución de los tumores no está establecida. Además, la investigación de este gen en las neoplasias de mama tiene interés, dado que la sobreexpresión de STK15 se ha relacionado con resistencia a taxanos. Se ha demostrado que el gen STK15 se localiza en el cromosoma 20q13.2-q13.3, una región amplificada con frecuencia en tumores malignos humanos,<sup>287</sup> por lo que su investigación ha cobrado gran interés en años recientes.

Las Aurora quinasas tienen un dominio catalítico en su extremo COOH-terminal altamente conservado dentro de la familia, pero además, tiene un dominio NH2 terminal, variable entre diferentes organismos. La parte más conservada dentro del dominio catalítico es el bucle de activación que contiene un residuo de treonina, cuya fosforilación induce la actividad quinasa de la proteína.<sup>310</sup> De otra parte, STK15 es degradada por el proteasoma y la vía dependiente de ubiquitina, de modo que su degradación ocurre al inicio de la fase G1 del ciclo celular y depende de una secuencia localizada en el extremo C-terminal de la proteína.

Las Aurora quinasas se asocian con la dinámica de los centrosomas y los microtúbulos. Se localizan en el centrosoma alrededor del material pericentriolar, en los microtúbulos y en el huso mitótico, en consonancia con su participación en la separación cromosómica y la división celular.<sup>138</sup> Sin embargo, la localización de STK15 depende del ciclo celular: la proteína es detectada por inmunofluorescencia indirecta sólo en los centrosomas duplicados durante el

ciclo celular y solo desde final de la fase S al comienzo de la fase G1 del ciclo siguiente. Durante la fase G2 del ciclo celular STK15 colocaliza con la  $\gamma$ -tubulina, indicando que corresponde a una proteína del centrosoma.<sup>68</sup> De hecho, STK15 se ha relacionado con la duplicación, separación y maduración de los centrosomas, mediante procesos de fosforilación, los cuales son necesarios para la separación de los centrosomas y el ensamblaje y estabilidad del huso mitótico<sup>99</sup> y para inducir la poliadenilación del mRNA.<sup>172</sup> Recientemente, también se ha visto que la proteína humana TACC3 (Transforming Acidic Coiled Coil protein number 3) es fosforilada por STK15.<sup>83</sup> Finalmente, en la mayoría de mutantes de STK15, no se detecta  $\gamma$ -tubulina y centrosomina en el centrosoma, sugiriendo que STK15 es necesaria para el reclutamiento de estas proteínas.<sup>27</sup> De hecho, esta podría ser una de las principales funciones de STK15: reclutar proteínas hacia el centrosoma para realizar, por ejemplo, funciones locales, como la maduración del centrosoma.

Recientemente se han descrito dos proteínas relacionadas con la activación de la Aurora A STK15. TPX2 fue la primera proteína descrita con capacidad de promover la fosforilación y la actividad quinasa de Aurora-A.<sup>295</sup> En un segundo estudio se describió un complejo formado por la proteína Ajuba y Aurora-A y su función clave en la progresión de la fase G2/M del ciclo celular, siendo Ajuba esencial para activar a Aurora-A.<sup>113</sup> Sin embargo, a pesar de que Ajuba es necesaria para dicha activación, se sabe que no es suficiente por sí sola. Aunque no está aclarado cual es la señal última que induce la activación de STK15-Ajuba, este complejo, al igual que Cdk1-ciclina B1 son uno de los procesos celulares más tempranos que inducen la entrada en mitosis.

La posible implicación de STK15 en el cáncer humano se relaciona con el hecho de que su gen se localiza en una región cromosómica (20q13) que se encuentra amplificada, aunque con frecuencia variable, en distintos tipos de neoplasias humanas. Las amplificaciones en 20q ocurren en una gran variedad de tumores, que incluyen cáncer de mama, vejiga, ovario, páncreas, cabeza y cuello y condrosarcomas.<sup>31,57,288,289,326</sup>

Un hecho interesante es que las alteraciones en la ploidía inducidas por sobreexpresión de STK15 son potenciadas en células p53. Esta observación, unida a la demostración de que STK15 interacciona con p53 y de que, asimismo, p53 es capaz de suprimir la acción transformante de STK1, inhibiendo su actividad quinasa,<sup>47</sup> sugieren que el papel oncogénico que STK15 puede estar modulado por la actividad génica de la célula, en especial el estado

funcional de p53. En este sentido, está establecido que el gen p53 puede jugar un papel importante en el desarrollo de aneuploidia, tras la existencia de diversas alteraciones entre las que se incluye la sobreexpresión de STK15 como causa de desregulación del proceso mitótico. Una mitosis anómala daría origen a parada en G1 o apoptosis en presencia de p53 funcional. En caso contrario, la célula progresará hacia rondas sucesivas de replicación de DNA y duplicación del centrosoma, dando origen a una progenie poliploide con 4 centrosomas. En las sucesivas mitosis, la célula formará husos multipolares, causando inestabilidad cromosómica y aneuploidia.<sup>174</sup>

En relación con el cáncer de mama, se han publicado resultados de la expresión inmunohistoquímica de STK15,<sup>286</sup> observándose una sobreexpresión en el 94% de los casos con carcinoma ductal infiltrate, mientras que ninguno de los tejidos normales estudiados expresaban STK15. Dada la alta incidencia de sobreexpresión y el bajo número de casos analizados, no se han encontrado todavía una clara relación entre ésta y otras variables, tales como la expresión de marcadores de proliferación celular (Ki67 y PCNA). Recientemente se ha analizado la expresión de mRNA de STK15 en 47 carcinomas de mama mediante RT-PCR cuantitativa (Taqman-PCR).<sup>179</sup> Estos autores han encontrado que la expresión media de STK15 fue significativamente superior en los carcinomas que en el tejido mamario normal; así mismo, se vio que la expresión de STK15 era significativamente mayor en aquellos carcinomas de alto grado y que además tenían receptores hormonales negativos. Por último, los carcinomas con mayor inestabilidad cromosómica mostraron mayor expresión de STK15.

En el cáncer de ovario, de otra parte, la amplificación de STK15 se ha descrito en el 33% de líneas celulares<sup>312</sup> y en el 21% de carcinomas primarios del ovario.<sup>287</sup> Sin embargo, este último estudio -que sólo incluía 24 carcinomas esporádicos del ovario- demostró que todos aquellos casos con amplificación de STK15 (>3 veces) fueron carcinomas serosos (3 casos) o indiferenciados (2 casos): con todo, estos datos son aun preliminares si se comparan con estudios de series de tumores mas amplias; así en una serie que incluyó unos 200 tumores de endometrio se encontró que el 60% de los casos tenían el gen STK15 amplificado, lo cual se asociaba al diagnóstico de la variante de tipo no endometriode del carcinoma de endometrio.<sup>183</sup> Recientemente, se ha analizado la sobreexpresión y activación de STK15 en un grupo de 92 carcinomas de ovario de distinto tipo histológico y estadio clínico, incluyendo tumores borderline (potencial maligno, aunque de pronóstico incierto), encontrándose un

aumento de la actividad quinasa de STK15 en el 48% de los tumores y aumento de su expresión inmunohistoquímica en el 57% de los casos.<sup>101</sup> Aunque el estudio no encontró una relación entre la actividad quinasa y las características clínico-patológicas, la sobreexpresión fue significativamente más frecuente en aquellos casos con estadios bajos y en tumores no infiltrantes, lo que contrasta con los resultados observados en otras neoplasias.<sup>101</sup>

Amplificación de STK15 también se ha descrito en otros tumores humanos; en concreto, un estudio de cáncer de colon demostró que el 52% de 79 carcinomas de colon analizados mediante “Southern blot” mostraba amplificación de STK15, mientras que el 54% de 41 carcinomas analizados mediante “Northern blot” mostraron sobreexpresión, observándose una alta correlación entre ambas determinaciones.<sup>31</sup> En el cáncer gástrico, se ha demostrado amplificación de STK15, utilizando técnicas de FISH, en el 5% de 72 carcinomas analizados y sobreexpresión (mediante RT-PCR semicuantitativa) en el 50% de los casos.<sup>243</sup> Además, en este estudio todos los casos (n=4) con amplificación de STK15 fueron aneuploides; sin embargo, no se pudo demostrar una relación directa entre sobreexpresión de STK15 y la aneuploidía.<sup>243</sup> Por último, en el cáncer de páncreas, la sobreexpresión de STK15 (evaluada por “Western blot”) se ha observado en el 58% de 38 carcinomas analizados, no habiéndose encontrado correlación con el tamaño del tumor, su grado de diferenciación ni con las metástasis.<sup>148</sup> Pero sin duda y hasta la fecha actual, el estudio clínico-patológico y de evolución más importante sobre la implicación de STK15 en una neoplasia humana ha sido realizado en cáncer de vejiga urinaria, analizándose inmunohistoquímicamente 205 carcinomas. En este estudio se ha comprobado que aproximadamente el 50% de los tumores sobreexpresaban STK15 y que esta sobreexpresión se asociaba a otros criterios de agresividad del carcinoma de vejiga, entre los que se encuentran: a alto grado histológico, crecimiento no papilar, infiltración, aneuploidía y mayor posibilidad de recidiva y metástasis.<sup>257</sup>

En definitiva, dado que los niveles de expresión de STK15 suelen ser bajos o nulos en la mayoría de los tejidos normales, pero que, al contrario, en distintos tipos de carcinomas la amplificación y sobreexpresión son relativamente comunes, por lo que se ha sugerido que STK15 podría ser una diana adecuada para identificar y diseñar nuevos compuestos terapéuticos.<sup>311</sup>

### ***Expresión de Survivina en los Tumores Testiculares y otras Enfermedades Neoplásicas***

Una vez que ha quedado claro, tal como hemos constatado en la amplia revisión de la literatura, que la función de la Aurora B quinasa en el centrómero y en el huso central es crucial para la segregación de los cromosomas y los procesos de citoquinesis, es necesario abordar nuevas investigaciones centradas en la regulación de la Aurora B humana, incluidas la detección del denominado Complejo Asociado Interior de la Proteína del Centrómero (INCENP) y de la Survivina.<sup>120</sup> Se ha visto que la progresión mitótica está afectada severamente por la sobreexpresión de un catalítico inactivo, dominante-mutante de Aurora B que afecta la localización de todo el complejo Aurora B/INCENP/ survivina al centrómero y al huso central.<sup>120</sup> Si bien la actividad de la quinasa fue estimulada por el INCENP y que la región terminal C del INCENP fue suficiente para su activación, la survivina no demostró influir en la actividad de la quinasa.<sup>120</sup>

La survivina se ha estudiado, mediante PCR, en tumores germinales y en testículos con defectos en la espermatogénesis,<sup>313</sup> demostrándose que la survivina se expresó a altos niveles en los TCGT indiferenciados y en el testículo normal, contrariamente, la survivina se perdió en los teratomas maduros y en pacientes infértiles con aplasia de células germinales; por ello, cabe especular que la expresión de la survivina se correlaciona con la diferenciación de los TCGT, por lo que la regulación de la survivina puede ser relevante en la tumorigénesis y potencial maligno que pueden experimentar las células germinales testiculares<sup>313</sup>

Se sabe que la survivina es un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis y se cree que la survivina tenga un papel en la oncogénesis. El gen de la survivina está localizado en el cromosoma 11E2 y contiene 4 exones. Además, los clones de la survivina cDNA predicen que existen tres distintos tipos o isoformas de survivina.<sup>52</sup> La presencia de distintas isoformas de la survivina que son expresadas diferencialmente sugiere que esta molécula realiza un papel complejo en la regulación de la apoptosis.<sup>52</sup> Se sabe que la sobrevida prolongada y aberrante de las células neoplásicas se debe a la supresión de la apoptosis, lo que contribuye a la carcinogénesis; por ello, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) tienen un papel importante, puesto que inhiben las caspasa 3,7 y 9. De hecho, la survivina es el único miembro de esta familia que se expresa en muchos cánceres humanos, incluyendo la neoplasia intraepitelial pancreática, pero no se expresa en tejidos adultos normales.<sup>29</sup>

La desregulación de la apoptosis en las células germinales puede contribuir a la infertilidad, así como a la transformación maligna.<sup>314</sup> Por ello, la inmunolocalización de la survivina en los diferentes tipos de TCGT tiene especial importancia en la evaluación histopatológica y evolutiva de estos tumores testiculares, y también en la investigación de los posibles mecanismos de apoptosis que pueden sufrir estos tumores germinales, dado que se ha sugerido que la survivina es un inhibidor de la apoptosis y está sobreexpresada en muchas neoplásicas humanas y, contrariamente, rara vez se detecta en tejidos normales.<sup>314</sup>

La survivina siempre se expresa en el citoplasma de las células normales y su expresión se incrementa significativamente en el citosol y de las membranas citoplásmicas de las células transformadas. Pero además, en varios tumores, incluido el carcinoma de páncreas, se ha descrito una localización nuclear de la survivina, sobretodo de las lesiones de alto grado, sugiriendo que existe una traslocación nuclear de esta proteína, la cual se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.<sup>29</sup> En los TCGT, se ha encontrado un alto marcaje de survivina en aquellos casos con componentes indiferenciados, en contraposición, la survivina está ausente en teratomas maduros.<sup>313</sup> De otra parte, en pacientes infértiles se ha encontrado una disminución en la expresión y de la regulación de survivina, sobre todo en las alteraciones graves de la espermatogénesis. De hecho, niveles altos de expresión de survivina se han visto en los testículos normales, pero se evidencia una pérdida de la expresión de survivina en aquellos pacientes con las paradas de la espermatogénesis que ocurren en los estadios de diferenciación pre-meiótico y sobre todo también en los casos de aplasia germinal. Todos estos datos obtenidos en pacientes con subfertilidad indican que la survivina contribuye al balance entre la proliferación de las células germinales y la apoptosis. En definitiva, en el testículo humano, la survivina se expresa tanto en las células germinales normales, como en las transformadas y además en el caso de TCGT mixtos, la expresión de la survivina también parece perderse cuando ocurre la diferenciación somática.<sup>313,314</sup>

Dado que se ha demostrado que la survivina es un inhibidor de la apoptosis, es necesario revisar la expresión de otras moléculas pro-apoptóticas e inhibidoras de la apoptosis en el testículo humano normal y en los TCGT. Se sabe que la apoptosis desempeña un papel crucial en la regulación de la espermatogénesis, dado que las células germinales masculinas están, en parte, reguladas por las moléculas que controlan los procesos de apoptosis, como son: Bcl2, Bax, y la vía de Fas.<sup>102</sup> En los seminomas, se ha encontrado que la expresión de Fas fue del

89.7% y de Fas-L en el 82% y ninguno de los tumores expresó Bcl2. No se obtuvo correlación entre el índice apoptótico y la expresión de Fas, Fas-l o Bcl-2. Sin embargo, sí se observó una relación significativa entre el número de células Bax positivas y las células apoptóticas: el Bax fue positivo en el 69% de los tumores y la positividad de Bax se relacionó con un incremento en el índice apoptótico, todo lo contrario ocurrió cuando el Bax resultó negativo. Estos datos podrían sugerir que el Bax tendría un papel relevante en la modulación de la apoptosis en el seminoma humano, lo que estaría en parte relacionado con su pronóstico favorable y su buena respuesta a los tratamientos con radioterapia.<sup>102</sup> De otra parte, cuando en tumores testiculares y ováricos se investigó el grado de apoptosis con los marcadores inmunohistoquímicos p53 y Bcl2, se encontró que el carcinoma embrionario tenía el índice apoptótico más alto, seguido del seminoma, de los coriocarcinomas y, por último, de los teratomas inmaduros. Pero además, en los teratomas inmaduros, el Bcl-2 se detectó solo ocasionalmente en algunas células mesenquimales y epiteliales, tanto de sus componentes de teratoma inmaduro, como los de teratoma maduro. Por último, todas las demás variantes de TCGT no expresaron Bcl-2. En definitiva, se sugiere que el nivel de apoptosis en los TCGT se asocia con el tipo histológico, independientemente de si es un tumor germinal puro o mixto.<sup>269</sup>

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS**

**PRIMERA.** ¿El perfil de expresión inmunohistoquímica de la nueva molécula MAGE identificada en los tumores de células germinales testiculares permite distinguir los seminomas de cada uno de los tipos histológicos de los tumores de células germinales testiculares no seminomatosos?

**SEGUNDA.** ¿Las moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia Aurora quinasas y la Survivina, se expresan en el carcinoma *in situ* (CIS), en los seminomas y, de modo específico, en las diferentes variantes histológicas de los tumores de células germinales testiculares de tipo mixto?

## **OBJETIVOS**

**PRIMERO.** Describir las peculiaridades de inmunoexpresión de la molécula MAGE en el testículo normal y atrófico, así como en el CIS y en los diferentes tipos histopatológicos de los tumores de células germinales del testículo humano.

**SEGUNDO.** Evaluar las nuevas moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia Aurora quinasas y la Survivina, en relación con la expresión de Ki 67, en el testículo normal y atrófico, así como en el CIS, en el seminoma, y en cada una de las variantes de tumores germinales del testículo humano de tipo no seminomatoso.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIAL

En este estudio, se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de varias nuevas moléculas relacionadas con el ciclo y señalización celular en TCGT malignos, utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de los archivos de la Unidad de Histología de la UAM, del Hospital Universitario La Paz de Madrid (UAM). El principal criterio de selección del material del presente estudio fue el que todos los casos con TCGT tuvieran parénquima testicular conservado y en el cual se evidenciara claramente la presencia de CIS; pero además, como criterio de inclusión también se procuró que los casos seleccionados fueran aleatorios, y que al menos cada caso tuviera 10 preparaciones y bloques de tejido para la realización de una confirmación de nuevo del diagnóstico y la definición precisa de todas y cada una de las áreas tumorales en las que se identificaba cada tipo histológico de TCGT. Siguiendo todos estos criterios de selección de los casos también se procuró que en la serie de TCGT se incluyeran casos de diferentes edades y correspondientes a los diagnósticos de seminoma puro y de TCGT mixtos no seminomatosos, que incluían casos con carcinoma embrionario, con tumor del seno endodérmico y con teratomas inmaduros. Estos casos con TCGT mixto o combinado frecuentemente tenían, además, asociado el componente de seminoma; así mismo, excepcionalmente contenían células aisladas de cito y sincitiotrofoblasto. En total en la presente Tesis se evaluaron 50 casos con TCGT que se distribuyeron en los siguientes grupos:

**Grupo I.** 10 Casos de TCGT diagnosticados de seminoma puro.

**Grupo II.** 40 Casos de TCGT no seminomatosos, de los cuales 10 casos tenían un carcinoma embrionario puro.

El patrón histopatológico de Seminoma se vio en 18 casos.

El patrón histopatológico de Carcinoma Embrionario se vio en 30 casos.

El patrón histopatológico de Tumor del Seno Endodérmico se vio en 13 casos.

El patrón histopatológico de Coriocarcinoma se vio en 6 casos.

Áreas de Teratoma Maduro se encontraron en 7 casos, y áreas de Teratoma Inmaduro, en 11 casos.

## MÉTODOS

### *Métodos de Estudio Histológico General*

#### **Fijación de las Piezas**

La mayoría de las piezas de orquiectomía se fijaron por inmersión en formol neutro taponado al 4%, durante 72 horas, pero algunas piezas quirúrgicas y las correspondientes a las biopsias testiculares se fijaron en líquido de Bouin, fijador habitual de conservación de todas las biopsias testiculares obtenidas en niños y en pacientes adultos para la evaluación diagnóstica y pronóstica de la fertilidad.

**Tabla 8.** Fijadores del tejido testicular

<b>Formol Tamponado</b>	
Fosfato monosódico, monohidrato	4,00 g
Fosfato disódico anhidro	6,50 g
Agua destilada	900 ml
Formol puro (CH <sub>2</sub> O 40%)	100 ml
<b>Líquido de Bouin</b>	
Ácido pícrico a saturación en agua destilada	750 ml
Formol puro (40%)	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml

### *Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas*

Las piezas de orquiectomía fueron seccionadas en cortes perpendiculares a todo lo largo del eje mayor del testículo, con un espesor de cada sección macroscópica de alrededor de 3 mm. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina, bien de toda la pieza en los casos pediátricos, o bien de secciones seleccionadas al azar (siempre en número superior a 6 cortes por testículo) en las piezas extirpadas en pacientes adultos. De otra parte, las biopsias testiculares fueron incluidas *in toto*, debido a su pequeño tamaño. Todas estas piezas fueron incluidas en parafina en el procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de

butilo, dando dos pases de una hora cada uno. Finalmente las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60° C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor, mediante un microtomo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, con y sin digestión por la diastasa), tricrómico de Masson y técnica de fibras elásticas con coloración de van Giesen (EVG), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones de HE recién teñidas se aclararon en agua destilada. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

### ***Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica***

Para estudiar la expresión de todas las moléculas evaluadas en los TCGT, se ha utilizado, en primer lugar, el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP), con el fin de hacer en algunos casos seleccionados al azar una evaluación previa de las condiciones metodológicas específicas para cada anticuerpo usado; y ya en segundo lugar, toda los casos incluido en nuestro Material de TCGT se realizó una detección de los diferentes epítopes estudiados, mediante el método de Envision (Dako).

En la Tabla 9 Se incluyen los anticuerpos utilizados, su clon -en el caso de que se trate de un anticuerpo monoclonal-, nombre de la casa comercial suministradora y dilución de trabajo en nuestro laboratorio.

**Tabla 9.** Clasificación clínica de los tumores germinales testiculares

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
Ki-67	MIB-1	Dako	1:100
Aurora A (STK15)	JLM28	Novocastra Laboratories	1:50
Aurora B	Policlonal	Abcam pcl	1:50
Survivina	Policlonal	Abcam pcl	1:400
MAGE	Policlonal	Santa Cruz	1:500

### **Método Inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)**

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP, con el fin de la detección de la expresión de estos 5 anticuerpos, se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) o con xilano (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,<sup>228</sup> que se especifican a continuación: se realizó la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desenmascaramiento del epitopo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microundas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H<sub>2</sub>O destilada para retirar el sobrenadante del buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente, realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación, añadimos el anticuerpo primario anti-RA, diluido a 1:500, en una solución de PBS+ BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a las secciones el complejo biotinilado anti-ratón, con una dilución 1:200, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Se incubaron las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA ) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis,

USA ) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7,4 y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

### **Método Inmunohistoquímico de Envision**

El estudio inmunohistoquímico de la expresión proteica se realizó mediante el método Envision (Dako) utilizando anticuerpos mono o policlonales frente a la serie de anticuerpos establecida (ver tabla 9). Brevemente, tras la desparafinización e hidratación de los tejidos en una serie de alcoholes decrecientes hasta el agua destilada se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena durante 10 minutos. A continuación, las muestras se lavaron con agua destilada y se realizó el desenmascaramiento antigénico con EDTA a 150°C durante 45 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron de nuevo en agua destilada y a continuación en tampón Tris pH=7,4 a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se añadió el anticuerpo secundario conjugado. Por último, las muestra se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina, durante 5 minutos. Con el fin de visualizar los núcleos, se realizó contratinción con hematoxilina. Este procedimiento se realizó utilizando el inmunoteñidor automático Techmate500 (Dako).

### ***Técnicas Fotográficas***

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop 5.0. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press 4.0.

## **RESULTADOS**



En el presente estudio de TCGT, el principal criterio de selección del material fue que todos los casos con TCGT tuvieran parénquima testicular conservado y en el cual se evidenciara claramente la presencia de CIS (Figs. 2-4). En esta Tesis se han evaluado nuevas moléculas que intervienen en la regulación de la mitosis en células normales y en células neoplásicas y que corresponden a la familia de Aurora quinasas y a la survivina; también se ha evaluado la expresión del antígeno de proliferación celular Ki 67 y la proteína MAGE como nuevo marcador del cáncer.

Es sin duda en los núcleos de las células del CIS en los que el inmunomarcaje de Ki 67 resulta más robusto en intensidad y en áreas de superficie nuclear inmunoteñida. Pero la expresión de Ki 67 no es el marcador universal de las células del CIS, ya que su expresión no es constante en todas las células de CIS (Fig. 5).

Tampoco el empleo del anticuerpo anti- Ki-67 ha permitido establecer el diagnóstico diferencial entre células de CIS y espermatogonias hipertróficas. Existe todo un espectro de positividad nuclear de Ki 67 en los TCGT infiltrantes (Fig. 6).

Hemos comprobado que MAGE se expresa en el epitelio germinal durante la espermatogénesis normal, obteniéndose una intensa inmunotinción citoplásmica de MAGE en las espermatogonias basales y suprabasales y también se expresa, aunque con menor intensidad en el citoplasma de los espermatoцитos de primer orden. En todas estas células el patrón de expresión de MAGE es fuertemente perinuclear (expresión en el área del aparato de Golgi), pero también de membrana (Fig. 7). La expresión de MAGE en el CIS es muy heterogénea, ya que en un mismo tubo seminífero pueden verse células de CIS con fuerte expresión nuclear, dispuestas en íntima vecindad con otras células de CIS rigurosamente negativas para MAGE. En los seminomas intratubulares, la expresión de MAGE es mucho más constante en el citoplasma de todas las células tumorales y además muchas de estas células, pero no todas, tienen también intenso marcaje nuclear de MAGE (Fig. 8). En los seminomas infiltrantes también la expresión de MAGE es bastante irregular (Fig. 9). MAGE es rigurosamente negativo en los componentes no-seminomatosos de los TCGT mixtos; así mismo, es negativo en aquellos casos diagnosticados de carcinoma embrionario puro y de tumor del seno endodérmico puro (Figs. 10-11).

La tinción nuclear de Aurora A es más fuerte y difusa en las células de CIS, sin embargo, en los seminomas existe una heterogeneidad de marcaje, desde células malignas fuertemente positivas hasta células seminomatosas rigurosamente negativas para Aurora A (Fig. 12).

Los hallazgos de expresión de Aurora A en los diferentes patrones de TCGT son muy heterogéneos dependiendo del tipo histológico y de cada paciente estudiado (Figs. 13-14).

En el testículo humano normal y atrófico, la Aurora B se expresa fuertemente en el núcleo y de forma más tenue en el citoplasma, en donde adquiere un típico patrón de membrana (Fig. 15).

Por otro lado, la expresión de Aurora B es siempre constante en los núcleos de las células de CIS, aunque la intensidad de inmunotinción varía de unas células a otras incluso dentro del mismo tubo seminífero. Las células de CIS también expresan Aurora B en el citosol, aunque con más débil intensidad. En los seminomas puros y en el componente de seminoma de los TCGT mixtos existe todo un espectro de intensidad de tinción nuclear de Aurora B, siendo mínimo el marcaje citoplásmico, que en estos casos es de tipo granular perinuclear y nunca exhibe el clásico patrón de membrana. En los TCGT no-semimomatosos, así mismo, también se observa un doble patrón nuclear y citoplásmico de expresión de Aurora B (Figs. 16-18).

Nosotros hemos encontrado expresión inmunohistoquímica de survivina en el testículo normal y en los TCGT. En el epitelio seminífero normal se ha identificado expresión nuclear de survivina en todas las células de la espermatogénesis, excepto en la fase final de espermiogénesis con la formación de espermátides elongadas. También los núcleos de las células de Sertoli son siempre positivos para survivina (Fig.19).

Algunas células de CIS presentan un intenso marcaje de tinción citoplásmica de survivina y carecen de expresión nuclear (Fig. 20). También en los seminomas infiltrantes se han visto casos con una discordancia de expresión en el núcleo y en el citoplasma, incluso se han visto campos microscópicos de seminoma infiltrante con un marcado patrón de membrana de survivina y ausencia o sólo trazas de inmunomarcaje nuclear. En los carcinomas embrionarios también existe doble marcaje nuclear y citoplásmico de survivina y la inmunoexpresión se atenúa en los patrones sólidos desdiferenciados, muy frecuentemente encontrado en los carcinomas embrionarios (Fig. 21).

***Fig. 2. Estructura del testículo normal y del Carcinoma in situ (CIS) y de los tumores de células germinales testiculares infiltrantes***

- a) Se observan dos tubos seminíferos. El tubo de la derecha presenta diferenciación de la espermatogénesis, pero sólo se observa maduración hasta el estadio de espermatoцитos de primer orden. El tubo de la izquierda presenta una importante atrofia del epitelio seminífero, y en el compartimento basal se identifican numerosas células de CIS que desplazan las células de Sertoli hacia la luz. Hematoxilina- Eosina.
- b) Testículo normal. Se aprecia un tubo seminífero con espermatogénesis conservada aunque con descamación luminal de células germinales. La pared peritubular es fina y, en el intersticio, se ven nidos de células de Leydig. Hematoxilina- Eosina.
- c) Dos tubos seminíferos con CIS, las células neoplásicas son basales, grandes con citoplasma claro y núcleos hipercromáticos, nucléolo prominente. Las células de Sertoli se encuentran desplazadas hacia la luz. Hematoxilina- Eosina.
- d) Tubo seminífero que muestra lesiones típicas de parada de la maduración de la espermatogénesis a nivel de las espermatogonias, las cuales están rodeadas exclusivamente por células de Sertoli. En la porción superior se evidencia una espermatogonia hipertrófica, cuyas características celulares difieren claramente de las propias del CIS. La pared peritubular está muy engrosada y colagenizada, y en el intersticio se observan abundantes linfocitos. Hematoxilina- Eosina.
- e) Seminoma asociado a CIS en un tubo seminífero alargado que muestra engrosamiento importante de la membrana basal. Hematoxilina- Eosina.
- f) Área de carcinoma embrionario con patrón sólido asociado a CIS.
- g) Seminoma. Nidos de células grandes con abundante citoplasma claro y núcleo central o excéntrico con cromatina granular y nucléolo prominente, separados por finos tabiques conectivos con infiltrado linfoide. Hematoxilina- Eosina.
- h) Seminoma. Áreas con abundante infiltrado linfoplasmocítico. Hematoxilina- Eosina.

***Fig. 3. Variedades histopatológicas de los tumores de células germinales testiculares***

- a) Carcinoma embrionario. Patrón glandular formado por células cúbicas con abundante citoplasma claro y núcleos pleomórficos con cromatina vesicular y nucléolo prominente. Hematoxilina- Eosina.
- b) Carcinoma embrionario. Patrón sólido y glandular, con células con marcado pleomorfismo y numerosas mitosis. Hematoxilina- Eosina.
- c) Pared quística revestida por un epitelio simple de células con evidentes signos de malignidad. Subyacentemente se observa un estroma rico en células inmunocompetentes. Las características morfológicas de las células epiteliales proliferantes podrían interpretarse como una transformación maligna del epitelio de un teratoma. En la porción más superficial, las células desdiferenciadas presentan características nucleares que recuerdan a las células del carcinoma embrionario. Hematoxilina- Eosina.
- d) Carcinoma embrionario. Patrón papilar con células grandes y pleomórficas la mayoría no muestra un centro de tejido conectivo. Hematoxilina- Eosina.
- e) Carcinoma embrionario de tipo glandular y sólido con células desdiferenciadas y alto índice mitótico. Hematoxilina- Eosina.
- f) CIS asociado con tumor germinal mixto. En el centro, tubo seminífero con CIS rodeado por una capa de células cúbicas correspondiente a tumor de seno endodérmico y en la periferia carcinoma embrionario. Hematoxilina- Eosina.

***Fig. 4. Variedades histopatológicas de los tumores de células germinales testiculares***

- a) Tumor de seno endodérmico. Estructura "glomeruloide" asociada a un patrón sólido, las células son cúbicas o poliédricas, de citoplasma abundante y claro con nucléolo visible y atipia moderada. Hematoxilina- Eosina.
- b) Tumor de seno endodérmico de patrón microquístico. Hematoxilina- Eosina.
- c) Teratoma maduro. Elementos epiteliales maduros en quistes y nidos asociados a elementos mesenquimatosos. Hematoxilina y Eosina.
- d) Teratoma maduro. Quiste revestido por epitelio de de tipo mucosecretor y rodeado por mesénquima, ambos maduros. Hematoxilina- Eosina.
- e) Teratoma maduro. Quiste revestido por epitelio cúbico y rodeado por tejido conjuntivo muy celular. Hematoxilina- Eosina.
- f) Coriocarcinoma. Nidos de células de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto con marcado pleomorfismo. Hematoxilina- Eosina.
- g) Coriocarcinoma. Células gigantes multinucleadas correspondientes a sincitiotrofoblasto, dispuestas en la periferia de un nido de células mononucleares de citotrofoblasto maligno. Hematoxilina- Eosina.

***Fig. 5. Expresión de Ki 67 en el testículo normal, en el CIS y en el seminoma***

- a) Patrón nuclear positivo para Ki 67 en las células de la línea germinal en un tubo seminífero normal. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- b) Positividad nuclear para Ki 67 en las células de CIS en un tubo seminífero atrófico. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- c) La inmunomarcación de Ki 67 es positiva en las células de CIS localizadas en el epitelio seminífero y descamadas a la luz tubular. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- d) Ki 67 positivo en células de CIS en tubos atróficos, algunas células inflamatorias del intersticio son también positivas. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- e) Tubo seminífero con células de CIS positivas para Ki 67, destaca la ausencia de espermatogénesis. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- f) Tubo seminífero atrófico con células atípicas sugestivas de CIS, negativas para Ki 67. Anti- Ki 67- Hematoxilina.
- g) Expresión de Ki 67 en seminoma: la positividad es nuclear fuerte y difusa, indicando un índice de proliferación elevado. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

***Fig. 6. Expresión de Ki 67 en tumores testiculares de células germinales no seminomatosos***

**a y b)** Expresión de Ki 67 en carcinoma embrionario: positividad difusa y fuerte indicando un alto índice de proliferación. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**c)** Ki 67 se expresa en forma difusa en los núcleos del tumor de seno endodérmico. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**d)** El Ki 67 es fuertemente positivo en los núcleos del cito y sincitiotrofoblasto de un coriocarcinoma. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**e)** Expresión de Ki 67 en el teratoma maduro: positividad difusa en el núcleo de las células epiteliales maduras que revisten un quiste. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**f)** Importante proliferación epitelial constituido por células malignas indiferenciadas y con un alto índice de Ki 67. Externamente se observan abundantes células de pequeño tamaño. Esta imagen fue tomada de un área de teratoma inmaduro. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**g)** El Ki 67 se expresa en las células epiteliales inmaduras en forma difusa y fuerte. Teratoma inmaduro. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

**h)** Teratoma inmaduro. Expresión de Ki-67 tanto en los núcleos de las células epiteliales inmaduras como en las células pequeñas en el estroma. Anti- Ki 67- Hematoxilina.

***Fig. 7. Expresión de MAGE en el testículo normal, en tubos atróficos y en el CIS***

- a) Expresión positiva y muy intensa de MAGE en el citoplasma de las espermatogonias basales normales, y más tenuemente en el citoplasma de los espermatoцитos primarios de un testículo normal. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- b) El MAGE es positivo en las células germinales premeióticas en un tubo seminífero normal, el resto del epitelio germinal es negativo. Nótese un área de epitelio seminífero que carece de inmunexpresión, debido a la ausencia de espermatogonias basales. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- c) La mayoría de las espermatogonias presentan expresión positiva para MAGE en un tubo seminífero con moderada disminución de la espermatogénesis. Se ven células de CIS con citoplasma vacuolado que carecen de inmunotinción. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- d) Tubo seminífero atrófico con escasas espermatogonias y células del CIS positivas para MAGE. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- e) Tubo seminífero atrófico con espermatogonias basales fuertemente positivas para MAGE. No se observan células de CIS. A nivel del estrato de células de Sertoli, focalmente se evidencian células grandes pleomórficas con fuerte marcaje de MAGE en el núcleo y en la membrana celular. Estas células pueden interpretarse como megaloespermatoцитos, ya que carecen de los criterios de diagnóstico citológico del CIS. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- f) Tubos seminíferos dilatados con células de CIS positivas en forma difusa e intensa para MAGE. En la porción inferior, tubo con hipoespermatoγénesis e intenso inmunomarcaje nuclear en las espermatogonias basales, y más tenue en los espermatoцитos primarios Anti- MAGE- Hematoxilina.



***Fig. 8. Expresión de MAGE en carcinoma in situ***

- a) Expresión de MAGE en CIS. Se observa intensa positividad con un patrón de membrana y también en el citoplasma perinuclear de las células de CIS. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- b) Tubos atróficos con CIS. Las células neoplásicas son fuertemente positivas para MAGE, las células de Sertoli residuales y las de Leydig son negativas. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- c) Expresión de MAGE en CIS, la tinción es positiva en las células neoplásicas dispuestas cerca de la membrana basal. También algunas espermatogonias basales muestran marcaje intracitoplásmico. El resto de células de la espermatogénesis y las células de Sertoli carecen de inmunotinción. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- d) La expresión de MAGE en el CIS es positiva en una subpoblación de células neoplásicas, pero en otras células malignas el inmunomarcaje es rigurosamente negativo, lo que indica lo heterogéneo de su fenotipo. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- e) Tubo seminífero con una célula de CIS binucleada positiva para MAGE, las células negativas corresponden a células de Sertoli residuales. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- f) Tubo seminífero ocupado por un seminoma intratubular con intensa expresión de MAGE de patrón de membrana y, ocasionalmente, también intranuclear. Se observan algunas células malignas infiltrantes en el intersticio adyacente que conservan la expresión de MAGE. Anti- MAGE- Hematoxilina.

***Fig. 9. Expresión de MAGE en Seminomas***

- a)** Seminoma con expresión de MAGE en el citoplasma perinuclear. Se observa una positividad fuerte y difusa de patrón de membrana y también en el citosol. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- b)** Seminoma, la expresión de MAGE se observa en forma focal, positivo en el citoplasma y la membrana; además, algunos núcleos tumorales también muestran fuerte marcaje. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- c)** Escasas células de MAGE positivas en el citoplasma y la membrana de las células de un Seminoma clásico. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- d)** Algunas células de Seminoma positivas para MAGE, pero la mayoría son rigurosamente negativas. Los linfocitos carecen de inmunotinción. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- e)** La expresión de MAGE en las células de CIS es fuertemente positiva en el citoplasma y la membrana. Adyacentemente, se ve la migración de células del CIS a través de la pared peritubular, las cuales se entremezclan con un tumor sólido, sin inmunotinción (muy probablemente se trata de un carcinoma embrionario). Anti- MAGE- Hematoxilina.
- f)** El patrón de expresión de MAGE es positivo en el citoplasma y la membrana del seminoma que rodea a un tubo seminífero residual y atrófico sin inmunomarcaje. Nótese algunas células de CIS también negativas. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- g)** Expresión de MAGE en un CIS, se observa positividad intensa citoplásmica y en la membrana. Algunas células infiltrantes también están inmunoteñidas. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- h)** Células de Seminoma positivas para MAGE en forma intensa y difusa. Los linfocitos periféricos son negativos. Anti- MAGE- Hematoxilina.

***Fig. 10. Expresión de MAGE en tumor de seno endodérmico y en carcinoma embrionario***

- a)** El tumor de seno endodérmico es negativo para MAGE. En el centro se observa un tubo seminífero con CIS que presenta un patrón de membrana francamente positivo. Algunos núcleos tumorales son positivos. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- b)** El MAGE es negativo en el tumor de seno endodérmico y fuertemente positivo en el citoplasma y en los núcleos de las células de CIS que se encuentran en la parte superior de la imagen. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- c)** Carcinoma embrionario con patrón sólido negativo para MAGE. Se observa en el centro un tubo seminífero con CIS cuyas células son positivas. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- d)** La expresión de MAGE es sólo en las células de tipo seminoma, el carcinoma embrionario es negativo. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- e)** MAGE negativo en tumor de seno endodérmico; excepcionalmente se ve alguna célula indiferenciada positiva. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- f)** Tumor de senos endodérmico negativo para MAGE. En el centro se observan células de seminoma infiltrante fuertemente positivas. Anti- MAGE- Hematoxilina.

***Fig. 11. Expresión de MAGE en teratoma inmaduro y maduro***

- a) Teratoma inmaduro negativo para MAGE. Algunas células del intersticio de gran tamaño son positivas. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- b) Teratoma inmaduro con derivados neuroectodérmicos negativos y células infiltrantes de tipo seminoma con positividad perinuclear y de la membrana celular. Algunos núcleos también son positivos. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- c) Teratoma inmaduro asociado a células malignas con intensa positividad de MAGE. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- d) Teratoma maduro. Tanto las células epiteliales como el mesénquima maduro son negativos para MAGE. Anti- MAGE- Hematoxilina.
- e) Teratoma inmaduro con células epiteliales muy proliferativas negativas para MAGE. Anti- MAGE- Hematoxilina.

***Fig. 12. Expresión de Aurora A en testículo normal, atrófico y CIS***

- a) Patrón de expresión de Aurora A .Se observa positividad nuclear en el epitelio germinal normal. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- b) Tubo seminífero con espermatogénesis conservada que muestra positividad para Aurora A en algunos de los núcleos de las células germinales. Las células de Sertoli son negativas. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- c) Aurora A. Patrón de expresión nuclear en el epitelio germinal normal. Algunos núcleos de las células de Sertoli tienen trazas de inmunotinción. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- d) Patrón de expresión de Aurora A en el CIS. Se observa positividad nuclear en las células neoplásicas dispuestas en la capa basal y en la luz tubular. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- e) CIS. El patrón de expresión de Aurora A en las células neoplásicas es nuclear e intenso. Las células mioides peritubulares son negativas. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- f) Patrón de expresión de Aurora A en un tubo muy plegado que contiene células de CIS. Se observa positividad nuclear difusa e intensa en los núcleos de las células neoplásicas. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- g) Nidos de células de seminoma que expresan a nivel nuclear positividad para Aurora A. Anti- Aurora A- Hematoxilina.

***Fig. 13. Expresión de Aurora A en seminoma y carcinoma embrionario***

- a) Expresión de Aurora A en seminoma. Se observa positividad nuclear difusa e intensa sólo en algunas células neoplásicas, mientras que otras células de seminoma y los linfocitos son negativas. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- b) Se aprecia todo un espectro de inmunotinción de Aurora A en el citoplasma de las células de seminoma, muchas de las cuales sólo contienen trazas de inmunomarcaje. Algunos núcleos tumorales son positivos para Aurora A. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- c) Expresión de Aurora A en seminoma. En este caso, se observa evidente positividad para Aurora A, pero sólo en algunas células neoplásicas, la mayoría de las células del seminoma son negativas. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- d) Expresión de Aurora A en carcinoma embrionario. Se observa positividad citoplásmica intensa y difusa. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- e) Carcinoma embrionario de patrón glandular que reviste una cavidad microquística. Se observan núcleos fuertemente positivos para Aurora A y una tenue tinción del citoplasma. El estroma linfoide es negativo. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- f) Las células de un carcinoma embrionario expresan positividad intensa en el núcleo para Aurora A. También el epitelio de revestimiento de la formación glandular es positivo y algunas células inmunocompetentes muestran vestigios de tinción citoplásmica. Anti- Aurora A- Hematoxilina
- g) Patrón sólido de carcinoma embrionario. Algunas células epiteliales presentan un patrón de membrana, típico de la Aurora A, pero las mayoría de las células tumorales son negativas. Anti- Aurora A- Hematoxilina
- h) Carcinoma embrionario de patrón sólido. La expresión citoplásmica y nuclear de Aurora A es muy irregular. Anti- Aurora A- Hematoxilina

***Fig. 14. Expresión de Aurora A en tumor del seno endodérmico y en teratoma***

- a) Patrón de expresión de Aurora A en tumor del seno endodérmico, tenuemente positivo en el núcleo y en el citoplasma de algunas células tumorales. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- b) Positividad difusa nuclear y citoplásmica para Aurora A en las áreas sólidas y cordonales de un tumor del seno endodérmico. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- c) Tumor del seno endodérmico de patrón mixoide. La Aurora A se expresa en el núcleo de las células neoplásicas que forman los espacios sinusoidales. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- d) Teratoma inmaduro. Se observan núcleos positivos para Aurora A en las células epiteliales y en los nidos sólidos mesenquimales proliferantes. Otras células intersticiales carecen de inmunexpresión. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- e) Teratoma maduro. Patrón de expresión nuclear de Aurora A en las células epiteliales. Las células mesenquimales fusiformes son negativas o sólo tienen trazas de inmunotinción. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- f) Teratoma inmaduro. Patrón de expresión de Aurora A positivo en el núcleo y en el citoplasma de la mayoría de las células epiteliales. Los linfocitos de la lámina propia son negativos. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- g) Teratoma maduro con positividad nuclear para Aurora A en las células epiteliales. Anti- Aurora A- Hematoxilina.
- h) Foco de células inmaduras en el estroma de un teratoma con expresión nuclear y citoplásmica de Aurora A. Anti- Aurora A- Hematoxilina.

***Fig. 15. Expresión de Aurora B en testículos atróficos no neoplásicos***

- a) Expresión nuclear de Aurora B en testículo con tubos atróficos y espermatogénesis anormal. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- b) Tubo seminífero con un patrón de “solo Sertoli”. La expresión de Aurora B es fuertemente positiva en todos los núcleos de las células de Sertoli y tenuemente positiva en su citoplasma. Las células peritubulares también tienen marcaje nuclear. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- c) Atrofia tubular. Los tubos solo contienen células de Sertoli, la mayoría de las cuales exhiben inmunomarcaje nuclear, aunque algunas son negativas. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- d) Expresión nuclear de Aurora B en tubos con células de Sertoli, espermatogonias basales y algunos espermatoцитos. Anti- Aurora B- Hematoxilina.



***Fig. 16. Expresión de Aurora B en CIS y seminoma***

- a)** Patrón de expresión de Aurora B en CIS. Es intensamente positivo en los núcleos de las células de CIS. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- b)** CIS. Se observa positividad intensa en el núcleo de las células de CIS en dos tubos atróficos. Las células mioides peritubulares son negativas o tenuemente positivas. Algunas células de Leydig presentan expresión nuclear de Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- c)** Tubo seminífero con CIS. Se observa el patrón de expresión nuclear de Aurora B en las células tumorales basales. Algunos núcleos de las células de Sertoli son también positivos. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- d)** Tubo seminífero comprimido mostrando células de CIS, con positividad nuclear de Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- e)** Tres secciones tubulares que contienen células de CIS. Se observa positividad nuclear intensa para Aurora B en las células neoplásicas y en algunas espermatogonias basales. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- f)** Todos los tubos seminíferos están ocupados por células de CIS con intenso marcaje nuclear de Aurora B. Nótese la presencia de células germinales no tumorales y células de Sertoli, con irregular marcaje nuclear y citoplásmico de Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- g)** Seminoma intratubular en el que los tubos seminíferos están ocupados completamente por células malignas con intensa expresión nuclear de Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.

***Fig. 17. Expresión de Aurora B en seminomas y en carcinomas embrionarios***

- a)** Patrón de expresión de Aurora B en CIS asociado a seminoma infiltrante. Se observa intensa positividad en el núcleo de células neoplásicas intratubulares y en las áreas infiltrantes del seminoma. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- b)** Seminoma. Los núcleos son positivos en forma intensa y difusa para Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- c)** Se observa un patrón nuclear positivo para Aurora B en las células neoplásicas del seminoma y también en algunos núcleos de los linfocitos intersticiales. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- d)** Invasión de sendos linfáticos intratesticulares por células de seminoma fuertemente inmunomarcadas con Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- e)** Importante dilatación de una vénula embolizada por células tumorales con intensa inmunoexpresión nuclear de Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- f)** Carcinoma embrionario. Se observa positividad nuclear intensa y difusa en las células neoplásicas. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- g)** Patrón de expresión de Aurora B en el carcinoma embrionario. Se aprecia positividad de Aurora B en los núcleos del epitelio glandular y en las áreas sólidas. Anti- Aurora B- Hematoxilina.

***Fig. 18. Patrón de expresión de Aurora B en tumores del seno endodérmico y en teratomas***

- a) El patrón de expresión nuclear de Aurora B es intenso y difuso en las células de un tumor de seno endodérmico con formaciones glandulares, sinusoidales y de tipo glomeruloide. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- b) Tumor del seno endodérmico de patrón sólido. Positividad nuclear difusa para Aurora B. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- c) Patrón microquístico de tumor del seno endodérmico. La expresión de Aurora B es positiva en los núcleos de las células neoplásicas. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- d) Patrón mixoide de un tumor del seno endodérmico. La Aurora B se expresa en los núcleos positivos de todas las células tumorales. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- e) Expresión nuclear de Aurora B en las células epiteliales cúbicas y planas de un teratoma. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- f) Patrón de expresión de Aurora B en el teratoma maduro. Se observa positividad en el núcleo de las células epiteliales de un quiste. Las células mesenquimales fusiformes carecen de inmunotinción. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- g) Teratoma inmaduro. Se observa expresión nuclear de Aurora B en las células epiteliales que revisten un quiste y también en la mayoría de las células mesenquimales. Anti- Aurora B- Hematoxilina.
- h) Teratoma inmaduro. Intensa expresión nuclear de Aurora B en la mayoría de las células fusiformes proliferantes. En el centro se ve un nido de células tumorales pleomórficas con fuerte tinción nuclear. Es difícil precisar si esta área corresponde a un tubo con CIS atrapado por las células fusiformes o a una diferenciación epitelial del teratoma. Anti- Aurora B- Hematoxilina.

***Fig. 19. Expresión de Survivina en los tubos seminíferos normales y atróficos con diferenciación de CIS***

- a) Testículo normal. La expresión de Survivina es citoplásmica y nuclear y se observa en todo el espesor del epitelio germinal. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- b) Expresión de Survivina en tubos seminíferos normales o con ligera hipoespermatogénesis. Se observa positividad nuclear principalmente en las espermatogonias y en las células de Sertoli; sin embargo, la Survivina es también positiva en el resto de las células de la espermatogénesis y en las células de Leydig. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- c) Tubos seminíferos con expresión nuclear y citoplásmica de Survivina. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- d) Tubos atróficos. Expresión de Survivina en la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli que muestran signos disgenéticos. Su citoplasma presenta tenue inmunotinción. En el intersticio, las células de Leydig son positivas. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- e) Expresión de Survivina en tubo seminífero atrófico y con luz dilatada. La positividad es citoplásmica y nuclear. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- f) Tubo seminífero con espermatogénesis conservada que expresa Survivina en el citoplasma y el núcleo. Además, se ve un tubo atrófico que contiene células de CIS con menor intensidad de tinción nuclear. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- g) Expresión de Survivina en CIS, se observa intensa positividad en el núcleo y menor positividad en el citoplasma de las células tumorales, de las células de Sertoli y de las células de Leydig. Anti- Survivina- Hematoxilina.

***Fig. 20. Expresión de Survivina en CIS y seminoma***

- a)** CIS. La expresión de Survivina es en el núcleo y en el citoplasma de las células grandes de disposición basal. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- b)** Tubos seminíferos atróficos con células de CIS que expresan Survivina en el citoplasma y el núcleo. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- c)** Tubo seminífero atrófico que expresa positividad para Survivina en el citoplasma y el núcleo. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- d)** CIS. Las células expresan intensa positividad nuclear para Survivina. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- e)** Tubos seminíferos con CIS, positivos para Survivina y, en el extremo derecho, seminoma con el mismo patrón de expresión. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- f)** Expresión de Survivina en el citoplasma y la membrana de las células neoplásicas de un seminoma. Se observa un tubo seminífero atrófico con comienzo de la formación de un microlito. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- g)** Se observa intensa expresión nuclear de Survivina en el citoplasma y el núcleo de todas las células del seminoma. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- h)** Menor intensidad de expresión de survivina en otro seminoma bien diferenciado. Anti- Survivina- Hematoxilina.

***Fig. 21. Expresión de Survivina en tumores testiculares de células germinales de tipo no-seminomatoso***

a) Carcinoma embrionario de tipo glandular. El patrón de expresión de Survivina es principalmente citoplasmico y membranoso en forma difusa e intensa. Anti- Survivina-Hematoxilina.

- b)** Mayor expresión de la Survivina en las células epiteliales de las glándulas de un carcinoma embrionario. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- c)** Nidos de carcinoma embrionario sólido positivos para Survivina. Se distingue un tubo seminífero con CIS también positivo. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- d)** Tumor del seno endodérmico de patrón microquístico. La expresión de Survivina es citoplásmica y nuclear en forma difusa e intensa. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- e)** El patrón de expresión de Survivina en este tumor del seno endodérmico microquístico y sólido es intenso y difuso y el marcaje es principalmente citoplásmico. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- f)** Patrón de expresión de Survivina en un tumor del seno endodérmico dispuesto en íntima vecindad de un tubo seminífero con CIS, que presenta núcleos fuertemente positivos. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- g)** Teratoma inmaduro. Las estructuras tubulares son intensamente positivas para Survivina a nivel citoplásmico y nuclear. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- h)** Teratoma maduro. La expresión de Survivina es observada en el citoplasma de las células epiteliales maduras que revisten un quiste. Las células basales muy proliferativas carecen de inmunotinción. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- i)** Teratoma maduro. Se observa la expresión nuclear de la Survivina en el citoplasma de las células mucosecretoras y caliciformes que revisten un quiste. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- j)** Teratoma maduro. Expresión de Survivina principalmente en el citoplasma de las células del epitelio de revestimiento. En el estroma también se objetivan núcleos de células mesenquimales positivos para Survivina. Anti- Survivina- Hematoxilina.
- k)** Teratoma maduro. Células epiteliales mucosecretoras que expresan Survivina en el citoplasma. Subyacentemente se ve un nido de células de sincitiotrofoblasto con intenso marcaje nuclear Anti- Survivina- Hematoxilina.

## **DISCUSIÓN**



Los TCGT se desarrollan a partir de la transformación neoplásica de las células germinales primordiales (PGC) también denominadas como gonocitos embrionarios,<sup>10,223,238,264</sup> se forman de este modo células germinales malignas en el interior de los tubos seminíferos, denominadas células de CIS.<sup>151,153,263</sup>

Esta célula de CIS es posible que siga dos caminos divergentes de diferenciación: uno terminal, seminoma, y otro hacia la formación de un carcinoma embrionario, el cual posteriormente podría diferenciarse en otro u otros componentes no seminomatoso.<sup>316</sup> Sin embargo, Ulbrigh et al.<sup>297</sup> desarrollaron una nueva teoría de la histogénesis de estos tumores en la cual el seminoma no es una diferenciación terminal y puede actuar como precursor de algunos o de todos los tumores no seminomatosos.<sup>297</sup>

En el presente estudio de TCGT, el principal criterio de selección del material fue que todos los casos con TCGT tuvieran parénquima testicular conservado y en el cual se evidenciara claramente la presencia de CIS. En esta Tesis se han evaluado nuevas moléculas que intervienen en la regulación de la mitosis en células normales y en células neoplásicas y que corresponden a la familia de Aurora quinasas y a la survivina, implicada en mecanismos de supervivencia celular, las cuales, en nuestro conocimiento, no han sido exploradas previamente en los diferentes tipos histológicos de los TCGT. El interés de esta investigación viene determinado, de una parte, por establecer si existen perfiles específicos de expresión de estas moléculas en el seminoma y en las variantes histológicas de los TCGT no-seminomatosos, y, de otra, por el nuevo interés que han suscitado las moléculas de la familia Aurora quinasas como posibles candidatas a ser dianas terapéuticas en diferentes neoplasias, ya que en la actualidad existen varios estudios farmacológicos en fase preclínica con resultados esperanzadores.

Se sabe que la producción diaria de espermatozoides en el testículo humano puede alcanzar los 200 millones. De estos, una parte sustancial degenera al avanzar por la vía de maduración espermática. Esta alta producción de células es el resultado de los altísimos índices de división celular que experimentan las espermatogonias basales, lo que se puede constatar por el alto índice de proliferación celular evaluado mediante la expresión nuclear del antígeno Ki 67 en muchas de las espermatogonias de tipo A y también de tipo B. En efecto, en nuestro material de TCGT, y en aquellos casos que aún conservaban un ribete de parénquima testicular con tubos con diferenciación de todos los estadios de la espermatogénesis, hemos encontrado

una alta expresión intranuclear de Ki 67 en las espermatogonias y una menor expresión en los espermatocitos de primer orden; curiosamente, los espermatocitos de segundo orden y, sobre todo, las espermátidas redondas y elongadas también mostraban inmunomarcaje en el citoplasma con el anticuerpo anti-ki 67, lo que puede explicarse si se tiene en cuenta que durante el proceso de mitosis de las espermatogonias, proteínas nucleares difunden al citosol cuando aún no se ha formado la carioteca de los dos pronúcleos, por lo que estas proteínas pueden quedar ahora marcadas por anticuerpos específicos de moléculas de proliferación celular.

Es sin duda en los núcleos de las células del CIS en los que el inmunomarcaje de Ki 67 resulta más robusto en intensidad y en áreas de superficie nuclear inmunoteñida. Y, en efecto, este marcador fuertemente positivo, no sólo se ve en las células del CIS dispuestas sobre la membrana basal, sino que también se conserva con idénticas características en las células del CIS que se descaman a la luz tubular y en aquellas que ocupan todo el tubo seminífero, en lo que corresponde al denominado seminoma intratubular. No obstante, la expresión de Ki 67 no es el marcador universal de las células del CIS, ya que su expresión no es constante en todas las células de CIS: en un mismo tubo o en tubos adyacentes se pueden encontrar células con todas las características morfológicas propias del CIS y que carecen de marcaje con anticuerpos anti-Ki 67. Por ello, la fosfatasa alcalina placentaria-like (PLAP) fue uno de los primeros marcadores encontrados en los tumores testiculares como marcador diagnóstico de CIS; se trata de una fosfatasa alcalina específica de tejido con función biológica desconocida, que se expresa también en el seminoma clásico, al igual que en las células primordiales germinales y en los gonocitos primarios.<sup>25,39,88,117,127,125,133,134,139, 159,236</sup> Actualmente, PLAP sigue siendo el marcador más comúnmente usado para CIS en las biopsias testiculares y en otras muestras patológicas de tejido testicular.<sup>213,238,267</sup> Así mismo, trabajos clásicos histoquímicos de TCGT han demostrado que las células del CIS y de los seminomas intratubulares son PAS positivas y diastasa lábiles y, por último, estudios inmunohistoquímicos más recientes también han establecido que las células de CIS muestran un característico patrón de membrana para c-Kit (CD117), aunque este marcador no siempre está presente en estas células tumorales.<sup>40,291</sup>

La presencia de células de CIS negativas para Ki 67 no nos debe extrañar, ya que se sabe que durante el ciclo celular de células normales o de células neoplásicas, los antígenos de

proliferación celular, sobre todo PCNA-ciclina, pero también el MIB-1 (Ki-67) cuando son negativos en células neoplásicas, tal como ocurre en algunas células de CIS, indican que estas células malignas no se encuentran en fase de división celular, sino que se hallan en un período de quiescencia celular, que puede durar menos de un día (células de CIS muy proliferativas y en franco crecimiento tumoral) o años, como ocurre en pacientes con disgenesia testicular y cuyo CIS permanece presente en la biopsia testicular practicada durante el descenso tardío puberal y que, sin embargo, no desarrollan un verdadero cáncer testicular. Y es que el anticuerpo anti-Ki-67 sólo se expresa durante el ciclo celular en las fases G1 tardía y S (y quizás a nivel de trazas en la fase G2) pero no se identifica en las fases de mitosis ni tampoco en la fase G0 en los periodos intermitóticos.

Tampoco el empleo del anticuerpo anti- Ki-67 ha permitido establecer el diagnóstico diferencial entre células de CIS y espermatogonias hipertróficas, células muy frecuentemente encontradas en los testículos de ancianos, así como en numerosas patologías testiculares congénitas y adquiridas que cursan con subfertilidad. Este tipo celular también ha sido observado frecuentemente en muchos casos incluidos en el presente estudio. Se sabe que las espermatogonias hipertróficas, al igual que las espermatogonias basales, pueden expresar Ki 67, ya que pueden conservar los mecanismos moleculares implicados en la división celular. Las espermatogonias hipertróficas pueden alcanzar gran tamaño y presentar núcleos muy grandes, pleomórficos, con cromatina muy densa y uno o varios nucléolos grandes y fuertemente eosinófilos,<sup>202-205</sup> incluso el citoplasma puede ser amplio y granular, aunque estas espermatogonias suelen mostrar mucha heterocromatina, mientras que los núcleos de CIS son vesiculosos; además, el citoplasma de las células de CIS está siempre muy retraído (aparece con espacios claros) debido a la extracción de sus altos niveles de glucógeno durante el procesamiento histológico de la muestra testicular. Sin duda, de nuevo, la detección inmunohistoquímica de PLAP mostraría su fuerte positividad en el citoplasma de las células del CIS mientras que es negativo en las espermatogonias hipertrofiadas y en las espermatogonias multinucleadas.

Los TCGT presentan alteraciones importantes de la concentración de ADN y presentan hiperploidías y aún más frecuentemente, aneuploidías. Por ello, resulta de gran importancia importante establecer las cargas de DNA que tienen los tumores testiculares (para revisión ver

Serrano et al.<sup>258</sup>). Los seminomas parecen ser hipertriploides o tetraploides; contrariamente, los TCGT no seminomatosos parecen estar en un rango hipotriploide peritriploide.<sup>58,209,244,262</sup>

Está completamente establecido que el CIS se inicia con una aneuploidía acompañada de una extensa inestabilidad cromosómica, y probablemente la aneuploidía precede a la expresión completa del fenotipo del CIS. Esto es particularmente importante si se tiene en cuenta la heterogeneidad citológica de la espermatogonia infantil normal.<sup>158</sup> También se ha demostrado que todos los TGCT seminomas y no seminomas, así como el CIS, son aneuploides. En los tumores testiculares invasivos la única alteración cromosómica estructural constante es la ganancia en el brazo corto del cromosoma 12, en gran parte debida a la formación de un isocromosoma i(12p). Esto sugiere que el incremento en el número de copias del gen 12p está asociado con el desarrollo de las manifestaciones clínicas;<sup>153</sup> sin embargo, el análisis citogenético de aneuploidía del CIS sólo revela la presencia de i(12p) en algunos casos.<sup>302,309</sup> Así mismo, los datos obtenidos sugieren que esta ganancia de la secuencia 12p está asociada con la supresión de la apoptosis y la independencia de la función de regulación esteroideogénica de las células de Sertoli respecto a las células del CIS.<sup>153</sup> Uno de los genes con más posibilidades de estar involucrado en este proceso es el gen DAD-R, posiblemente mediante la N-glucosilación.<sup>153</sup> La determinación de alteraciones específicas de los cromosomas puede realizarse mediante técnicas de hibridación *in situ*, usando sondas específicas unidas a fluorocromos de sistemas enzimáticos, pero su aplicación en el diagnóstico rutinario de los TCGT aún no se ha estandarizado, dado que su cuantificación es difícil y requiere mucho tiempo de personal técnico altamente cualificado.

En la última década han surgido nuevas proteínas que estudiadas inmunohistoquímicamente permiten avanzar en el diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de TCGT y buscan identificar mejor aquellas células similares morfológicamente a las células de CIS pero que no expresan PLAP. Dentro de estas moléculas, dos han sido ampliamente citadas en la literatura como marcadores del CIS, con alta reproductibilidad en la mayoría de los laboratorios de Anatomía Patológica: la denominada OCT 4, y la más moderna aún denominada MAGE A4. Dado que existe un consenso acerca de los excelentes resultados diagnósticos y de calidad de inmunotinción obtenidos con OCT 4 y que, de otra parte, las publicaciones centradas en la expresión de MAGE en los TCGT, incluido el CIS, han sido notoriamente menores y los resultados muy contradictorios, en la presente Tesis hemos

realizado una exploración exhaustiva de esta molécula en tubos seminíferos normales con espermatogénesis conservada, en tubos seminíferos con diferente grado de atrofia del epitelio tubular y, obviamente, en el CIS, en los seminomas y en los diferentes tipos de TCGT no-seminomatosos.

Se sabe que los genes MAGE se expresan en una amplia variedad de tumores y en las células germinales premeióticas del testículo normal (espermatogonia mitótica y espermatocito primario); pero además, recientemente, se han detectado los antígenos MAGE-A4 (y también el antígeno NY-ESO-1) en las células de CIS.<sup>13,250</sup> Estos antígenos han sido denominados como antígenos "cáncer/testis". Los genes cáncer/testis codifican las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, y se expresan en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama, el melanoma, el cáncer de pulmón o el carcinoma de colon; estas moléculas son reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos de pacientes con cáncer.<sup>301</sup> La identificación de estas nuevas moléculas está demostrando en la actualidad una similitud muy próxima del CIS a la célula primordial germinal y al gonocito, consistente con el origen premeiótico del CIS, puesto que los gonocitos normales y las células del CIS expresan las mismas proteínas de superficie celular (PLAP, cKIT),<sup>121,220</sup> y también algunos marcadores específicos de célula germinal (MAGEA4, VASA, TSPY, NY-ESO-1). Además, los gonocitos y las células del CIS también están regulados por las mismas moléculas que controlan el ciclo celular (p53, CHK2, p19-INK4d).<sup>220</sup> De hecho, el perfil de expresión génica de las células del CIS es muy semejante al de la célula madre embrionaria,<sup>121,220</sup> y esta distribución puede ser explicada por la ruta de migración que toman las células germinales durante la embriogénesis.<sup>8</sup> En definitiva, dado que el MAGE se expresa intensamente en el CIS y en los precursores fetales de las células madre germinales en la semana 17 de la gestación, parece muy verosímil la hipótesis de que el CIS podría originarse de las prespermatogonias fetales.<sup>13</sup>

En aquellos casos estudiados que aún conservaban parénquima testicular no infiltrado por el tumor hemos comprobado que MAGE se expresa en el epitelio germinal durante la espermatogénesis normal, obteniéndose una intensa inmunotinción citoplásmica de MAGE en las espermatogonias basales y suprabasales y también se expresa, aunque con menor intensidad en el citoplasma de los espermatocitos de primer orden. En todas estas células el patrón de expresión de MAGE es fuertemente perinuclear (expresión en el área del aparato de Golgi), pero también de membrana, determinando perfectamente el contorno de las células germinales,

que así quedan perfectamente delimitadas del citoplasma de las células de Sertoli adyacentes, las cuales son rigurosamente MAGE negativas. Pero, además, en aquellos tubos seminíferos atróficos en los que existe una importante alteración de la espermatogénesis, la expresión de MAGE persiste en el citoplasma, pero se hace muy intensa a nivel nuclear en las espermatogonias y también en las espermatogonias hipertróficas, en las espermatogonias bi o multinucleadas y en los megaloespermatocitos de primer orden.

La expresión de MAGE en el CIS es muy heterogénea, ya que en un mismo tubo seminífero pueden verse células de CIS con fuerte expresión nuclear, dispuestas en íntima vecindad con otras células de CIS rigurosamente negativas para MAGE. Cuando las células del CIS proliferan y ocupan ya todo el tubo seminífero, dando el típico patrón de seminoma intratubular, la expresión de MAGE es mucho más constante en el citoplasma de todas las células tumorales y además muchas de estas células, pero no todas, tienen también intenso marcaje nuclear de MAGE. Este comportamiento positivo de la molécula MAGE en células germinales normales y neoplásicas no nos tiene que sorprender, y están en consonancia con estudios previos que demuestran que los seminomas expresan también los mismos genes asociados a la regulación de una espermatogénesis normal, esto es, el gen *PRAME*, el gen *MAGE A4*, el gen *SPAG1*, y el gen *HPX*.<sup>30</sup>

En los seminomas infiltrantes también la expresión de MAGE es bastante irregular: en la mayoría de los casos se observa un intenso patrón de membrana, asociándose una menor expresión en el área perinuclear. En estos casos la mayoría de los núcleos muestran inmunomarcaje fuerte y difuso por todo el nucleoplasma; no obstante, entremezclados con estos núcleos intensamente positivos, se evidencian otras células seminomatosas rigurosamente negativas, por lo que esta molécula no siempre identifica a la célula de seminoma. En efecto, en algunos casos de seminoma puro y sobre todo, en patrones de seminoma claramente diferenciados dentro de un TCGT mixto, las células MAGE negativas no son las más abundantes, por lo que este marcador no es completamente satisfactorio en la confirmación inmunohistoquímica de las células de seminoma testicular. Nuestros datos confirman un estudio previo en el que se describe que en los seminomas clásicos MAGE se identifica de forma uniforme y específica en todas las células tumorales y, contrariamente, MAGE es negativo en los seminomas anaplásicos;<sup>13</sup> en este mismo estudio estos autores encuentran, al igual que lo que ocurre en nuestro material evaluado en la presente Tesis, que curiosamente

MAGE se expresa específicamente sólo en una subpoblación de células de CIS, pero en otras, no; estos datos proporcionan evidencia clara de la heterogeneidad del fenotipo de las células del CIS.<sup>13</sup> En nuestro material, es posible que estas células de seminoma que carecen de inmunomarcaje con el anticuerpo anti-MAGE sean más desdiferenciadas y primitivas y presenten un perfil genético alterado, o quizá estas células de seminoma MAGE negativas sean en realidad células totipotenciales inmaduras en vías de diferenciación a partir de un carcinoma embrionario; esta hipótesis se sustenta, en parte, en estudios de genética molecular que se han centrado en determinar diferencias transcripcionales que permiten establecer el diagnóstico diferencial molecular entre los seminomas y los carcinomas embrionarios, y que ,además, están investigando los genes más característicos de cada uno de los diferentes subtipos histológicos de los TCGT.<sup>30</sup>

En el presente estudio de TCGT, expresión de MAGE sólo se ha identificado en el CIS y en el seminoma y es rigurosamente negativo en los componentes no-seminomatosos de los TCGT mixtos; así mismo, es negativo en aquellos casos diagnosticados de carcinoma embrionario puro y de tumor del seno endodérmico puro. Estos resultados de negatividad constante en ambos patrones no son consecuencia de pérdida del epítipo de MAGE debido a que estos casos estuvieran defectuosamente fijados, ya que en el interior de estos patrones no-seminomatosos se encuentran atrapados tubos seminíferos con CIS, cuyas células tumorales muestran una intensa expresión citoplásmica y nuclear de MAGE. Antes bien, nuestros resultados deben considerarse satisfactorios y novedosos ya que permiten establecer el difícil diagnóstico diferencial entre un seminoma y los patrones sólidos de carcinoma embrionario y de tumor del seno endodérmico, lo que tiene singular importancia para poder establecer un adecuado y personalizado protocolo terapéutico. Desde el punto de vista conceptual, estas diferencias de expresión de MAGE entre los seminomas y los carcinomas embrionarios y los tumores de seno endodérmico están en consonancia con estudios genéticos previos, ya que se ha publicado que los carcinomas embrionarios expresan genes de tipo regulatorio, tales como *DNMT3B* y *SOX2*; así como las queratinas K8 y K18 que corresponden a la familia de queratinas de bajo peso molecular.<sup>30</sup>

La ausencia de marcaje con MAGE en los derivados epiteliales de los teratomas maduros y en los derivados neuroectodérmicos de los teratomas inmaduros son también hallazgos novedosos que exigen una mayor exploración de esta molécula en otros tumores germinales

extratesticulares con el fin de confirmar si los elementos derivados del neuroectodermo, incluidos los componentes inmaduros de tipo neuroblástico, carecen siempre de expresión de MAGE. De confirmarse esta sospecha, el uso de MAGE sería muy aconsejable para establecer el difícil diagnóstico diferencial de los seminomas testiculares con aquellos casos excepcionales de verdaderos tumores neuroblásticos primarios del testículo. En definitiva, en nuestra experiencia los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-MAGE, cuando se evalúa su sensibilidad y reproductibilidad diagnóstica del CIS, han sido muy variables y la interpretación controvertida; por lo que consideramos que la detección inmunohistoquímica de MAGE no aporta ventajas con respecto al marcador universalmente reconocido como es el PLAP. Sin embargo, al alta inmunoexpresión de MAGE en algunos seminomas testiculares, aunque no siempre presente en todos los casos, permite su empleo, dentro una batería con otros anticuerpos en el diagnóstico diferencial entre los seminomas y los patrones sólidos indiferenciados de los carcinomas embrionarios y los tumores del seno endodérmico, en los que MAGE es siempre negativo.

En la actualidad, la investigación de nuevas moléculas reguladoras del ciclo celular (específicamente de los mecanismos reguladores de la mitosis), de la apoptosis y de la senescencia celular en los TCGT permite establecer un mejor conocimiento de la biología celular y molecular de estos tumores y, sobre todo, predecir los mecanismos de progresión del cáncer testicular, lo que redundará en un mejor manejo clínico-patológico de los TCGT. Dentro de las moléculas reguladoras de la mitosis en los últimos años ha cobrado especial relevancia la exploración de moléculas de la familia de Auroras (proteín-quinasas), dado que estas moléculas son candidatas como posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de numerosos tipos de tumores malignos. Evidentemente, también resulta muy interesante el estudio de estas moléculas con proteínas que regulan la apoptosis y la supervivencia celular; esto es con los datos de expresión de proteínas pro-apoptóticas (bcl-2) y con moléculas anti-apoptóticas (survivina) en los diferentes patrones histológicos de TCGT.

La exploración de Aurora quinasas, y concretamente de Aurora A y Aurora B, es completamente novedosa en el cáncer testicular sobre todo en su peculiar expresión en los diferentes tipos de TCGT. El estudio de esta familia de proteínas en los TCGT no sólo es consecuencia de la novedad de hacer el mapeo de un nuevo marcador en un grupo de tumores que no se habían explorado previamente, antes bien, es consecuencia de la alta concentración



de moléculas de la familia Aurora quinasas (sobre todo la Aurora C) en el testículo de animales de experimentación y también en el testículo del hombre adulto normal.

En relación con la investigación de la expresión inmunohistoquímica de Aurora A y de Aurora B, los objetivos de la presente Tesis se han centrado en: 1) determinar la frecuencia de la inmunoexpresión de Aurora A, también conocida por el nombre de su gen específico: *STK15*, en el cáncer testicular, y su relación con variables clínico-patológicas e inmunohistoquímicas, en relación con la proliferación celular y la expresión de moléculas inhibitoras de la apoptosis, y 2) determinar la influencia de la expresión de *STK15* en la capacidad tumorigénica de los diferentes patrones histopatológicos de los tumores malignos de células germinales desarrollados en testículos de pacientes normales y en diferentes casos con infertilidad de origen congénito o adquirido.

Las Aurora quinasas son proteínas de la familia serina/treonina quinasas cuya estructura y función está conservada en organismos eucariotas. En el humano se han identificado tres genes de la familia de Aurora quinasas (Aurora A, B y C), y de estos *STK15*, también conocido como *aurora-2*, *aik1*, *btak*, *Aurora-A* y *ark1*, ha sido el primero en describirse. El gen *STK15/Aurora-A* se considera un oncogén que se encuentra amplificado en diversas neoplasias humanas.<sup>287</sup> Las Aurora quinasas se asocian con la dinámica de los centrosomas y los microtúbulos. Se localizan en el centrosoma alrededor del material pericentriolar, en los microtúbulos y en el huso mitótico, en consonancia con su participación en la separación cromosómica y la división celular.<sup>138</sup> La localización de *STK15* puede ser detectada mediante inmunofluorescencia indirecta sólo en los centrosomas duplicados durante el ciclo celular y sólo desde el final de la fase S hasta el comienzo de la fase G1 del ciclo siguiente.<sup>68</sup> El gen de la Aurora A se localiza en una región cromosómica (20q13) que se encuentra amplificada, aunque con frecuencia variable, en el cáncer de mama, vejiga, ovario, páncreas, cabeza y cuello y condrosarcomas.<sup>31,57,288,289,326</sup>

En el presente estudio, se ha explorado la expresión de Aurora A en el testículo normal, en el testículo atrófico y en las neoplasias testiculares, incluyendo el CIS y los diferentes tipos histológicos de TCGT. En el testículo humano normal se observa una intensa inmunoexpresión de Aurora A en los núcleos de las células germinales mientras que la mayoría de las células de Sertoli son negativas o sólo muestran trazas de inmunotinción y las células mioides peritubulares son, así mismo, negativas. Aunque la tinción nuclear de Aurora A es más fuerte y

difusa en las células de CIS, sin embargo, en los seminomas existe una heterogeneidad de marcaje, desde células malignas fuertemente positivas hasta células seminomatosas rigurosamente negativas para Aurora A. Como hallazgo interesante cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre en el CIS en el que la expresión de Aurora A es siempre nuclear, en los seminomas también se pueden apreciar tinción citoplásmica de algunas células tumorales, tanto con inmunomarcaje en la región del Golgi, como una aún más típica inmunorreacción de patrón de membrana en la mayoría de las células tumorales. Esta peculiaridad también se comprueba en los TCGT no-seminomatosos, puesto que las células de carcinoma embrionario de tipo glandular y las células del tumor del seno endodérmico pueden compartir una doble expresión nuclear y citoplásmica. En relación con la heterogeneidad de expresión de Aurora A en los seminomas, sobre todo en la significativa disminución o incluso ausencia de expresión, en algunos casos puede ser secundaria a alteraciones del gen *STK15* o de su transcripción y también puede deberse a las importantes alteraciones del ADN, especialmente teniendo en cuenta las frecuentes aneuploidías que experimentan estos TCGT. En este sentido, es necesario destacar que las alteraciones en la ploidía inducidas por sobreexpresión de *STK15* son potenciadas en las células por p53. Esta observación, unida a la demostración de que *STK15* interacciona con p53 y de que, así mismo, p53 es capaz de suprimir la acción transformante de *STK15*, inhibiendo su actividad quinasa,<sup>47</sup> sugieren que el papel oncogénico que *STK15* puede estar modulado por la actividad génica de la célula, en especial el estado funcional de p53. En este sentido, está establecido que el gen p53 puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de aneuploidía, tras la existencia de diversas alteraciones entre las que se incluye la sobreexpresión de *STK15* como causa de desregulación del proceso mitótico.<sup>174</sup>

Los hallazgos de expresión de Aurora A en los diferentes patrones de TCGT son completamente originales, aunque se ha visto un comportamiento heterogéneo de expresión dependiendo del tipo histológico y de cada paciente estudiado. En nuestro conocimiento, no ha sido abordado previamente un estudio exhaustivo de la expresión de esta molécula en el cáncer testicular, por lo que estos resultados sólo los podemos comparar con las publicaciones previas centradas en la expresión de Aurora A en otros tumores. En este sentido, se ha descrito la sobreexpresión inmunohistoquímica de *STK15* en el 94% de los casos de carcinoma ductal infiltrante de mama, mientras que ninguno de los tejidos normales estudiados expresaban *STK15*.<sup>286</sup> Dada la alta incidencia de sobreexpresión y el bajo número de casos analizados, no se ha encontrado todavía una clara relación entre ésta y otras variables, tales como la expresión

de marcadores de proliferación celular (Ki 67 y PCNA).<sup>286</sup> Recientemente se ha analizado la expresión de mRNA de STK15 en 47 carcinomas de mama mediante RT-PCR cuantitativa y se ha visto que la expresión de STK15 era significativamente mayor en aquellos carcinomas de alto grado, con receptores hormonales negativos; además, aquellos carcinomas con mayor inestabilidad cromosómica mostraron mayor expresión de STK15.<sup>179</sup> En el cáncer de ovario, se ha encontrado un aumento de la actividad quinasa de STK15 en el 48% de los tumores y aumento de su expresión inmunohistoquímica en el 57% de los casos,<sup>101</sup> pero, de otra parte, la amplificación de *STK15* sólo se ha encontrado en el 21% de carcinomas primarios de ovario.<sup>287</sup> Por último, en el cáncer de vejiga, aproximadamente el 50% de los tumores sobreexpresaban STK15 y esta sobreexpresión se asociaba con otros criterios de agresividad de este tipo tumoral, entre los que se encuentran: alto grado histológico, crecimiento no papilar, infiltración, aneuploidía y mayor posibilidad de recidiva y metástasis.<sup>257</sup>

En nuestra serie de TCGT se ha visto que en el parénquima testicular adyacente también hay expresión con el anticuerpo anti- Aurora B. En el testículo humano normal, la Aurora B se expresa fuertemente en el núcleo y de forma más tenue en el citoplasma, en donde adquiere un típico patrón de membrana. En los tubos normales con espermatogénesis conservada, la intensidad de inmunomarcaje es notoriamente superior en los núcleos de las espermatogonias basales si se compara con la débil y difusa tinción granular en los núcleos de las células de Sertoli que, sin embargo, presentan una intensa expresión de Aurora B en su citoplasma. Este peculiar perfil de expresión de Aurora B persiste en aquellos tubos seminíferos atróficos con reducción drástica de la espermatogénesis. En el intersticio, la Aurora B es intensamente positiva en los núcleos de algunas células de Leydig, aunque otras son negativas; así mismo, es muy evidente el marcaje nuclear de Aurora B en las células mioides peritubulares. Por otro lado, la expresión de Aurora B es siempre constante en los núcleos de las células de CIS, aunque la intensidad de inmunotinción varía de unas células a otras incluso dentro del mismo tubo seminífero. Las células de CIS también expresan Aurora B en el citosol, aunque con más débil intensidad. En los seminomas puros y en el componente de seminoma de los TCGT mixtos existe todo un espectro de intensidad de tinción nuclear de Aurora B, siendo mínimo el marcaje citoplásmico, que en estos casos es de tipo granular perinuclear y nunca exhibe el clásico patrón de membrana. En los TCGT no-semimomatosos, así mismo, también se observa un doble patrón nuclear y citoplásmico de expresión de Aurora B, no sólo en las células epiteliales de los carcinomas embrionarios y tumores del seno endodérmico, sino también en

las células mesenquimales fusiformes y en las células inmaduras de tipo neuroblástico de los teratomas inmaduros. En nuestra experiencia valorando TCGT, podemos sugerir que Aurora B no es un buen marcador discriminatorio de diagnóstico diferencial entre espermatogonias normales y aquellas que muestran cambios hipertróficos en relación con el CIS, y tampoco resulta un buen marcador que presente un perfil de expresión peculiar en los distintos tipos de TCGT, a diferencia de lo que ocurre con otros marcadores más clásicos como son las citoqueratinas que, si bien usualmente son negativas en los seminomas que expresan fuerte marcaje con PLAP,<sup>40</sup> son positivas en aquellos seminomas que ya comienzan su diferenciación a carcinoma embrionario y también son positivas, junto con la  $\beta$ HCG en las células del sincitiotrofoblasto.<sup>258</sup>

De otra parte, estamos en desacuerdo con los datos previamente publicados en la literatura acerca de que los niveles de expresión de Aurora quinasas, especialmente referidos a la Aurora A (gen *STK15*), suelen ser bajos o nulos en la mayoría de los tejidos normales, puesto que ambos tipos de Aurora están presentes y muestran intensa inmunorreactividad en numerosas células germinales y las derivadas de los cordones sexuales del testículo humano normal. En este punto, es necesario matizar que, si bien en la mayoría de los tipos histológicos de TCGT se ha comprobado una sobreexpresión tanto de Aurora A como de Aurora B, esta sobreexpresión no siempre está significativamente presente en todos los casos de TCGT. Sin duda es necesario realizar más estudios de esta familia de Aurora quinasas en los TCGT y también en otros tumores germinales tanto del ovario como extratesticulares. Los buenos resultados preliminarmente obtenidos en el cáncer de mama en los que la amplificación y sobreexpresión de Aurora quinasas son relativamente frecuentes, hacen que también en el cáncer testicular la exploración de estas moléculas sea de máxima actualidad, ya que existen evidencias de experimentación animal y también en fase preclínica que sugieren que *STK15* podría ser una diana adecuada para identificar y diseñar nuevos compuestos terapéuticos<sup>311</sup>

Se sabe que la función de la Aurora B quinasa radica esencialmente en la regulación de la fisiología celular del centrómero y del huso central y es crucial para la segregación de los cromosomas y para concluir los procesos de citoquinesis; por ello es necesario abordar nuevas investigaciones centradas en la regulación de la Aurora B en tejidos humanos normales y tumorales, tal como hemos realizado en los TCGT, siendo de especial novedad el abordar la detección del denominado Complejo Asociado Interior de la Proteína del Centrómero

(INCENP) y de la Survivina.<sup>120</sup> La survivina siempre se expresa en el citoplasma de las células normales y su expresión se incrementa significativamente en el citosol y en las membranas citoplásmicas de las células transformadas. Pero, además, en varios tumores, incluido el carcinoma de páncreas, se ha descrito una localización nuclear de la survivina, sobre todo en las lesiones de alto grado, sugiriendo que existe una translocación nuclear de esta proteína, lo que se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.<sup>29</sup> Se sabe que la survivina es un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis y se cree que la survivina tiene un papel en la oncogénesis. Existen tres distintos tipos o isoformas de survivina.<sup>52</sup> La presencia de distintas isoformas de la survivina que son expresadas diferencialmente sugiere que esta molécula realiza un papel complejo en la regulación de la apoptosis,<sup>52</sup> y se sabe que la prolongada vida que experimentan las células neoplásicas se debe a la supresión de la apoptosis, lo que contribuye a la perpetuidad de las células transformadas. Además, las proteínas inhibidoras de la apoptosis tienen un papel importante, puesto que inhiben las caspasa 3,7 y 9. De hecho, la survivina es el único miembro de esta familia que se expresa en muchos cánceres humanos, incluyendo la neoplasia intraepitelial pancreática, pero no se expresa en tejidos adultos normales.<sup>29</sup>

Nosotros hemos encontrado expresión inmunohistoquímica de survivina en el testículo normal y en los TCGT. En el epitelio seminífero normal se ha identificado expresión nuclear de survivina en todas las células de la espermatogénesis, excepto en la fase final de espermiogénesis con la formación de espermátides elongadas. También los núcleos de las células de Sertoli son siempre positivos para survivina. Estos datos confirman estudios previos de testículos normales que demuestran altos niveles de survivina por técnicas de PCR.<sup>313</sup> Este mismo trabajo refiere que la survivina se pierde en los teratomas maduros y en pacientes infértiles con aplasia de células germinales.<sup>313</sup> Sin embargo, nuestros resultados están en franco desacuerdo con esta aseveración ya que hemos observado numerosos casos de TCGT que conservan parénquima testicular que suele mostrar diferentes grados de hipoespermatogénesis, parada en la maduración de la línea germinal y muy frecuentemente una marcada atrofia tubular con la presencia de escasas células germinales basales y un patrón de solo Sertoli. Pues bien, en estos tubos con importantes lesiones siempre hemos encontrado fuerte expresión nuclear de survivina en las espermatogonias y espermátocitos y también, aunque más tenuemente, en los núcleos de las células de Sertoli. Sin duda, es necesario realizar nuevos estudios de detección de survivina en varias patologías testiculares congénitas y adquiridas que

cursan con infertilidad, con el fin de precisar mejor si la desregulación de la apoptosis en las células germinales puede contribuir a la infertilidad, así como a la transformación maligna.<sup>314</sup> Nuestros resultados relativos a la persistencia de la expresión de survivina en tubos seminíferos con lesiones importantes que condicionan subfertilidad del varón difieren sustancialmente de estudios previos que encuentran una disminución en la expresión y la regulación de survivina, sobre todo en las alteraciones graves de la espermatogénesis. De hecho, niveles altos de expresión de survivina se han visto en los testículos normales, pero se evidencia una pérdida de la expresión de survivina en aquellos pacientes con paradas de la espermatogénesis que ocurren en los estadios de diferenciación pre-meiótica y sobre todo también en los casos de aplasia germinal. Por ello, la survivina muy probablemente pueda contribuir al balance entre la proliferación de las células germinales y la apoptosis.<sup>313,314</sup>

En TCGT, estudios previos de expresión de survivina han encontrado un alto marcaje en aquellos casos con componentes indiferenciados, mientras que, en contraposición, la survivina está ausente en teratomas maduros.<sup>313</sup> Los resultados obtenidos en la presente Tesis difieren sustancialmente de esta generalización publicada previamente. Así, cuando evaluamos pormenorizadamente los tubos seminíferos con CIS comprobamos que la expresión nuclear de survivina es muy variable de unas células a otras incluso cuando están próximas en el mismo tubo seminífero, observándose que algunas células de CIS con intenso marcaje de tinción citoplásmica de survivina carecen de expresión nuclear. También en los seminomas infiltrantes se han visto casos con una discordancia de expresión en el núcleo y en el citoplasma, ,incluso se han visto campos microscópicos de seminoma infiltrante con un marcado patrón de membrana de survivina y ausencia o sólo trazas de inmunomarcaje nuclear. En los carcinomas embrionarios también existe doble marcaje nuclear y citoplásmico de survivina y la inmunoexpresión se atenúa en los patrones sólidos desdiferenciados, muy frecuentemente encontrado en los carcinomas embrionarios. Esta disminución de survivina en los casos desdiferenciados difiere de lo publicado en otros laboratorios en los que encuentran que la expresión de la survivina en los TCGT mixtos también parece perderse cuando ocurre la diferenciación somática.<sup>313,314</sup> Todo lo contrario ocurre en nuestra experiencia, pues la survivina se expresa constantemente en las diferentes células epiteliales y mesenquimales derivadas de las tres hojas blastodérmicas de los teratomas testiculares maduros.

En definitiva, muy probablemente la regulación de la survivina puede ser relevante en la tumorigénesis y potencial maligno que pueden experimentar las células germinales testiculares<sup>313</sup> Por ello, la inmunolocalización de la survivina en los diferentes tipos de TCGT tiene especial importancia en la evaluación histopatológica y evolutiva de estos tumores testiculares, y también en la investigación de los posibles mecanismos de apoptosis que pueden sufrir estos tumores germinales, dado que se ha sugerido que la survivina es un inhibidor de la apoptosis y está sobrepresada en muchas neoplasias humanas y, contrariamente, rara vez se detecta en tejidos normales.<sup>314</sup>

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** En el CIS y en todos los tipos histológicos de tumores de células germinales del testículo se ha encontrado una alta proliferación celular e intensa positividad nuclear de Ki 67. En el CIS, la expresión de de Ki 67 es heterogénea, observando también células y negativas.

**SEGUNDA.** El anticuerpo MAGE se expresa intensamente en la mayoría de núcleos de CIS, aunque algunos son negativos; también en estas células el inmunomarcaje puede ser positivo en el citoplasma, con un patrón granular y de membrana. En los seminomas, la expresión de MAGE citoplasmática es intensamente positiva, con un patrón granular perinuclear y de membrana, mientras que la tinción nuclear es muy irregular y poco frecuente. Los carcinomas embrionarios, los tumores de seno endodérmico y los derivados epiteliales mesenquimales y neuroblásticos de los teratomas carecen de inmunoexpresión de MAGE.

**TERCERA.** La proteína Aurora A se expresa intensamente en el núcleo de las células germinales del testículo normal y del testículo atrófico, y también es fuertemente positiva en los núcleos de las células de CIS. Sin embargo, la Aurora A exhibe una irregular inmunoexpresión nuclear y citoplásmica en los seminomas y en los componentes no seminomatosos de los tumores de células germinales testiculares mixtos.

**CUARTA.** La proteína Aurora B se expresa en los núcleos de las células germinales y de Sertoli normales, y también se evidencia una fuerte tinción nuclear y citoplásmica en las células del CIS y de los seminomas intratubulares. En los seminomas infiltrantes la inmunoexpresión nuclear es menor. La Aurora B es positiva en los núcleos de los carcinomas embrionarios, tumores de seno endodérmico y teratomas, aunque con variables intensidad.

**QUINTA.** La survivina se expresa en las células germinales de los testículos normales y atróficos, en las células de Sertoli, en las células del CIS y en los seminomas, siendo intenso el marcaje nuclear y más débil el intracitoplásmico. Los carcinomas embrionarios, tumores de seno endodérmico y los derivados neuroepiteliales de los teratomas inmaduros tienen variable expresión de survivina. Los derivados epiteliales y mesenquimales de los teratomas maduros e inmaduros y las células del sincitiotrofoblasto frecuentemente tienen intensa inmunoexpresión nuclear de survivina.

## **RESUMEN**

En el presente estudio de moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia de Aurora quinasas y de la survivina presentes en los diferentes tipos histológicos de TCGT, el principal criterio de selección de los 50 casos evaluados fue la presencia de parénquima testicular con CIS, con el fin de valorar la participación de estas moléculas en los mecanismos de proliferación y progresión del CIS y del cáncer testicular. También se ha valorado la expresión de Ki 67 como índice de proliferación, así como la expresión de la proteína MAGE, como nueva molécula a la que se ha atribuido un cierto valor diagnóstico en los TCGT.

En el testículo normal, hemos visto una alta expresión de Ki 67 en las espermatogonias. En el CIS, el inmunomarcaje nuclear de Ki 67 resulta más intenso, aunque es negativo en algunas células malignas intratubulares, y su expresión es variable en los TCGT mixtos.

Hemos comprobado que MAGE se expresa en el epitelio germinal normal, con un patrón fuertemente perinuclear y de membrana. En los tubos atróficos, la expresión de MAGE persiste en el citoplasma, pero se hace muy intensa en los núcleos de las espermatogonias. La expresión de MAGE en el CIS es muy heterogénea, y es mucho más constante e intensa en el seminoma intratubular, siendo siempre negativa en los componentes no-seminomatosos de los TCGT.

La Aurora A es muy positiva en los núcleos de las células germinales normales, pero es más intensa en las células de CIS; sin embargo, en los seminomas y en los TCGT no-seminomatosos existe una heterogeneidad de expresión de Aurora A. Así mismo, la expresión de Aurora B en las células de CIS es siempre constante en los núcleos y variable en el citoplasma. La Aurora B se identifica en los seminomas y en todos los patrones de carcinoma embrionario y de tumor de seno endodérmico, aunque con menor intensidad nuclear y de membrana en las áreas sólidas desdiferenciadas. Aurora B siempre está presente en los núcleos de las células mesenquimales y neuroepiteliales de los teratomas inmaduros.

La survivina, miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis, se expresa en los núcleos de las células germinales del testículo del hombre normal y del paciente infértil. En el CIS, su expresión nuclear es muy variable. En los TCGT infiltrantes, la survivina también se identifica en los núcleos y en la membrana citoplásmica, disminuyendo la intensidad de inmunomarcaje en las áreas sólidas del carcinoma embrionario. Todos estos datos permiten sugerir que la diferente expresión de las Aurora quinasas A y B y la survivina puede ser relevante en los mecanismos de regulación de la proliferación y apoptosis del CIS y de los diferentes tipos histológicos de los TCGT.

## **SUMMARY**

The present study is focused about Aurora Kinase family and Survivin, that have a principal action as regulatory molecules of the cellular cycle in normal and tumoral tissues, including the testicular germ cell tumors (TCGT). The main criteria of selection for all the 50 evaluated TGCT cases was the presence of testicular parenchyma with carcinoma *in situ*, CIS. The purpose of research is the evaluation of the possible participation of these regulatory molecules in the mechanisms of proliferation and progression of the CIS to an infiltrating testicular cancer. In addition, the expression of Ki 67 is evaluated as a proliferation index, marker, as well as, the expression of the MAGE protein, as a new molecule on which a diagnostic value has been attributed in TCGT.

In the normal testis, we have observed a high expression of Ki 67 in the spermatogonia. In the CIS, the nuclear immunostain of Ki 67 is more robust, although it is negative in some intratubular malignant cells, and its expression is variable in mixed TCGT.

We have demonstrated that MAGE is expressed in the normal germinal epithelium, with a strong perinuclear and membranous pattern. In the atrophic tubules, the expression of MAGE persists in the cytoplasm, but it is quite intense in the nuclei of the spermatogonia. The expression of MAGE in CIS is very heterogeneous, and it is more constant and intense in intratubular seminoma, being always negative in non-seminomatous components of the TCGT.

Aurora A is strongly positive in the normal germinal cell nucleus, but it is even more intense in CIS cells. However, in seminomas and non-seminomatose TCGT, Aurora A expression is heterogeneous. The expression of Aurora B in CIS cells is always constant in the nucleus and variable in the cytoplasm. Aurora B is identified in seminomas, in all the patterns of both embryonal carcinoma, and endodermic sinus tumor, although with a lesser nuclear and membrane intensity in the solid dedifferentiated areas. Furthermore, Aurora B is always present in the nucleus of mesenchymal and neuroepithelial cells of immature teratomas.

Survivin is a member of the apoptosis inhibitory proteins; it is expressed in the nuclei of germinal cells of the normal testis, as well as in infertile patients. In CIS, its nuclear expression is very variable. In the infiltrating TCGT, Survivin also is identified at the nucleus and the cytoplasmatic membrane, its immunolabeling intensity decreases in the solid areas of embryonal carcinoma. All these data suggest that the different expression of Aurora A and B kinases, and Suvirvin can be relevant to the regulatory mechanisms of the proliferation and apoptosis of CIS and the different histological types of TCGT.

## **REFERENCIAS**

1. **Aaronson SA.** Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146-1153.
2. **Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M, Gurevicius R, Stengrevics A.** Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 1994;59:33-38.
3. **Albrechtsen R, Nielsen MH, Skakkebaek NE, Wewer U.** Carcinoma in situ of the testis. Some ultrastructural characteristics of germ cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1982;90:301-303.
4. **Altman BL, Malament M.** Carcinoma of the testis following orchidopexy. *J Urol* 1967;97:498-504.
5. **American Joint Committee on Cancer, Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al (eds).** AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997.
6. **Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T, Keiding N, Skakkebaek NE.** High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 2000;15:366-372.
7. **Andersen MH, Thor SP.** Survivin-a universal tumor antigen. *Histol Histopathol* 2002;17:669-675.
8. **Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C.** The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 2000;91:61-68.
9. **Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P.** Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 1984 ;3:347-361.
10. **Andrews PW, Casper J, Damjanov I, Duggan-Keen M, Giwercman A, Hata J, von Keitz A, Looijenga LH, Millan JL, Oosterhuis JW, Pera M, Sawada M, Schmoll HJ, Skakkebaek NE, van Putten W, Stern P.** Comparative analysis of cell surface antigens expressed wt-0: by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int J Cancer* 1996;66:806-816.
11. **Atkin NB, Baker MC.** Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* 1982;2:1349.
12. **Atkin NB, Baker MC.** i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* 1983;10:199-204.
13. **Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-de Meyts E, Spagnoli GC, Chomez P, De Backer O, Jegou B, Samson M.** MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 2001;92:2778-2785.
14. **Bahrami A, Ro JY, Ayala AG.** An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1267-1280.
15. **Bailey D, Marks A, Stratis M, Baumal R.** Immunohistochemical staining of germ cell tumors and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to placental alkaline phosphatase and a monoclonal anti-seminoma antibody. *Mod Pathol* 1991; 4:167-171.
16. **Baou N, Bouras M, Droz JP, Benahmed M, Krantic S.** Evidence for a selective loss of somatostatin receptor subtype expression in male germ cell tumors of seminoma type. *Carcinogenesis* 2000;21:805-810.
17. **Bartkova J, Bartek J, Lukas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Lane DP.** p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991;49:196-202.
18. **Bartkova J, Falck J, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J.** Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. *Oncogene* 2001;20: 5897-5902.
19. **Bartkova J, Lukas C, Sorensen CS, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J.** Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2003;200:149-156.
20. **Bartkova J, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J.** D-type cyclins in adult human testis and testicular cancer: relation to cell type, proliferation, differentiation, and malignancy. *J Pathol* 1999;187:573-581.
21. **Bartkova J, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J.** Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS* 2003;111:252-266.
22. **Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J, Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J.** Lack of p19INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene* 2000;19: 4146-4150.
23. **Bartlett NL, Freiha FS, Torti FM.** Serum markers in germ cell neoplasms. *Hem Oncol Clin*

- North Am* 1991;5:1245-1260.
24. **Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Ulisse S, Rucci N, Jannini EA, Della Rocca C, Manicone A, Carani C, Spera G, Gnessi L.** Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2310-2319.
  25. **Beckstead JH.** Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1983; 7:341-349.
  26. **Bennet SH, Futrell JW, Roth JA, Hoye RC, Ketcham AS.** Prognostic significance of histologic host response of the larynx or hypolarynx. *Cancer* 1971;28:1255-1256.
  27. **Berdnik D, Knoblich JA.** Drosophila Aurora-A Is Required for Centrosome Maturation and Actin-Dependent Asymmetric Protein Localization during Mitosis. *Curr Biol* 2002;12:640-647.
  28. **Berney DM, Warren AY, Verma M, Kudahetti S, Robson JM, Williams MW, Neal DE, Powles T, Shamash J, Oliver RT.** Malignant germ cell tumours in the elderly: a histopathological review of 50 cases in men aged 60 years or over. *Mod Pathol* 2008;21:54-59.
  29. **Bhanot U, Heydrich R, Möller P, Hasel C.** Survivin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): steady increase along the developmental stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006;30:754-759.
  30. **Biermann K, Heukamp LC, Steger K, Zhou H, Franke FE, Sonnack V, Brehm R, Berg J, Bastian PJ, Muller SC, Wang-Eckert L, Buettner R.** Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4:359-367.
  31. **Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD.** A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998;17:3052-3065.
  32. **Bishop DT.** Candidate regions for testicular cancer susceptibility genes. The International Testicular Cancer. Linkage Consortium. *APMIS* 1998; 106:64-72.
  33. **Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, Jonasson J, Pietsch T, Jonas U, Schmoll HJ.** Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:301-306.
  34. **Bosl GJ, Motzer RJ.** Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 1997;337:242-253.
  35. **Bouras M, Tabone E, Bertholon J, Sommer P, Bouvier R, Droz JP, Benahmed M.** A novel SMAD4 gene mutation in seminoma germ cell tumors. *Cancer Res* 2000;60:922-928.
  36. **Brown LM, Potteen LM, Hoover RN.** Testicular cancer in the United States. Trend in incident and mortality. *Int J Epidemiol* 1986;15:164-170.
  37. **Buerger RA, von Wallenberg, Reis M, Engelman U.** Familial occurrence of testicular cancer. *Urol Int* 1987;42:158-160.
  38. **Buetow SA.** Epidemiology of testicular cancer. *Epidemiol Rev* 1995;17:433-449.
  39. **Burke AP, Mostofi FK.** Intratubular malignant germ cells in testicular biopsies: clinical course and identification by staining for placental alkaline phosphatase. *Mod Pathol* 1988;1:475-479.
  40. **Burke AP, Mostofi FK.** Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular germ cell and associated testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 1988;19:663-670.
  41. **Burke AP, Mostofi FK.** Spermatocytic Seminoma. A clinico-pathologic study of 79 cases. *J Urol Pathol* 1993;1:21-32.
  42. **Bussey KJ, Lawce HJ, Olson SB, Arthur DC, Kalousek DK, Krailo M, Giller R, Heifetz S, Womer R, Magenis RE.** Chromosome abnormalities of eighty-one pediatric germ cell tumors: sex-, age-, site-, and histopathology-related differences—a Children's Cancer Group study. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:134-146.
  43. **Cardillo MR, Petrangeli E, Ravenna L, Salvatori L, Di Silverio F.** Transforming growth factor-beta expression in human testicular neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:461-469.
  44. **Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP.** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9585-9590.
  45. **Chaganti RS, Rodriguez E, Mathew S.** Origin of adult male mediastinal germ-cell tumours. *Lancet* 1994;343:1130-1132.
  46. **Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, Mulhmann M del C, Martinez M, Gamboni M.** Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour



- development. *APMIS* 2003; 111:12-24.
47. **Chen SS, Chang PC, Cheng YW, Tang FM, Lin YS.** Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a trans-activation-independent p53 function. *EMBO J* 2002;21:4491-4499.
  48. **Chieffi P.** Molecular targets for the treatment of testicular germ cell tumors. *Mini Rev Med Chem* 2007;7:755-759.
  49. **Chieffi P, Troncone G, Caleo A, Libertini S, Linardopoulos S, Tramontano D, Portella G.** Aurora B expression in normal testis and seminomas. *J Endocrinol* 2004;181:263-270.
  50. **Cipriano SC, Chen L, Burns KH, Koff A, Matzuk MM.** Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 2001;15:985-996.
  51. **Colecchia M, Nistal M, González-Peramato P, Carmignani L, Salvioni R, Nicolai N, Regadera J.** Leydig cell tumor and hyperplasia: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 2007; 29:139-147.
  52. **Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC.** Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 2000;96:4002-4003.
  53. **Cortes D.** Cryptorchidism--aspects of pathogenesis, histology and treatment. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1998;196:1-54.
  54. **Cortes D, Thorup JM, Beck BL.** Quantitative histology of germ cells in the undescended testes of human fetuses, neonates and infants. *J Urol* 1995; 154:1188-1192.
  55. **Cortes D, Thorup JM, Graem N.** Bilateral prepubertal carcinoma in situ of the testis and ambiguous external genitalia. *J Urol* 1989;142:1065-1069.
  56. **Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J.** Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Horm Res* 2001;55:21-27.
  57. **Courjal F, Cuny M, Rodriguez C, Louason G, Speiser P, Katsaros D, Tanner MM, Zeillinger R, Theillet C.** DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. *Br J Cancer* 1996;74:1984-1989.
  58. **de Jong B, Oosterhuis JW, Castedo SM, Vos A, te Meerman GJ.** Pathogenesis of adult testicular germ cell tumors. A cytogenetic model. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;48:143-167.
  59. **Dehner LP.** Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Hum Pathol* 1983;14:493-511.
  60. **Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A.** TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117-129. Erratum in: *Nat Genet* 2001;29:351.
  61. **Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Bouvier R, Berger F, Bouras M, Droz JP, Benahmed M.** Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1099-1105.
  62. **Dieckman KP, Becker T, Jonas D, Bauer HW.** Inheritance and testicular cancer. *Oncology* 1987;44:367-377.
  63. **Dieckmann KP, Skakkebaek NE.** Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer* 1999;83:815-822.
  64. **Dixon FJ, Moore RA.** Tumors of the Male Sex Organs. Atlas of Tumor Pathology. First Series, Fascicles 31b and Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology, 1952.
  65. **Dong C, Hemminki K.** Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int J Cancer* 2001;92:144-150.
  66. **Drescher B, Lauke H, Hartmann M, Davidoff MS, Zumkeller W.** Immunohistochemical pattern of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF II and IGF binding proteins 1 to 6 in carcinoma in situ of the testis. *Mol Pathol* 1997;50:298-303.
  67. **Duchesne GM, Horwich A, Dearnaley DP, Nicholls J, Jay M Pechham MJ, Hendry AW.** Orchiectomy alone for stage I seminoma of the testis. *Cancer* 1990;65:1115-1118.
  68. **Dutertre S, Descamps S, Prigent C.** On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 2002;21:6175-6183.
  69. **El-Naggar AK, Ro JY, McLemore D, Ayala AG, Batsakis JG.** DNA ploidy in testicular germ cell neoplasm. Histogenetic and clinical implications. *Am J Surg Pathol* 1992;16:611-618.
  70. **Faulkner SW, Friedlander ML.** Microsatellite instability in germ cell tumors of the testis and ovary. *Gynecol Oncol* 2000;79:38-43.
  71. **Ferry JA, Ulbright TM, Young RH.** Anaplastic large cell lymphoma presenting in the testis. *J Urol Pathol* 1997;5:139-147.
  72. **Feuer EJ, Frey CM, Brawley OW.** After a treatment breakthrough. A comparison of trial and population-based data for advanced testicular cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:368-377.

73. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-10934.
74. Forman D, Oliver RT, Brett AR, Marsh SG, Moses JH, Bodmer JG, Chilvers CE, Pike MC. Familial testicular cancer. A report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer* 1992;65:255-262.
75. Franke FE, Pauls K, Metzger R, Danilov SM. Angiotensin I-converting enzyme and potential substrates in human testis and testicular tumours. *APMIS* 2003;111:234-244.
76. Friedman NB, Moore RA. Tumors of the testis. A report on 922 cases. *Milit Surg* 1946;99:573-593.
77. Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, Tsushima T, Ohmori H, Kayajima T, Take S, Nishiyama K, Yonezawa S, Akiba S, Akiyama S, Ohi Y. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* 1999;85:1323-1330.
78. Fung CY, Kalish LA, Brodsky GL, Richie JP, Garnick MB. Stage I nonseminomatous germ cell testicular tumor: prediction of Metastatic potential by primary histopathology. *J Clin Oncol* 1988;6:1467-1473.
79. Ganguly S, Murty VV, Samaniego F, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. Detection of preferential NRAS mutations in human male germ cell tumors by the polymerase chain reaction. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;1:228-232.
80. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 2004;71:2012-2021.
81. Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:139-147.
82. Geurts van Kessel A, Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Looijenga L, Oosterhuis JW, de Jong B. Molecular cytogenetics of human germ cell tumours: i(12p) and related chromosomal anomalies. *Eur Urol* 1993;23:23-29.
83. Giet R, McLean D, Descamps S, Lee MJ, Raff JW, Prigent C, Glover DM. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol* 2002;156:437-451.
84. Giet R, Uzbekov R, Cubizolles F, Le Guellec K, Prigent C. The *Xenopus laevis* Aurora-related Protein Kinase pEg2 Associates with and Phosphorylates the Kinesin-related Protein XI Eg5. *J Biol Chem* 1999;274:15005-15013.
85. Giwercman A, Andrews PW, Jorgensen N, Muller J, Graem N, Skakkebaek NE. Immunohistochemical expression of embryonal marker TRA-1-60 in carcinoma in situ and germ cell tumors of the testis. *Cancer* 1993; 72:1308-1314.
86. Giwercman A, Berthelsen JG, Muller J, von der Maase H, Skakkebaek NE. Screening for carcinoma in-situ of the testis. *Int J Androl* 1987;10:173-180.
87. Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Moller C, Skakkebaek NE. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with history of cryptorchidism. *J Urol* 1989;142:998-1001.
88. Giwercman A, Cantell L, Marks A. Placental-like alkaline phosphatase as a marker of carcinoma-in-situ of the testis. Comparison with monoclonal antibodies M2A and 43-9F. *APMIS* 1991;99:586-594.
89. Giwercman A, Grindsted J, Hansen B, Jensen OM, Skakkebaek NE. Testicular cancer risk in boys with maldescended testis. A cohort study. *J Urol* 1987; 138:1214-1216.
90. Giwercman A, Lindenberg S, Kimber SJ, Andersson T, Muller J, Skakkebaek NE. Monoclonal antibody 43-9F as a sensitive immunohisto-chemical marker of carcinoma in situ of human testis. *Cancer* 1990;65:1135-1142.
91. Giwercman A, Marks A, Bailey D, Baumal R, Skakkebaek NE. A monoclonal antibody as a marker for carcinoma in situ germ cells of the human adult testis. *APMIS* 1988;96:667-670.
92. Giwercman A, Muller J, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Semin Urol* 1988; 6:110-119.
93. Giwercman A, Skakkebaek NE. Carcinoma in-situ (gonocytoma in-situ) of the testis. In: Burger H, de Krestser D, eds. The Testis 2<sup>nd</sup> ed. New York. Raven Press, 1989; pp 475-491.
94. Gnessi L, Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Spera G, Wang C, Bondjers C, Karlsson L, Betsholtz C. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J Cell Biol* 2000;149:1019-1026.

95. Gobel U, Calaminus G, Engert J, Kaatsch P, Gadner H, Bokkerink JP, Hass RJ, Waag K, Blohm ME, Dippert S, Teske C, Harms D. Teratomas in infancy and childhood. *Med Pediatr Oncol* 1998;31:8-15.
96. Gobel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D. Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Ann Oncol* 2000;11:263-271.
97. Gondos B. Ultrastructure of developing and malignant germ cells. *Eur Urol* 1993;23:68-75.
98. Gondos B, Migilozzi JA. Intratubular germ cell neoplasia. *Sem Diagn Pathol* 1987;4:292-303.
99. Gonzalez-Crussi F. Extragonadal teratomas. Washington: *Armed Forces Institute of Pathology*, 1982.
100. Grady RW, Ross JH, Kay R. Patterns of Metastatic spread in prepubertal yolk sac tumor of the testis. *J Urol* 1995; 153:1259-1261.
101. Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1420-1426.
102. Grobholz R, Zentgraf H, Köhrmann KU, Bleyl U. Bax, Bcl-2, Fas and Fas-L antigen expression in human seminoma: correlation with the apoptotic index. *APMIS* 2002;110:724-732.
103. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-353.
104. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
105. Harms D, Janig U. Germ cell tumours of childhood. Report of 170 cases including 59 pure and partial yolk-sac tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986;409:223-239.
106. Hasle H, Jacobsen BB. Origin of male mediastinal germ-cell tumours. *Lancet* 1995;345:1046.
107. Hawkins EP, Finegold MJ, Hawkins HK, Krischer JP, Starling KA, Weinberg A. Nongerminomatous malignant germ cell tumor in children. A review of 89 cases from the Pediatric Oncology Group, 1971-1984. *Cancer* 1986;58:2579-2584.
108. Hawkins E, Heifetz SA, Giller R, Cushing B. The prepubertal testis (prenatal and postnatal): its relationship to intratubular germ cell neoplasia: a combined Pediatric Oncology Group and Children's Cancer Study Group. *Hum Pathol* 1997;28:404-410.
109. Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Moul JW. Immunohistochemical expression of monoclonal antibody 43-9F in testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 1998;21:283-288.
110. Heimdal K, Olsson H, Tretli S, Flodgren P, Borresen AL, Fossa SD. Familial testicular cancer in Norway and southern Sweden. *Br J Cancer* 1996;73:964-969.
111. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329-337.
112. Hermans BP, Sweeney CJ, Foster RS, Einhorn LE, Donohue JP. Risk of systemic metastasis in clinical stage I nonseminoma germ cell testis tumor managed by retroperitoneal lymph node dissection. *J Urol* 2000;163:1721-1724.
113. Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 2003;114:585-598.
114. Hoeltl W, Kosak D, Pont J, Hawel R, Machacek E, Schemper M, Honetz N, Marberger M. Testicular cancer: prognostic implications of vascular invasion. *J Urol* 1987;137:683-685.
115. Hoffner L, Deka R, Chakravarti A, Surti U. Cytogenetics and origins of pediatric germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;74:54-58.
116. Hoffner L, Shen-Schwarz S, Deka R, Chakravarti A, Surti U. Genetics and biology of human ovarian teratomas. III. Cytogenetics and origins of malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;62:58-65.
117. Hofmann MC, Millan JL. Developmental expression of alkaline phosphatase genes; reexpression in germ cell tumours and in vitro immortalized germ cells. *Eur Urol* 1993;23:38-45.
118. Holstein AF, Korner F. Light and electron microscopical analysis of cell types in human seminoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1974;363:97-112.
119. Holstein AF, Schutte B, Becker H, Hartmann

- M. Morphology of normal and malignant germ cells. *Int J Androl* 1987;10:1-18.
120. Honda R, Körner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 2003;14:3325-3341.
121. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* 2004;203:849-857.
122. Hori K, Uematsu K, Yasoshima H, Yamada A, Sakurai K, Ohya M. Testicular seminoma with human chorionic gonadotropin production. *Pathol Int* 1997;47:592-599.
123. Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 1997;8:293-299.
124. Hu LM, Phillipson J, Barsky SH. Intratubular germ cell neoplasia in infantile yolk sac tumor. Verification by tandem repeat sequence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:118-128.
125. Hustin J, Collette J, Franchimont P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *Int J Androl* 1987;10:29-35.
126. Izquierdo MA, Van der Valk P, Van Ark-Otte J, Rubio G, Germa-Lluch JR, Ueda R, Schepers RJ, Takahashi T, Giaccone G. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *J Pathol* 1995;177:253-258.
127. Jacobsen GK, Norgaard-Pedersen B. Placental alkaline phosphatase in testicular germ cell tumours and in carcinoma-in-situ of the testis. An immunohistochemical study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1984;92:323-329.
128. Javadpour N. The role of biologic tumor markers in testicular cancer. *Cancer* 1980;45:1755-1761.
129. Javadpour N, Young JD. Prognostic factors in nonseminomatous testicular cancer. *J Urol* 1986;135:497-499.
130. Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Anderse AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16:1012-1019.
131. Jorgensen N, Carlsen E, Neramo I, Punab M, Suominen J, Andersen AG, Andersson AM, Haugen TB, Horte A, Jensen TK, Magnus O, Petersen JH, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002;17:2199-2208.
132. Jorgensen N, Giwercman A, Muller J, Skakkebaek NE. Immunohistochemical markers of carcinoma in situ of the testis also expressed in normal infantile germ cells. *Histopathology* 1993;22:373-378.
133. Jorgensen N, Muller J, Giwercman A, Visfeldt J, Moller H, Skakkebaek NE. DNA content and expression of tumour markers in germ cells adjacent to germ cell tumours in childhood: probably a different origin for infantile and adolescent germ cell tumours. *J Pathol* 1995;176:269-278.
134. Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Muller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995;72:223-231.
135. Kaplan GW, Cromie WC, Kelalis PP, Silber I, Tank ES Jr. Prepubertal yolk sac testicular tumors - report of the testicular tumor registry. *J Urol* 1988;140:1109-1112.
136. Kay R. Prepubertal testicular tumor register. *J Urol* 1993;150:671-674.
137. Kimmins S, Crosio C, Kotaja N, Hirayama J, Monaco L, Höög C, van Duin M, Gossen JA, Sassone-Corsi P. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 2007; 21:726-739.
138. Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem* 1997;272:13766-13771.
139. Koide O, Iwai S, Baba K, Iri H. Identification of testicular atypical germ cells by an immunohistochemical technique for placental alkaline phosphatase. *Cancer* 1987;60:1325-1330.
140. Krag Jacobsen G, Barlebo H, Olsen J, Schultz HP, Starklint H, Søgaard H, Vaeth M. Testicular germ cell tumours in Denmark 1976-1980. Pathology of the 1058 consecutive cases. *Acta Radiol Oncol* 1984;23:239-247.
141. Kraggerud SM, Skotheim RI, Szymanska J, Eknaes M, Fossa SD, Stenwig AE, Peltomaki P,

- Lothe RA.** Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34:168-174.
142. **Kruslin B, Visnjic A, Cizmice A, Tomicic I, Kos M, Jukic S, Seiwerth S.** DNA ploidy analysis and cell proliferation in congenital sacrococcygeal teratomas. *Cancer* 2000;89:932-937.
143. **Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Jonassen J, Machtens S, Werner M, Jonas U.** Alterations of the p53 tumor suppressor gene in carcinoma in situ of the testis. *Cancer* 1996;78:1958-1966.
144. **Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC.** The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev* 1991;12:450-482.
145. **Lastowska M, Nacheva E, McGuckin A, Curtis A, Grace C, Pearson A, Bown N.** Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:162-169.
146. **Lau SK, Weiss LM, Chu PG.** Association of intratubular seminoma and intratubular embryonal carcinoma with invasive testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1045-1049.
147. **Leibovitch J, Foster RS, Ulbrigh TM, Donohue JP.** Adult primary pure teratomas of the testis. The Indiana experience. *Cancer* 1995;75:2244-2250.
148. **Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, Friess H, Sen S.** Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:991-997.
149. **Lifschitz-Mercer B, Elliott DJ, Issakov J, Leider-Trejo L, Schreiber L, Misonzhnik F, Eisenthal A, Maymon BB.** Localization of a specific germ cell marker, DAZL1, in testicular germ cell neoplasias. *Virchows Arch* 2002;440: 387-391.
150. **Logothetis CJ, Samuels ML, Trindade A, Grant C, Gomez L, Ayala A.** The prognostic significance of endodermal sinus tumor histology among patients treated for stage III nonseminomatous germ cell tumors of the testes. *Cancer* 1984;53:122-128.
151. **Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolfenbittel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW.** POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 2003;63:2244-2250.
152. **Looijenga LH, Verkerk AJ, Dekker MC, van Gorp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW.** Genomic imprinting in testicular germ cell tumours. *APMIS* 1998;106:187-197.
153. **Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, Schoenmakers EF, Rodriguez S, Jafer O, Clark J, van Kessel AG, Shipley J, van Gorp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW.** Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* 2003;111:161-171.
154. **Luo LY, Rajpert-De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP.** Expression of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1; KLK10) candidate tumour suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. *Br J Cancer* 2001;85:220-224.
155. **Lutzker SG.** P53 tumour suppressor gene and germ cell neoplasia. *APMIS* 1998;106:85-89.
156. **MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R.** Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 1997;15:1111-1114.
157. **Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, Kuschak TI, Paul JT, Littlewood TD, Mischak H, Stevens LM, Henderson DW, Mushinski JF.** Chromosomal and extrachromosomal instability of the cyclin D2 gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* 1999;1:241-252.
158. **Mancini RE, Narbaitz R, Lavieri JC.** Origin and development of the germinative epithelium and Sertoli cells in the human testis: cytological, cytochemical, and quantitative study. *Anat Rec* 1960;136:477-489.
159. **Manivel JC, Jessurun J, Wick MR, Dehner LP.** Placental alkaline phosphatase immunoreactivity in testicular germ-cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1987;11:21-29.
160. **Manivel JC, Niehans G, Wick MR, Dehner LP.** Intermediate trophoblast in germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1987;11:693-701.
161. **Manivel JC, Simonton S, Wold LE, Dehner LP.** Absence of intratubular germ cell neoplasia in testicular yolk sac tumors in children. A histochemical and immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:641-645.
162. **Mann JR.** Imprinting in the germ line. *Stem Cells* 2001;19:287-294.
163. **Marks LB, Anscher MMS, Shipley WS.** The role of radiation therapy in the treatment of

- testicular germ cell tumors. *Hem Oncol Clin North Am* 1991;5:1143-1172.
164. Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, Banerjee D, Baumal R. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999;80:569-578.
165. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-791.
166. Masson P. Etude sur le seminoma. *Rev Can Biol* 1946;5:361-387.
167. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360:313-319.
168. Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999;5:535-545.
169. Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 2002;62:2758-2760.
170. Mazumdar M, Bacik J, Tickoo SK, Dobrzynski D, Donadio A, Bajorin D, Motzer R, Reuter V, Bosl GJ J. Cluster analysis of p53 and Ki67 expression, apoptosis, alpha-fetoprotein, and human chorionic gonadotrophin indicates a favorable prognostic subgroup within the embryonal carcinoma germ cell tumor. *Clin Oncol* 2003;21:2679-2688.
171. Mehta MK, Garde SV, Sheth AR. Occurrence of FSH, inhibin and other hypothalamic-pituitary-intestinal hormones in normal fertility, subfertility, and tumors of human testes. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995;40:39-46.
172. Mendez R, Hake LE, Andresson T, Littlepage LE, Ruderman JV, Richter JD. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 2000;404:302-307.
173. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A, Domínguez-Cáceres A, Hernández-Cortés G, Pérez-Fernández E, Sánchez-Navarro I, Fresno Vara JA, Suárez A, Espinosa E, González-Barón M, Palacios J, Hardisson D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2008 (en revisión).
174. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetra-ploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *EMBO J* 2002;21:483-492.
175. Meyts ER, Jorgensen N, Muller J, Skakkebaek NE. Prolonged expression of the c-kit receptor in germ cells of intersex fetal testes. *J Pathol* 1996; 178:166-169.
176. Miething A. Multinucleated spermatocytes in the aging human testis: formation, morphology, and degenerative fate. *Andrologia* 1993;25:317-323.
177. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000;462:247-253.
178. Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, Akiyama S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995;55:1687-1690.
179. Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 2001;92:370-373.
180. Moller H. Decreased testicular cancer risk in men born in wartime. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1668-1669.
181. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, Sarrió D, Cassia R, García-Rostán G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matías-Guiu X, Esteller M, Palacios J. Abnormalities of the APC/ $\beta$ -catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981-7990.
182. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sanchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matias-Guiu X, Palacios J. Abnormalities in E- and P-cadherin and catenin ( $\beta$ -,  $\gamma$ -catenin, and p120<sup>cas</sup>) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003;199:471-478.
183. Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, Rodríguez-Perales S, Díaz-Uriarte R, Domínguez O, Hardisson D, Andújar M, Prat J, Matías-Guiu X, Cigudosa JC, Palacios J. Differential gene expression profile in endometrioid and non-endometrioid endometrial carcinoma: *SKT15* is frequently overexpressed and amplified in non-endometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697-5702.
184. Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7:2770-2775.
185. Mosselman S, Looijenga LH, Gillis AJ, van Rooijen MA, Kraft HJ, van Zoelen EJ, Oosterhuis JW. Aberrant platelet-derived growth

- factor alpha-receptor transcript as a diagnostic marker for early human germ cell tumors of the adult testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2884-2888.
186. Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* 1998;16:2617-2627.
  187. Mostofi FK, Price EB Jr. Tumor of the Male Genital System Atlas of Tumor of Tumor Pathology. 2nd Series, Fascicle 8. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1973.
  188. Mostofi FK, Sesterhenn IA. Histological typing of testis tumours. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer; 1998.
  189. Motzer RJ, Amsterdam A, Prieto V, Sheinfeld J, Murty VV, Mazumdar M, Bosl GJ, Chaganti RS, Reuter VE. Teratoma with malignant transformation. Diverse malignant histologies arising in men with germ cell. *J Urol* 1998; 159:133-138.
  190. Moul JW, Theune SM, Chang EH. Detection of RAS mutations in archival testicular germ cell tumors by polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:109-118.
  191. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114 :4359-4369.
  192. Mulder MP, Keijzer W, Verkerk A, Boot AJ, Prins ME, Splinter TA, Bos JL. Activated ras genes in human seminoma: evidence for tumor heterogeneity. *Oncogene* 1989;4:1345-1351.
  193. Muller J, Skakkebaek NE, Nielsen OH, Graem N. Cryptorchidism and testis cancer. Atypical infantile germ cells followed by carcinoma in situ and invasive carcinoma in adulthood. *Cancer* 1984;54:629-634.
  194. Murphy P, Johnson DH. Staging and prognostic factors in nonseminomatous testicular cancer. *Hem Oncol Clin North Am* 1991;5:1233-1243.
  195. Murty VV, Bosl GJ, Houldsworth J, Meyers M, Mukherjee AB, Reuter V, Chaganti RS. Allelic loss and somatic differentiation in human male germ cell tumors. *Oncogene* 1994;9:2245-2251.
  196. Murty VV, Houldsworth J, Baldwin S, Reuter V, Hunziker W, Besmer P, Bosl G, Chaganti RS. Allelic deletions in the long arm of chromosome 12 identify sites of candidate tumor suppressor genes in male germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11006-11010.
  197. Murty VV, Li RG, Mathew S, Reuter VE, Bronson DL, Bosl GJ, Chaganti RS. Replication error-type genetic instability at 1q42-43 in human male germ cell tumors. *Cancer Res* 1994;54:3983-3985.
  198. Nicholson PW, Harland SJ. Inheritance and testicular cancer. *Br J Cancer* 1995;71:421-426.
  199. Niehans GA, Manivel JC, Copland GT, Scheithauer BW, Wick MR. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 1988; 62:1113-1123.
  200. Nielsen H, Nielsen M, Skakkebaek NE. The fine structure of possible carcinoma-in-situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1974;82:235-248.
  201. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:21-32.
  202. Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Regadera J, Serrano A, Tarin V, De Miguel MP. Primary testicular lesions are associated with testicular germ cell tumors of adult men. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1260-1268.
  203. Nistal M, Paniagua R. Testicular and Epididymal Pathology. New York, Thiemes-Verlag. 1984.
  204. Nistal M, Paniagua R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG and Cheng L (eds.). Urologic Surgical Pathology. Chap 12. Mosby Elsevier Inc. St Louis, 2008:615-755.
  205. Nistal M, Regadera J, González-Peramato P. Biopsia Testicular e Infertilidad. Harcourt, 2001
  206. Nowak R, Grzybowska EA, Wilczynska A, Pykalo R, Siedlecki JA. Low expression of DNA polymerase beta in human testicular germ cell tumours--impact on foetal gonocytic origin theory. *Acta Oncol* 2002;41:188-191.
  207. Olie RA, Looijenga LH, Boerrigter L, Top B, Rodenhuis S, Langeveld A, Mulder MP, Oosterhuis JW. N- and KRAS mutations in primary testicular germ cell tumors: incidence and possible biological implications. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:110-116.
  208. O'Neill S, Ekstrom L, Lastowska M, Roberts P, Brodeur GM, Kees UR, Schwab M, Bown N. MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:87-90.
  209. Oosterhuis JW, Castedo SM, de Jong B, Cornelisse CJ, Dam A, Sleijfer DT, Schraffordt

- Koops H.** Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Lab Invest* 1989;60:14-21.
210. **Oosterhuis JW, Looijenga LH, van Echten J, de Jong B.** Chromosomal constitution and developmental potential of human germ cell tumors and teratomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:96-102.
211. **Palumbo C, van Roozendaal K, Gillis AJ, van Gorp RH, de Munnik H, Oosterhuis JW, van Zoelen EJ, Looijenga LH.** Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* 2002;196:467-477.
212. **Parker C, Milosevic M, Panzarella T, Banerjee D, Jewett M, Catton C, Tew-George B, Gospodarowicz M, Warde P.** The prognosis significance of the tumor infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *Eur J Cancer* 2002;38:2014-2019.
213. **Parkinson MC, Harland SJ, Harnden P, Sandison A.** The role of the histopathologist in the management of testicular germ cell tumour in adults. *Histopathology* 2001;38:183-194.
214. **Patel SR, Kvols LK, Richardson RI.** Familial testicular cancer. Report of six cases and review of the literature. *Mayo Clin Proc* 1990;65:804-808.
215. **Pedersen KV, Boisen P, Zetterlund CG.** Experience of screening for carcinoma in-situ of the testis among young men with surgical corrected maldescended testes. *Int J Androl* 1987;10:181-185.
216. **Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A.** Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53:5853-5855.
217. **Peng HQ, Bailey D, Bronson D, Goss PE, Hogg D.** Loss of heterozygosity of tumor suppressor genes in testis cancer. *Cancer Res* 1995;55:2871-2875.
218. **Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, Jewett M, Buchanan J, Goss PE.** Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 1993;53:3574-3578.
219. **Quenby SM, Gazvani MR, Brazeau C, Neilson J, Lewis-Jones DI, Vince G.** Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:737-741.
220. **Rajpert-de Meyts E.** Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 2006;12:303-323.
221. **Rajpert-de Meyts E, Hoei-Hansen CE.** From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1120:168-180.
222. **Rajpert-de Meyts E, Jacobsen GK, Bartkova J, Aubry F, Samson M, Bartek J, Skakkebaek NE.** The immunohistochemical expression pattern of Chk2, p53, p19INK4d, MAGE-A4 and other selected antigens provides new evidence for the premeiotic origin of spermatocytic seminoma. *Histopathology* 2003;42:217-226.
223. **Rajpert-de Meyts E, Jorgensen N, Brondum-Nielsen K, Muller J, Skakkebaek NE.** Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS* 1998;106:198-206.
224. **Rajpert-de Meyts E, Kvist M, Skakkebaek NE.** Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 1996;428:133-139.
225. **Rajpert-de Meyts E, Lauke H, Skakkebaek NE.** In vitro survival of human neoplastic germ cells. *Adv Exp Med Biol* 1998;444:59-66.
226. **Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE.** Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 1994;17:85-92.
227. **Rapley EA, Crockford GP, Teare D, Biggs P, Seal S, Barfoot R, Edwards S, Hamoudi R, Heimdal K, Fossa SD, Tucker K, Donald J, Collins F, Friedlander M, Hogg D, Goss P, Heidenreich A, Ormiston W, Daly PA, Forman D, Oliver TD, Leahy M, Huddart R, Cooper CS, Bodmer JG, Easton DF, Stratton MR, Bishop DT.** Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nat Genet* 2000;24:197-200.
228. **Regadera J, Blaquez MJ, Gonzalez-Peramato P, Nistal M, Miller JC, Tirado OM and Notario V.** PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. *Int J Oncol* 2006; 28:595-604.
229. **Renedo DE, Trainer TD.** Intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) with p53 and PCNA expression and adjacent mature teratoma in an infant testis. An immunohistochemical and



- morphologic study with a review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1994;18:947-952.
230. **Reuter VE.** Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* 2005;18:S51-S60.
231. **Richie JP.** Surgical aspects in the treatment of patients with testicular cancer. *Hem Oncol Clin North Am* 1991;5:1127-1142.
232. **Ridanpaa M, Lothe RA, Onfelt A, Fossa S, Borresen AL, Husgafvel-Pursiainen K.** K-ras oncogene codon 12 point mutations in testicular cancer. *Environ Health Perspect* 1993;101: 185S-187S.
233. **Robinson LL, Gaskell TL, Saunders PT, Anderson RA.** Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol Hum Reprod* 2001;7:845-852.
234. **Rodriguez PN, Hafez GR, Messing EM.** Nonseminomatous germ cell tumor of the testicle. Does extensive staging of the primary tumor predict the likelihood of Metastatic disease? *J Urol* 1986; 136:604-608.
235. **Rodriguez E, Mathew S, Reuter V, Ison DH, Bosl GJ, Chaganti RS.** Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ cell tumors. *Cancer Res* 1992;52:2285-2291.
236. **Roelofs H, Manes T, Janszen T, Millan JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** Heterogeneity in alkaline phosphatase isozyme expression in human testicular germ cell tumours: An enzyme-/immunohistochemical and molecular analysis. *J Pathol* 1999;189:236-244.
237. **Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, Zafarana G, van Oorschot M, van Gorp RJ, Gillis AJ, Stoop H, Beverloo B, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH.** Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. *Am J Pathol* 2000;157:1155-1166.
238. **Rorth M, Rajpert-De Meyts E, Andersson L, Dieckmann KP, Fossa SD, Grigor KM, Hendry WF, Herr HW, Looijenga LH, Oosterhuis JW, Skakkebaek NE.** Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol* 2000;205:166S-186S.
239. **Rosenberg C, Van Gorp RJ, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 2000;19: 5858-5862.
240. **Rossi P, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R.** Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:910-914.
241. **Rutgers JL, Scully RE.** The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization) A clinicopathologic study of 43 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1991;10:126-144.
242. **Sagalowsky AI, Ewalt DH, Molberg K, Peters PC.** Predictors of residual mass histology after chemotherapy for advanced testis cancer. *Urology* 1990; 35:537-542.
243. **Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Shimomura K, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T, Yamagishi H.** Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer* 2001;84:824-831.
244. **Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF.** Reviews of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenetics and genes in testicular tumors. *J Urol* 1996;155:1531-1556.
245. **Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A.** Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* 1996;17:403-408.
246. **Sano K.** Pathogenesis of intracranial germ cell tumors reconsidered. *J Neurosurg* 1999;90:258-264.
247. **Sarrió D, Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Banón-Rodríguez I, Hernández-Cortés G, Hardisson D, Palacios J.** Expression of cadherins and catenins correlates with distinct histologic types of ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2006;37:1042-1049.
248. **Sarrió D, Pérez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suárez A, Cano A, Martín-Pérez J, Gamallo C, Palacios J.** Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from pre-invasive to metastatic lesions. *Oncogene* 2004;23: 3272-3283.
249. **Sasaki A, Yoshinaga K.** Immunoreactive somatostatin in male reproductive system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:996-999.
250. **Satie AP, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Henno S, Olivo L, Jacobsen GK, Rioux-Leclercq N, Jegou B, Samson M.** The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Lab Invest* 2002;82:775-780.
251. **Scheiber K, Ackerman D, Studer UE.** Bilateral testicular germ cell tumors. A report of 20 cases. *J*

- Urol* 1987;138:73-76.
252. Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M, Ackermann R. Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2001;61:4214-4221.
  253. Schneider DT, Calaminus G, Reinhard H, Gutjahr P, Kremens B, Harms D, Gobel U. Primary mediastinal germ cell tumors in children and adolescents: results of the German cooperative protocols MAKEI 83/86, 89, and 96. *J Clin Oncol* 2000;18:832-839.
  254. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Hu J, Olson T, Lauer S, Gobel U, Perlman EJ. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res* 2001;61:7268-7276.
  255. Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990;9:2185-2195.
  256. Scully RE. Neoplasia associated with anomalous sexual development and abnormal sex chromosomes. *Ped Adolesc Endocrinol* 1981;8:203-217.
  257. Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak B. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1320-1329.
  258. Serrano A, González-Peramato P, Regadera J, Nistal M. Carcinoma in situ Testicular. Actualidad en Urología IPSEN. Acción Médica
  259. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-524.
  260. Shuin T, Misaki H, Kubota Y, Yao M, Hosaka M. Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis. *Cancer* 1994; 73:1721-1727.
  261. Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996;384:470-474.
  262. Silver SA, Wiley JM, Perlman EJ. DNA ploidy analysis of pediatric germ cell tumors. *Mod Pathol* 1994;7:951-956.
  263. Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 1972;2:516-517.
  264. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987; 10:19-28.
  265. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Muller J. Carcinoma in situ of un-descended testis. *Urol Clin North Am* 1982;9:377-385.
  266. Skotheim RI, Monni O, Mousses S, Fossa SD, Kallioniemi OP, Lothe RA, Kallioniemi A. New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res* 2002;62:2359-2364.
  267. Slowikowska-Hilczek J, Walczak-Jedrzejowska R, Kula K. Immuno-histochemical diagnosis of preinvasive germ cell cancer of the testis. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:67-72.
  268. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomaki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and non-seminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 2002;21:3909-3916.
  269. Soini Y, Paakko P. Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. *Hum Pathol* 1996;27:1221-1226.
  270. Stamp IM, Barlebo H, Rix M, Jacobsen GK. Intratubular germ cell neoplasia in an infantile testis with immature teratoma. *Histopathology* 1993;22:69-72.
  271. Stoop H, van Gurp R, de Krijger R, Geurts van Kessel A, Köberle B, Oosterhuis W, Looijenga L. Reactivity of germ cell maturation stage-specific markers in spermatocytic seminoma: diagnostic and etiological implications. *Lab Invest* 2001;81:919-928.
  272. Stoter G, Bols GJ, Droz JP. Prognostic factors in metastatic germ cell tumors. *Progr Clin Biol Res* 1990;357:313-319.
  273. Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A, Slamon DJ. Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 1991;51:1811-1816.
  274. Strohmeyer T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular

- tissue. *J Urol* 1995;153:511-515.
275. **Strohmeyer T, Reissmann P, Cordon-Cardo C, Hartmann M, Ackermann R, Slamon D.** Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6662-6666.
276. **Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Meloni AM, Parrington JM, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Sandberg AA, Geurts van Kessel A.** Overrepresentation of chromosome 12p sequences and karyotypic evolution in i(12p)-negative testicular germ-cell tumors revealed by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;70:85-93.
277. **Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Weghuis DE, Roque L, Forus A, Stellink F, Siepman A, van de Kaa C, Soares J, Geurts van Kessel A.** Amplification of chromosome subregion 12p11.2-p12.1 in a metastasis of an i(12p)-negative seminoma: relationship to tumor progression? *Cancer Genet Cytogenet* 1994;78:145-152.
278. **Suijkerbuijk RF, van de Veen AY, van Echten J, Buys CH, de Jong B, Oosterhuis JW, Warburton DA, Cassiman JJ, Schonk D, Geurts van Kessel A.** Demonstration of the genuine iso-12p character of the standard marker chromosome of testicular germ cell tumors and identification of further chromosome 12 aberrations by comparative in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1991;48:269-273.
279. **Summersgill B, Osin P, Lu YJ, Huddart R, Shipley J.** Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* 2001;85:213-220.
280. **Surti U, Hoffner L, Chakravarti A, Ferrell RE.** Genetics and biology of human ovarian teratomas. I. Cytogenetic analysis and mechanism of origin. *Am J Hum Genet* 1990;47:635-643.
281. **Suzuki K, Tokue A, Kamiakito T, Kuriki K, Saito K, Tanaka A.** Predominant expression of fibroblast growth factor (FGF) 8, FGF4, and FGF receptor 1 in nonseminomatous and highly proliferative components of testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 2001;439:616-621.
282. **Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM.** Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-3968.
283. **Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, Yamada Y, Sumizawa T, Aikou T.** Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:288-295.
284. **Talerman A.** Endodermal sinus (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults. Comparison of prospective and retrospective studies. *Cancer* 1980;46:1213-1217.
285. **Talerman A, Haije WG, Baggerman L.** Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites. Correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP. *Cancer* 1980;46:380-385.
286. **Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H, Okano Y.** Centrosomal Kinase AIK1 Is Over-expressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1999;59:2041-2044.
287. **Tanner MM, Grenman S, Koul A, Johannsson O, Meltzer P, Pejovic T, Borg A, Isola JJ.** Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1833-1839.
288. **Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J.** Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin Cancer Res* 1995;112:1455-1461.
289. **Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuukasjärvi T, Collins C, Kowbel D, Guan XY, Trent J, Gray JW, Meltzer P, Kallioniemi OP.** Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:3441-3445.
290. **Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB.** Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:1677-1683.
291. **Tickoo SK, Hutchinson B, Bacik J, Mazumdar M, Motzer RJ, Bajorin DF, Bosl GJ, Reuter VE.** Testicular seminoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 cases with special reference to seminoma with atypical features. *Int J Surg Pathol* 2002;10:23-32.
292. **Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE.** Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;7:282-286.
293. **Torres A, Casanova JF, Nistal M, Regadera J.**

- Quantification of immuno-competent cells in testicular germ cell tumours. *Histopathology* 1997;30: 23-30.
294. True LD, Otis CN, Delprado W, Scully RE, Rosai J. Spermatocytic Seminoma of testis with sarcomatous transformation. A report of five cases. *Am J Surg Pathol* 1988;12:75-82.
295. Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 2003;5:242-248.
296. Ulbright TM. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Modern Pathology* 2005;18:S61-S79.
297. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the testis adnexa, spermatic cord, and scrotum. Atlas of Tumor Pathology. Third Series, fascicle 25. Washington DC. Armed Forces of Pathology. 1999.
298. Ulbright TM, Srigley JR. Dermoid cyst of the testis. A study of five postpuberal, included a pilomatrixoma-like variant with evidence supporting classification from mature testicular teratoma. *Am J Surg Pathol* 2001;25:788-793.
299. Usuki K, Saras J, Waltenberger J, Miyazono K, Pierce G, Thomason A, Heldin CH. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1311-1316.
300. van Casteren NJ, Boellaard WP, Dohle GR, Weber RF, Kuizinga MC, Stoop H, Oosterhuis WJ, Looijenga LH. Heterogeneous distribution of ITGCNU in an adult testis: consequences for biopsy-based diagnosis. *Int J Surg Pathol* 2008;16:21-24.
301. van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:684-693.
302. van Echten J, Oosterhuis JW, Looijenga LH, van de Pol M, Wiersema J, te Meerman GJ, Schaffordt Koops H, Sleijfer DT, de Jong B. No recurrent structural abnormalities apart from i(12p) in primary germ cell tumors of the adult testis. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:133-144.
303. van Echten J, van Gurp RJ, Stoepker M, Looijenga LH, de Jong J, Oosterhuis W. Cytogenetic evidence that carcinoma in situ is the precursor lesion for invasive testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;85:133-137.
304. Vasankari T, Kujala U, Taimela S, Torma A, Irjala K, Huhtaniemi I. Effects of a long acting somatostatin analog on pituitary, adrenal, and testicular function during rest and acute exercise: unexpected stimulation of testosterone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3298-3303.
305. Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago CT, Califano D, Monaco C, Mineo A, Santelli G, Manzo G, Botti G, Chiappetta G, Persico MG. Neo-vascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene* 1996;13:577-587.
306. von der Maase H, Rorth M, Walbom-Jorgensen S, Sørensen BL, Christophersen IS, Hald T, Jacobsen GK, Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Br Med J* 1986;293:1398-1401.
307. von Hochstetter AR, Hedinger CE. The differential diagnosis of testicular germ cell tumors in theory and practice. A critical analysis of two major systems of classification and review of 389 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982;396:247-277.
308. Vorechovsky I, Mazanec K. Is isochromosome i(12p) present in gonadal precancerous tissue? *Neoplasma* 1989; 36:697-700.
309. Vos A, Oosterhuis JW, de Jong B, Buist J, Schraffordt Koops H. Cytogenetics of carcinoma in situ of the testis. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;46:75-81.
310. Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 2000;19:4906-4916.
311. Warner SL, Bearss DJ, Han H, Von Hoff DD. Targeting Aurora-2 Kinase in Cancer. *Mol Cancer Ther* 2003;2:589-595.
312. Watanabe T, Imoto I, Katahira T, Hirasawa A, Ishiwata I, Emi M, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:1114-1122.
313. Weikert S, Schrader M, Christoph F, Schulze W, Krause H, Müller M, Miller K. Quantification of survivin mRNA in testes of infertile patients and in testicular germ cell tumours: high levels of expression associated with normal spermatogenesis. *Int J Androl* 2005;28:224-229.

314. **Weikert S, Schrader M, Krause H, Schulze W, Müller M, Miller K.** The inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes. *Cancer Lett* 2005;223:331-337.
315. **Wilkins BS, Williamson JM, O'Brien CJ.** Morphological and immunohisto-logical study of testicular lymphomas. *Histopathology* 1989;15:147-156.
316. **Willis RA.** Pathology of Tumors, 4th ed. Appleton-Century-Criftd, New York, 1967.
317. **Wittekind C, Wichmann T, Von Kleist S.** Immunohistological localization of AFP and HCG in uniformly classified testis tumors. *Anticancer Res* 1983;3: 327-330.
318. **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J.** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
319. **Wunderle VM, Critcher R, Ashworth A, Goodfellow PN.** Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* 1996;36:354-358.
320. **Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A.** Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341-3351.
321. **Young JL Jr, Miller RW.** Incidence of malignant tumors in U. S. children. *J Pediatr* 1975;86:254-258.
322. **Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Olsson PG, Elstrodt F, Stoop H, Millan JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** Coamplification of DAD-R, SOX5, and EK11 in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifes-tation. *Cancer Res* 2002;62:1822-1831.
323. **Zagars GK, Babaian RJ.** The role of radiation in stage II testicular seminoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13:163-170.
324. **Zeeman AM, Stoop H, Boter M, Gillis AJ, Castrillon DH, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab Invest* 2002; 82:159-166.
325. **Zhao X, Wei YQ, Kariya Y.** Accumulation of gamma/delta T cell in human dysgerminoma and seminoma. Roles in autologous tumor killing and granulomas formation. *Immunol Invest* 1995;24:607-618.
326. **Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S.** Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998;20:189-193.