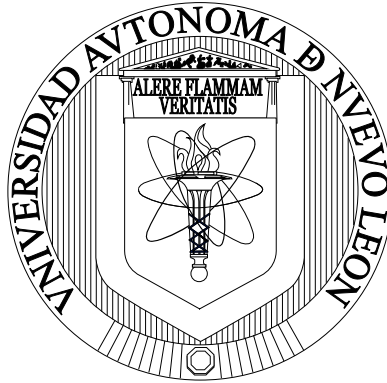


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**Angiogénesis y Células Inmunocompetentes
en los Tumores de Células Germinales del Testículo: su
relación con nuevas moléculas reguladoras de la
progresión tumoral**

TESIS DOCTORAL

Jesús Ancer Rodríguez

Monterrey, México. Junio de 2006

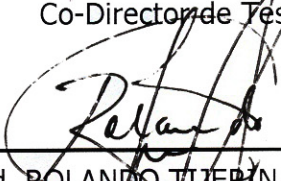
**"ANGIOGENESIS Y CELULAS INMUNOCOMPETENTES EN LOS
TUMORES DE CELULAS GERMINALES DEL TESTICULO: SU
RELACION CON NUEVAS MOLECULAS REGULADORAS DE LA
PROGRESION TUMORAL"**

Aprobación de la Tesis:

DR. med. FRANCISCO JAVIER REGADERA GONZALEZ
Director de Tesis



DR. med. GUADALUPE GALLEGOS AVILA
Co-Director de Tesis



DR. med. ROLANDO TIJERINA MENCHACA
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. med. SANTOS GUZMAN LOPEZ
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. med. JOSE CARLOS JAIME PEREZ
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado



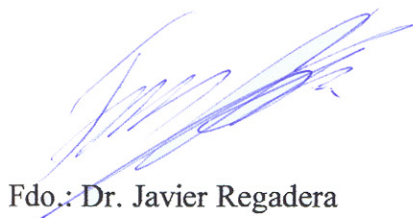
JAVIER FRANCISCO REGADERA GONÁLEZ, MÉDICO PATÓLOGO Y PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGIA HUMANA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

y

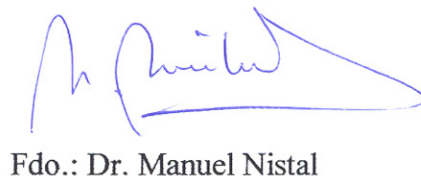
MANUEL NISTAL MARTÍN DE SERRANO, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA GENERAL DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID Y JEFE DE SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID

CERTIFICAN QUE: D. **Jesús Áncer Rodríguez**, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Nuevo León de Monterrey, México y Médico Especialista en Anatomía Patológica ha realizado bajo nuestra supervisión y dirección el trabajo de investigación: "**Angiogénesis y Células Inmunocompetentes en los Tumores de Células Germinales del Testículo: su relación con nuevas moléculas reguladoras de la progresión tumoral**", estudio que consideramos completamente satisfactorio para ser presentado, leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid.

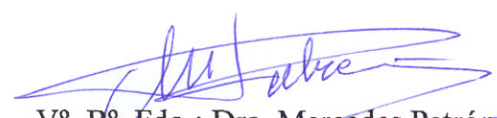
Lo que firmamos en Madrid a 20 de diciembre de 2005



Fdo.: Dr. Javier Regadera



Fdo.: Dr. Manuel Nistal



Vº. Bº. Fdo.: Dra. Mercedes Patrón
Tutora del Programa de Doctorado de Anatomía Patológica

DEDICATORIA:

A toda **mi familia**,
su cariño ha sido el impulso de mi vida

A mis colegas y amigos
de la **Facultad de Medicina y Hospital Universitario**

A mi Alma Mater,
la **Universidad Autónoma de Nuevo León**

AGRADECIMIENTOS:

al Prof. **Javier Regadera**, por su experta dirección de esta Tesis Doctoral y por su sincera amistad conmigo e incondicional colaboración y apoyo a la Universidad Autónoma de Nuevo León

al Prof. **Manuel Nistal**, por sus valiosos consejos científicos y su magisterio en Patología Testicular

al Prof. **Javier Larrauri**, por su importante apoyo, como Director del Departamento de Anatomía Patológica de la UAM, para la realización del Programa de Doctorado en Patología y por sus muy adecuados comentarios científicos de los Proyectos de Diplomas de Estudios Avanzados

a las Dras. **Mercedes Patrón y Teresa Sotelo**, por sus valiosas aportaciones durante la defensa de los Diplomas de Estudios Avanzados

al Prof. **Félix Contreras**, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, quien facilitó, con entusiasmo y generosidad, las rotaciones de varios Patólogos de la UNAN en su departamento

a todos los **Patólogos del Hospital La Paz**, que tanto han contribuido en aspectos concretos de la formación de los patólogos regiomontanos de la UANL

a la Dra. **Guadalupe Gallegos Ávila**, Profesora del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la UANL, quien con su entusiasmo, consolidó el Convenio UAM-UANL

a la Dra. **Inmaculada Santos**, quien ha asesorado con esmero la documentación científica del presente estudio

a la Dra. **Magdalena Arizpe Suárez** mi agradecimiento por su colaboración en la realización de esta tesis

a la Profa. **Luisa María Botella** (CSIC) y al Dr. **Francisco Sanz-Rodríguez** (UAM), por sus imprescindibles comentarios científicos de los métodos moleculares

a Doña. **Carmen Sánchez-Palomo**, por la brillante realización de los métodos histológicos e inmunohistoquímicos

INTRODUCCIÓN	1
MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS TCGTs.	6
ANGIOGÉNESIS	9
ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER	10
MARCADORES VASCULARES Y FACTORES DE CRECIMIENTO VASCULAR	12
MICROVASCULARIZACIÓN DEL TESTÍCULO HUMANO	16
ESTUDIOS DE LA ANGIOGÉNESIS EN TUMORES TESTICULARES	18
MECANISMOS REGULADORES DE LA CARCINOGENESIS: ONCOGENES Y PROTOONCOGENES	21
<i>Proteína de Progresión Carcinogénica del Hámster (PCPH)</i>	24
<i>Proteína de la familia "Krüppel like", KLF6</i>	25
<i>Gen PTOV-1 sobreexpresado en tumores</i>	26
FINALIDADES DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
MATERIAL	31
MÉTODOS	31
<i>Métodos Histológicos Generales</i>	31
<i>Métodos Inmunohistoquímicos</i>	32
Método de Estreptavidina-Biotina Peroxidasa	33
Método de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina	34
<i>Métodos de Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal</i>	34
<i>Estudios Histométricos</i>	35
<i>Métodos de Inmunolectroforesis ("Western blot")</i>	36
<i>Métodos de Transcripción revertida y PCR (RT-PCR)</i>	37
RESULTADOS	38
1. Los microvasos se distribuyen heterogéneamente en los TCGTs.	39
2. Angiogénesis también se produce en relación a las áreas de necrosis y tejido de granulación en los TCGT.	41

3. La angiogénesis está relacionada con la infiltración de linfocitos en los TCGTs	41
4. Los receptores VEGF se expresan en las células tumorales y endoteliales de los TCGTs.	42
5. El contenido en microvasos está reducido en TCGTs con respecto al testículo humano normal.	42
6. Alteración de Expresión de Moléculas candidatas oncogénicas en el CIS	44
7. Mecanismos de infiltración de las células del CIS y su transformación en un TCGTs.	48
ICONOGRAFÍA MICROSCÓPICA	50
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	88
RESUMEN	90
SUMMARY	92
REFERENCIAS	94

INTRODUCCIÓN

Los tumores testiculares malignos son clasificados, de acuerdo a su origen, en tumores de células germinales y tumores de células no germinales que incluyen a los tumores de cordones sexuales y tumores del estroma gonadal. El 90-95% de las neoplasias testiculares derivan de gonocitos o células germinales primordiales (PGC) y, por ello, se denominan en conjunto como “Tumores de Células Germinales Testiculares (TCGTs.). Estos tumores se suelen diagnosticar generalmente en etapas tempranas ya que derivan de una neoplasia intratubular indiferenciada, denominada más comúnmente como carcinoma *in situ* testicular (CIS). Los tumores de células germinales se subdividen en seminomas y no-seminomatosos. Los seminomas son los tumores más frecuentes y reflejan su propia diferenciación gonadal. Dentro de los TCGTs. no-seminomatosos se encuentran: el carcinoma embrionario, el tumor del seno endodérmico y el teratoma. El carcinoma embrionario corresponde a la transformación de las células germinales en una célula neoplásica casi totipotencial; a partir de él se originan otros tipos de tumores menos diferenciados, como son los tumores del seno endodérmico (“yolk sac tumors”) y el coriocarcinoma. El teratoma se considera como una dediferenciación hacia las capas embrionarias germinales, lo que explica que contenga una diversa variedad de tejidos embrionarios. En niños y adolescentes, los tumores testiculares más frecuentes son los teratomas y los tumores del seno endodérmico, mientras que en adultos jóvenes es el seminoma, existiendo otros grupos de neoplasias extremadamente raras.¹⁵¹ En muchos casos se pueden encontrar TCGTs. mixtos con dos o más combinaciones de tipos histológicos. Los tumores no germinales que se han identificado en el testículo son los tumores de células de Leydig, los tumores de células de Sertoli y los tumores de la granulosa desarrollados en el testículo, así como sus combinaciones.^{146,151}

La incidencia del cáncer testicular está aumentando significativamente en los últimos años, con una incidencia mayor que otros tumores urológicos; y aunque no existe una única explicación para este incremento, se ha abogado como hipótesis muy plausible el efecto deletéreo que el aumento de los estrógenos produce sobre el testículo humano, no solo como causa de subfertilidad, sino también como factor de riesgo de tumores. En efecto, en las últimas décadas se ha establecido que los estrógenos endógenos y también los estrógenos ambientales son responsables de alteraciones en la proliferación de las células germinales y pueden estar involucrados en el desarrollo del cáncer testicular.¹⁶⁷ La demostración de la dependencia estrogénica del seminoma testicular humano, el tumor más frecuente en varones jóvenes, puede tener una importante repercusión terapéutica; en este sentido es

necesario valorar en el futuro en los pacientes con TCGTs. la participación del receptor de estrógenos beta (ER-beta) como favorecedor de la apoptosis y / o su posible acción inhibitoria de la proliferación celular.¹⁶⁷

En hombres infértiles con análisis anormal del seminograma, la incidencia de cáncer testicular es 20 veces superior por ello en estos casos de infertilidad deben de explorarse siempre la posibilidad del desarrollo de un cáncer testicular.¹⁵² La reducción de la fertilidad previa al desarrollo de TCGTs. es un hallazgo frecuente en estos pacientes, lo cual es un dato que hace verosímil la hipótesis de la disgenesia testicular, en la cual existe un evidente riesgo genético de desarrollar un cáncer testicular. En este sentido, se ha encontrado que el más del 8% de los pacientes con subfertilidad tienen deleciones constitucionales del par del brazo largo del cromosoma Y (Yq11), referido en la región AZF; sin embargo, poblacionalmente el porcentaje anterior es bajo, por lo que, por sí solo, las microdeleciones en la región AZF del brazo largo del cromosoma Y no contribuyen mayoritariamente al desarrollo de TCGTs.¹²² En pacientes con intersexualidad frecuentemente se producen alteraciones de la maduración de las células germinales que pueden transformarse y progresar hacia un CIS.⁴⁵ Por ello, en estos casos de infertilidad es necesario utilizar técnicas exploratoria más precisas en el diagnostico de un TCGT; entre éstas ha demostrado un alta sensibilidad diagnostica la sonografía, la cual permite establecer una evidente correlación entre la naturaleza maligna de los tumores testiculares y las masas no palpables, esta correlación es sobretodo más significativa entre las dimensiones de la lesión y su naturaleza maligna.²⁹

El tamaño del tumor testicular en el momento de su diagnostico durante la exploración clínica es en los últimos años menor (actualmente las cifras medias más admitidas corresponden a tumores de 2.5 cm de diámetro); es más, el 23% de los casos debutan con tumores menores de 2 cm por lo que en ellos es posible realizar una cirugía conservadora del testículo que consiste en una tumorectomía y una conservación del resto de la pulpa testicular. Esta aproximación terapéutica es de singular importancia sobretodo en los pacientes jóvenes en los que se consigue, no solo un excelente pronóstico, sino también una mejor calidad de vida, con mejora de los aspectos psicológicos, de morbilidad y de fertilidad natural.^{16,126}

Aunque el riesgo de desarrollo de un tumor sincrónico o metacrónico en el testículo contralateral en un paciente con TCGT es muy variable, y la numerosa experiencia clínica acumulada recomienda la realización sistemática de la biopsia en el testículo contralateral en pacientes diagnosticados de cáncer testicular unilateral.⁷² En concreto, aproximadamente el 2.5-5% de los pacientes con TCGTs. pueden desarrollar una enfermedad tumoral testicular bilateral, siendo necesario la castración, lo que determinará, no solo la infertilidad permanente, sino también alteraciones hormonales y psicológicas de alta morbilidad para el paciente. En estos casos con cáncer testicular bilateral, recientemente se ha detectado mutaciones del codón 816 del gen c-KIT, por lo que el descubrimiento de estas mutaciones en un tumor testicular unilateral exigen valorar la existencia de un TCGT en el testículo contralateral.¹²⁰ Pero además, los pacientes con seminoma deben ser seguidos clínicamente durante bastantes años ya que existe el riesgo de que aparezca otro segundo tumor primario en el testículo o en otra localización.¹⁴⁴

En definitiva, el cáncer testicular es la primera enfermedad oncológica del hombre joven y su mayor incidencia ocurre durante la tercera-cuarta década de la vida. La incidencia de los TCGTs. es de aproximadamente el 2% de todos los tumores del varón, pero esta incidencia está aumentando lentamente, aunque sin aún explicación plausible, en los varones jóvenes de raza caucásica,^{2,135} por ello los TCGTs. son en la actualidad motivo de numerosas investigaciones frontera en relación con su histogénesis y factores pronósticos y con el descubrimiento de moléculas diana con significado terapéutico.

El tratamiento quirúrgico, radioterápico y /o quimioterápico de los TCGTs. depende del estadio clínico del tumor y, en menor medida, del tipo histológico presente en cada TCGT. En los seminomas en estadio clínico I, el tratamiento de elección es la orquiectomía. En los TCGTs. no-seminomatosos estadio B1, algunas publicaciones han constatado que la extirpación de los ganglios linfáticos es curativa, y, además, las tasas de curación no dependen del tamaño ni del número de ganglios extirpados; por lo que estos estudios proponen limitar el uso de tratamientos quimioterápicos coadyuvantes cuando se realiza una cirugía oncológica curativa.^{13,14} Pero en los TCGTs. no-seminomatosos, además del seguimiento clínico y de diagnóstico por imagen, es necesario realizar pruebas serológicas periódica de marcadores tumorales. El incremento sérico de alfa-fetoproteína es muy frecuente en TCGTs. no-seminomatosos, y la detección de más de 100 U/l indica un peor

pronóstico, lo cual implica realizar seguimientos de los pacientes por lo menos durante 10 años.⁵⁴

La existencia de infiltración linfovascular dentro del tumor debe ser mencionado por el patólogo, ya que este dato es de singular importancia en el pronóstico del tumor. En un estudio de TCGTs. estadio I-IIA con predominio de carcinoma embrionario se ha valorado la evolución dependiendo de la infiltración linfovascular, no obstante se han obtenido buenos resultados con quimioterapia, dado que frecuentemente las metástasis en ganglios retroperitoneales eran primariamente o se habían diferenciado a teratomas (16%).¹⁹⁰ Con todo, las metástasis en los ganglios linfáticos regionales sí tienen significado predictivo de la evolución postoperatoria de los TCGTs.no-seminomatosos en el estadio patológico B1, habiéndose encontrado que no hay diferencias significativas en la incidencia de recidivas cuando en las metástasis ganglionares retroperitoneales se comparan los carcinomas embrionarios (69%), con los TCGTs. combinados que contienen áreas de carcinoma embrionario (63%) y con los TCGTs. combinados que carecen de la diferenciación de carcinoma embrionario (73%). Todos estos datos sugieren que la valoración del patrón histológico en los ganglios retroperitoneales no tiene un valor pronóstico predicativo en pacientes con TCGTs. no-seminomatosos en estadio B1.¹³ Además, en pacientes con niveles séricos normales de marcadores tumorales y TCGTs. estadio clínico I a IIA se ha encontrado una baja probabilidad de progresión sistémica y una alta incidencia de teratoma retroperitoneal del 22%, lo que aboga por una actitud terapéutica poco agresiva, la cual sólo debería incluir una intervención quirúrgica primaria testicular junto con linfadenectomía retroperitoneal.¹⁹¹

El diseño de protocolos terapéuticos modernos en los TCGTs. no-seminomatosos ha permitido en la última década una alta supervivencia y calidad de vida de los pacientes, sobretodo cuando se combinan adecuadamente la evaluación de marcadores séricos tumorales, las modernas técnicas de imagen, la aplicación de pautas adecuadas de quimioterapia con cisplatino y la aplicación de técnicas de cirugía oncológica realizadas meticulosamente.¹⁰¹ La fertilidad de los pacientes con cáncer testicular disminuye hasta en un 30% después del tratamiento, siendo la radioterapia la causa del mayor efecto deletéreo sobre la fertilidad.⁹⁷ Por ello, en pacientes jóvenes con TCGTs. unilaterales y con estadio clínico bajo se recomienda realizar antes el tratamiento quimioterápico que el radioterápico

de la región pélvica y bolsas escrotales, de este modo se preserva mejor las funciones endocrinas testiculares y ofertar la posibilidad de una futura paternidad natural.⁹⁸

Es bien conocido que el tratamiento con quimioterapia consigue en la actualidad unos excelentes resultados en la evolución de los pacientes con TCGTs.; no obstante, los casos de peor pronóstico frecuentemente se asocian a una resistencia a la quimioterapia. Por ello, recientemente se ha publicado que el tratamiento con poliquimioterapia que incluye paclitaxel, ifosfamida y cisplatino, seguido de cirugía, puede ser efectivo en aquellos pacientes con TCGTs. que no sean candidatos para recibir como primer tratamiento una cirugía oncológica.¹⁶⁹ Además, el tratamiento radioterápico en los pacientes con seminoma en estadio I aumenta significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares, por ello recientemente se está investigando su sustitución por tratamiento quimioterápico coadyuvante, en concreto, una única inyección de carboplatino consigue unos resultados terapéuticos que no son inferiores a la radioterapia convencional en los seminomas testiculares estadio I.¹⁴²

En definitiva, los nuevos protocolos de quimioterapia y sobretodo el uso correcto de cisplatino permite curaciones de TCGTs. incluso en estadios avanzados de enfermedad. Recientemente se ha confirmado que esta hipersensibilidad de los TCGTs. a la quimioterapia se relaciona con la robusta actividad transcripcional del p53, aunque otros muchos productos génicos también podrían facilitar positivamente la acción curativa de estos fármacos.¹⁰⁶ Esta alta sensibilidad al tratamiento quimioterápico con cisplatino determina que los TCGTs. constituyan un excelente modelo de evaluación de mecanismos de quimioresistencia, sin embargo, no se conocen bien las bases genéticas de esta quimioresistencia que ocurre en una pequeña proporción de pacientes con TCGTs., habiéndose descrito *in vitro* una sobreexpresión cromosómica que se solapa con la región cromosómica 16q22-23. Estos datos de resistencia a fármacos pueden abrir nuevas dianas terapéuticas en los TCGTs.²¹⁸

MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS TCGTs.

Existe un número relativamente escaso de marcadores clínicos e histopatológicos de valor acreditado para establecer el diagnóstico y el pronóstico de los tumores de células germinales del testículo (TCGTs) (para una revisión ver: Miskish, 2000¹³⁰). Muy recientemente, se ha descrito un nuevo marcador inmunohistoquímico denominado OCT3/4,

con el que se obtienen excelentes resultados en la identificación de TCGTs. y su positividad permite identificar fehacientemente las células malignas de CIS, seminomas y carcinomas embrionarios.⁴⁹ De hecho, el OCT4 es un marcador específico y altamente sensitivo de las células del CIS, incluso mejor que la fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina placentaria, la cual en algunos casos muestra variabilidad del grado de intensidad de la tinción y en otros se expresa con una alta tinción de fondo, lo que dificulta su evolución.¹⁰⁴ El OCT4 es también un marcador inmunohistoquímico altamente sensible para identificar germinomas intracraneales primarios.⁸⁶ En las metástasis de los TCGTs. el empleo del marcador OCT4 también es muy útil para detectar estos tumores, lo cual es de singular importancia en la aplicación de un tratamiento correcto y en el establecimiento de criterios pronósticos en estos pacientes.³⁷

La molécula OCT4 es un factor de transcripción que se expresa en células madre y células germinales embrionarias normales y participa en la regulación y mantenimiento de la pluripotencialidad. Por ello, OCT4 se detecta en los TCGTs., dado su potencial pluripotente de diferenciación en seminomas y carcinomas embrionarios, obteniéndose en estos últimos carcinomas un mejor marcaje cuando se compara con el encontrado con el anticuerpo anti-CD30.¹⁰³ Sin embargo, el OCT4 no es el único marcador de CIS, ya que recientemente se ha publicado que la proteína AP-2gamma es también un nuevo y excelente marcador de las células del CIS y de los TCGTs.⁹¹ Pero es más, los seminomas testiculares (y también en los carcinomas de mama) presentan un patrón común de expresión de DAZL, además, los seminomas expresan VASA, un marcador específico de las células germinales de las que derivan los seminomas y que está ausente de las células del carcinoma de mama.⁶⁷ En definitiva, en el desarrollo de las células del CIS es relevante la aparición de una anormal expresión de OCT3/4 y de la denominada proteína Y del testículo; esta expresión alterada de OCT3/4 permite distinguir el CIS de las alteraciones congénitas de la maduración testicular.⁴⁵

Los hallazgos histopatológicos de valor pronóstico más aceptados en los TCGTs. son el volumen tumoral, la invasión venosa y linfática, la presencia de carcinoma embrionario y la ausencia de estructuras de tumor del seno endodérmico y coriocarcinoma;^{73,153} sin embargo, estos parámetros pronósticos siguen siendo aún controvertidos;⁴ y por ello, es necesario realizar nuevos estudios patológicos y moleculares en los TCGTs.

Se sabe que la actividad proliferativa de los tumores malignos se relaciona con su agresividad y progresión, esto es con su capacidad de infiltración local y metástasis a distancia. Por ello, se ha cuantificado microdensitométricamente la cantidad de DNA en los TCGTs.⁴³ y se ha evaluado el ciclo celular de estas células neoplásicas, utilizando métodos inmunohistoquímicos para la detección de antígenos relacionados con la actividad proliferativa, entre los que se encuentran el PCNA (PC-10) y Ki67 (MIB-1).^{4,59} Con todo, la correlación del ciclo celular con el potencial metastásico y el pronóstico de los diferentes tipos histológicos de TCGTs. es todavía motivo de discusión.

Es bien conocido que los TCGTs. y sobretudo los seminomas desencadenan una importante respuesta de células inmunocompetentes que invaden el tumor. Por ello, la evolución inmunohistoquímica de marcadores de distintas poblaciones de estas células inmunocompetentes pudiera tener un cierto significado pronóstico. Ya en el año 1988, Düe et al⁵⁹ en Berlín, realizaron un estudio en 20 casos de seminomas, correlacionando el índice proliferativo de Ki-67 con la cantidad de células inmunocompetentes detectadas por anticuerpos monoclonales, cuantificando para ello el número de linfocitos en 5 campos microscópicos de cada tumor. Los autores concluyeron que el grado de proliferación del tumor no se correlacionó con la presencia de células inmunocompetentes en el tejido. En el laboratorio donde se ha realizado la presente Tesis, previamente también se realizó un estudio de cuantificación de células inmunocompetentes en TCGTs., con el fin de averiguar si los infiltrados linfoides participaban en la modulación en el crecimiento del tumor. Para ello, Torres et al¹⁹⁶ en 1997 realizaron un estudio en 43 especímenes de tumores testiculares, en los cuales se evaluaron, por técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de linfocitos T, CD3 y CD4, macrófagos y linfocitos B así como células plasmáticas kappa y lambda, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. En este estudio se encontró un significativo mayor número de linfocitos en los seminomas que en los TCGTs. no-seminomatosos. Esta evidente migración de células inmunocompetentes en los TCGTs. cabe la posibilidad que esté relacionada con la liberación de citosina en el área de infiltración tumoral, lo cual pudiera activar la migración de las células NK ("Natural Killer") y favorecer, de este modo, la regresión tumoral. Con todo, estos estudios cuantitativos de los infiltrados de células linfoides en los diferentes tipos de TCGTs. no han demostrado aún un claro valor pronóstico.¹⁹⁶ Por ello, es necesario establecer nuevos parámetros pronósticos y evaluar nuevos mecanismos de regulación tumoral -incluida la actividad angiogénica y la

expresión de moléculas con capacidad oncogénica- en los pacientes con TCGTs., con el fin de predecir mejor su evolución clínica.

ANGIOGÉNESIS

Las angiogénesis es un fenómeno biológico que se observa principalmente durante el desarrollo embrionario y fetal. Después del nacimiento la angiogénesis ocurre normalmente también en la fase proliferativa de tejidos en crecimiento cíclico, por ejemplo en la ovulación y en la menstruación. Se han descrito dos patrones de formación de vasos sanguíneos: la angiogénesis clásica o madura y la angiogénesis de tipo embrionario, y ambos tipos de angiogénesis pueden estar presentes durante los procesos de carcinogénesis y de progresión tumoral.

La angiogénesis de tipo embrionario puede observarse ya durante el desarrollo embrionario temprano y persiste durante el desarrollo fetal y postnatal. El proceso angiogénico se produce a partir de proliferaciones del endotelio desde los vasos preexistentes, y ulterior formación de nuevos vasos sanguíneos de tipo capilar. De hecho, el patrón embrionario característico del proceso de implantación embrionaria y la formación de la placenta, pero también de los tejidos neoplásicos, se caracteriza por la formación "de novo", de vasos sanguíneos a partir del sincitiotrofoblasto en la placenta y de células mesenquimales inmaduras dentro del tumor.

En la angiogénesis clásica o de tejido maduro, la formación de vasos se inicia en el tejido normal o durante el crecimiento de una neoplasia. En esta angiogénesis madura, la proliferación de células endoteliales va seguida de una pérdida de la continuidad de la membrana basal: las células endoteliales activan la degradación proteolítica de la membrana basal y de la matriz extracelular que la rodea; posteriormente se produce proliferación de células endoteliales y su migración hacia el estímulo angiogénico y, posteriormente, se consigue la reorganización de los túbulos vasculares y la remodelación de los tejidos adyacentes al foco angiogénico, lo cual es determinante en el crecimiento tumoral y en los mecanismos de infiltración tumoral.^{27,70,127,162,178} En definitiva, los procesos de angiogénesis conllevan la formación de cordones celulares sólidos con posterior formación de lumen, desarrollo de pericitos y de la membrana basal, proceso que culmina con la fusión de los nuevos vasos y el inicio de la circulación sanguínea a través de los vasos neoformados.¹³³

ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER

Se sabe que una amplia variedad de neoplasias malignas son capaces de inducir angiogénesis. Se ha sugerido que la angiogénesis puede facilitar la expansión de la neoplasia primaria y aumentar su tasa de proliferación.⁷¹ De otra parte, los tumores en una etapa prevascular pueden permanecer por mucho tiempo como lesiones asintomáticas y restringidas por la limitación del oxígeno y la difusión de los nutrientes, en contraste con los tumores vascularizados en los que la expansión local y la metástasis están presentes.¹¹⁸

El proceso de angiogénesis tumoral se inicia con la activación de células endoteliales, seguida por la degradación proteolítica de la membrana basal y la matriz extracelular que las rodea; después una proliferación celular del endotelio, con la migración de estas células por estímulos angiogénicos y la reorganización de túbulos vasculares neoformados con la subsiguiente remodelación, para producir anastomosis y tener un flujo sanguíneo.²⁷ Esta neovascularización asociada al tumor puede también relacionarse con la secreción de sustancias angiogénicas por las células que infiltran el tumor (células cebadas, macrófagos y linfocitos), culminando este proceso con la migración de células endoteliales, las cuales finalmente formarán un nuevo vaso.²⁷ En este sentido, en un modelo experimental de fibrosarcomas, estudios *in vitro* con células endoteliales a las cuales les agrega macrófagos enriquecidos encontraron, en relación con el tumor, una mayor proliferación de células endoteliales asociadas a macrófagos, y demostraron que los macrófagos presentan una actividad citolítica sobre células tumorales *in vitro*.¹⁴⁸

Los primeros estudios experimentales modernos de angiogénesis y cáncer fueron llevados a cabo en 1968 por el grupo de Folkman et al,⁶⁹ quienes implantaron células tumorales en ratones y observaron que el aumento de la masa tumoral era precedido de un incremento en los capilares que convergen al tumor. Estos hallazgos permitieron sugerir que la angiogénesis podía facilitar la expansión de la neoplasia primaria e incrementar su rango de proliferación. Ya en 1980, Chodak et al³⁹ señalaban una similitud de los procesos angiogénicos en modelos animales -en los que se producía diferentes tipos de tumores sólidos de varios órganos-, con la disposición de la microvasculatura en casos de carcinoma de vejiga y mama humanos.

Está completamente establecido que, al menos en los diferentes tipos de epitelios, los tumores malignos se originan a partir de lesiones preneoplásicas y que existe un largo

intervalo de tiempo entre la aparición del carcinoma *in situ* y el desarrollo del carcinoma invasivo. Es muy probable que la actividad angiogénica asociada a neoplasias, presente ya desde los primeros estadios de transformación tumoral, incluido el carcinoma *in situ*, pueda jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad neoplásica, es más, el grado de angiogénesis pudiera ser evaluado como un factor pronóstico en los tumores malignos infiltrantes. Pero, de otra parte, es necesario considerar que la neovascularización, como es bien conocido, no es un proceso exclusivo de las neoplasias, antes bien, aparece ya desde el estado de hiperplasia previa al desarrollo de una enfermedad neoplasia, quedando claro que un número importante de factores angiogénicos están involucrados en este proceso. De otra parte, se ha encontrado inducción de angiogénesis en enfermedades no relacionadas con los tumores.^{69,71}

El papel de la angiogénesis como factor predictivo de metástasis en los tumores malignos humanos fue descrito desde 1986 por Srivastava et al.,¹⁸⁹ quienes estudiaron 38 pacientes con melanomas primarios de piel, encontrando que la vascularización era menor en los tumores en fase de crecimiento más lento, si se comparaba con los melanomas de crecimiento más rápido. En este sentido se sabe que los melanoma cutáneos son tumores muy agresivos que frecuentemente metastatizan en los ganglios linfáticos, pero también se extienden por invasión vascular; por ello, los trabajos de Srivastava et al.¹⁸⁹ en 1986 y Herlyn et al.⁸⁸ en 1987 coincidieron al señalar que la neovascularización inducida por los melanoma cutáneo -lo que puede generar una gran velocidad de flujo detectada por Doppler- es un importante factor pronóstico. Algunos autores difieren de esta opinión y concluyen que la densidad vascular de los melanomas cutáneos en las lesiones de grosor inferior a 1.25 mm puede no estar asociada a otros factores pronósticos, incluyendo el propio espesor del tumor.³⁰ Contrariamente, en los melanomas uveales, la angiogénesis, el grado de pigmentación y el índice mitótico sí tienen valor pronóstico.¹²⁹

En relación con la angiogénesis y el cáncer de mama, Bosari et al.²⁰ en 1992, estudiaron 120 casos tratados con mastectomía radical: 88 con ganglios axilares negativos y 32 con ganglios axilares positivos. Analizaron el tamaño del tumor, grado histológico, grado nuclear y el rango de mitosis; además, cuantificaron los microvasos de manera directa en 200 campos a 40X y encontraron una relación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el número mayor de vasos sanguíneos, la invasión a nódulos linfáticos y la recidiva de

los tumores malignos de mama. De este modo se corroboró que el grado de angiogénesis en las neoplasias malignas de mama constituye un factor pronóstico importante.²¹³

En el cáncer de cérvix uterino, la visualización por colposcopia de los vasos atípicos en la proximidad con el carcinoma generalmente se considera un dato sugestivo de microinvasión. En esta situación la biopsia dirigida evidencia la presencia de neovascularización e invasión en el 50% de los casos; en el otro 50% se ha encontrado carcinoma *in situ*. Por ello, la observación de vasos atípicos tiene implicaciones clínicas al justificar el tratamiento temprano de las lesiones malignas del cérvix uterino.¹⁸¹ Se han investigado otros aspectos de angiogénesis en carcinoma de cérvix con resultados no completamente concluyentes; por ejemplo, no se ha encontrado una relación directa entre la neovascularización del carcinoma de cérvix y la hipoxia tisular.²¹⁶

En el carcinoma de próstata, por último, se ha considerado que la angiogénesis es un factor pronóstico de significación biológica predictiva de la recidiva y de su agresividad, encontrándose una correlación estadísticamente significativa entre la incidencia de metástasis y la densidad de los microvasos del tumor.²¹²

En definitiva, en relación con la angiogénesis, en algunas neoplasias, incluyendo las neoplasias de la próstata²¹² y del cérvix,¹⁸¹ el grado de angiogénesis puede ser un indicador pronóstico importante que determine un comportamiento agresivo del tumor. De otra parte, en el carcinoma de mama se ha encontrado una correlación significativa entre el incremento de la microvascularización tumoral y el desarrollo de metástasis, locales o a distancia.²⁰ Sin embargo, en otros tipos tumorales como los melanomas cutáneos, la densidad vascular no está asociada con otro importante factor pronóstico, como es el grado de grosor del tumor en el dermis.³⁰ En general, se acepta que las neoplasias que no inducen una significativa reorganización de la microvascularización son probablemente limitados en su potencial biológico agresivo, y en estos casos, las células cancerígenas rara vez invaden los vasos sanguíneos.²⁷

MARCADORES VASCULARES Y FACTORES DE CRECIMIENTO VASCULAR

En los últimos años, se han caracterizado los antígenos CD que son propios de cada población de células endoteliales. Los antígenos CD se denominan también antígenos de diferenciación y son un conjunto de glucoproteínas que se expresan sobre la membrana de

las células sanguíneas y endoteliales. Su cantidad varía según el grado de maduración de las células o cuando se activan algunas de sus funciones. Hasta ahora se conocen aproximadamente 150 antígenos CD.¹⁹²

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos humanos son morfológica y funcionalmente muy heterogéneas, habiéndose localizado numerosas moléculas que se expresan en su citoplasma con intensidad variable y de modo variable distinto cuando se trata de células endoteliales de los grandes vasos arteriales y venosos, que cuando se estudian los endotelios de la microvasculatura. Los marcadores inmunohistoquímicos de células endoteliales sanguíneas más habitualmente usados y con los que se obtiene un mejor rendimiento de inmunomarcaje son: el factor VIII de la coagulación, el antígeno CD31 y el CD34 (explorado en el presente estudio), la endoglina y la lectina *Ulex Europaeus* I.⁴²

El antígeno CD34 fue detectado inicialmente en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea; este antígeno se observa también en el endotelio vascular, en las células dendríticas de la dermis superior y en el endoneuro; por lo que ha sido utilizado como marcador de las células endoteliales y su empleo es muy útil para la medición de la microvasculatura en algunos tumores.⁷⁸ El antígeno CD34 es una proteína transmembrana que se presenta en dos formas de proteína CD34, las cuales se expresan de forma alternativa: la región extracelular contiene una estructura rica en cisteína y está presente en ambas formas de CD34; la forma completa de CD34 tiene un dominio intracelular, el cual contiene locus para la fosforilación por la proteína C quinasa, fosforilación de serina y treonina por otras quinasas, y fosforilación de la tirosina. La forma truncada de CD34 no tiene la mayoría de los dominios intracelulares, incluyendo muchos de los sitios potenciales de fosforilación. La forma completa de CD34 contiene 385 aminoácidos y un peso de 116 kDa, mientras que la forma truncada contiene 323 aminoácidos y pesa aproximadamente 100 kDa. El gen CD34 humano contiene 8 exones y se encuentra en el cromosoma 1 q32, una región que contiene varios genes que codifican moléculas de adhesión a la matriz y moléculas de la cascada del complemento.¹⁴⁰

Los tumores malignos inducen la producción de factores de crecimiento tumoral y también factores de crecimiento vascular, los cuales son incrementados por la hipoxia tisular, la cual es muy frecuente en los tumores malignos de crecimiento rápido. Entre estos

factores de crecimiento se encuentran: el factor básico de crecimiento para fibroblastos (β FGF), el factor ácido de crecimiento para fibroblastos (α FGF), el factor de crecimiento tumoral alfa (α TGF), el factor de crecimiento tumoral beta (β TGF),¹²⁴ el factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento endotelial (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y también la insulina.^{60,84,198}

El VEGF es de suma importancia en la regulación de la angiogénesis. Este factor fue denominado en un principio bajo el término de factor de permeabilidad vascular (VPF), hasta que Ferrara et al.,⁶⁸ en 1989 lo denominaron como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por su aparente selectividad en las células diana endoteliales.^{44,68} Posteriormente se ha demostrado que el VEGF actúa también como mediador de la migración de las células endoteliales y monocitos⁴¹ y se ha involucrado en el mantenimiento de los mecanismo de regulación normal de los vasos sanguíneos.¹⁰⁰ El VEGF se ha identificado inmuohistoquímicamente en un número importante de lechos vasculares, incluyendo los de la piel, peritoneo, mesenterio y diafragma.¹⁹⁸

El VEGF es un importante regulador de la angiogénesis, y fue descubierto por su capacidad para incrementar la permeabilidad de los microvasos, principalmente de las vénulas postcapilares y de las venas de pequeño calibre, por las cuales circulan las macromoléculas; de hecho, el VEGF es uno de los factores mas potentes en la permeabilidad vascular, actuando en concentraciones menores de 1 nmol/L y con una potencia 50.000 veces mayor que la histamina. Este incremento de la permeabilidad inducido por el VEGF se produce rápidamente y no está bloqueada por los antihistamínicos ni por ninguna otra variedad de inhibidores de la inflamación, incluyendo los que bloquean la producción del factor inhibidor de la actividad plaquetaria. Este incremento en la permeabilidad de los microvasos se relaciona con el aumento de la actividad funcional de una organela recientemente descrita y denominada como “vacuola vesicular”, formada por múltiples vesículas y vacuolas presentes en el citoplasma de las células endoteliales de las vénulas y venas de pequeño calibre. Estas vesículas están unidas por membranas trilaminares, las cuales actúan como diafragma en las fenestraciones de la membrana plasmática, aunque los mecanismos íntimos que regulan estas vacuolas aún no se conocen.¹⁵⁰

La expresión de altos niveles de VEGF fue descrita en la placenta, en los tejidos fetales y en algunos tejidos adultos con alta actividad angiogénica en condiciones fisiológicas. De hecho, la sobreexpresión de VEGF se observa sistemáticamente en ciertos procesos cíclicos de neovascularización sometidos a control hormonal, por ejemplo: el ciclo menstrual, la formación del cuerpo lúteo, etc.⁶⁰ La sobreexpresión de VEGF es muy frecuente en un alto porcentaje de tumores malignos humanos y de animales, así como en las líneas de células transformadas, siendo mucho menor su expresión en tumores benignos y en algunos tumores malignos particulares como son el carcinoma lobulillar de mama y el carcinoma papilar de riñón.¹⁷⁹ Durante el crecimiento tumoral, la secreción del VEGF por las células tumorales se considera como un factor paracrino secretado por células no endoteliales, el cual modula la actividad del endotelio vascular adyacente.¹⁵¹ En cultivos de células tumorales, se ha descrito una sobreexpresión de VEGF asociada a una regulación también autocrina relacionada con la transformación del fenotipo tumoral.

La valoración de la actividad angiogénica de un determinado tumor, mediante la cuantificación de la densidad vascular, es un marcador tumoral de muy probable valor pronóstico. Una alta densidad vascular está asociada con un pobre pronóstico; por ello la exploración de la actividad de VEGF puede dar nueva información pronóstica ya que las células tumorales con una sobreexpresión de VEGF pueden sobrevivir a tratamientos más convencionales, dado que estas células que sobreexpresan VEGF tienen mayor agresividad y son las que pueden contribuir a que la formación de recidivas o las metástasis sean mayores a corto plazo.⁴⁶

El VEGF es un polipéptido miembro de la familia de los factores derivados de las plaquetas. El VEGF está formado por un dímero proteínico con uniones disulfuro de 34 a 43 kD, separado en bandas de 17 a 22 kD, sintetizado y secretado por una gran variedad de células normales y de células neoplásicas. Existen cuatro diferentes isoformas homodiméricas de VEGF llamadas VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206, las cuales son generadas por la expresión de diferentes exones del gen contenido en el cromosoma 6p2.3. Aparentemente estas isoformas tienen una idéntica actividad biológica, aunque se ha reconocido que las isoformas VEGF 165 y VEGF 121 son secretadas de forma soluble, lo cual indica su gran afinidad con los proteoglicanos de la superficie celular.¹²⁸

El VEGF actúa directa y selectivamente en los receptores tirosinquinasa de las células endoteliales (receptor “ECs Clase III: Flk-1, fms-like tyrosine Kinasa” y receptor “Flt-1, fetalliver kinase”; identificados en el ratón, además del receptor KDR identificado en células humanas. Todos estos receptores de VEGF se expresan predominantemente, pero no exclusivamente, en el endotelio vascular. Desde la identificación de la expresión de Flk-1 se ha considerado a esta molécula como un factor preeminente en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular, así como en el desarrollo de la angiogénesis en diferentes tumores.¹²⁸

Desde el punto de vista funcional se ha sugerido que el VRP es un VEGF relacionado con la síntesis proteínas de membrana, el VEGF-B estimula la mitosis en células endoteliales y el VEGF-C estimula la migración de células endoteliales. De hecho, la expresión del VEGF-C está asociado con el desarrollo de los vasos linfáticos y puede ser un factor de importancia en la regulación de la relación entre las células tumorales y las células del endotelio linfático,¹⁷² puesto que, se ha encontrado la asociación del VEGF-C a los receptores Flt-4 y KDR; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la afinidad de VEGF-B y VRP con algún receptor específico.¹⁷⁹ El receptor 3 de VEGF correspondiente a Flt-4 se ha identificado en el tejido de granulación, mostrando un gran potencial quimiotáctico para las células endoteliales, por lo que se le atribuye un papel importante en la angiogénesis de los tejidos maduros que sufre una reacción granulomatosa secundaria a procesos infecciosos, cicatriciales o en respuesta a un cuerpo extraño.²¹⁹

MICROVASCULARIZACIÓN DEL TESTÍCULO HUMANO

El testículo está irrigado por la arteria testicular que se origina habitualmente de la aorta abdominal. En el cordón espermático, la arteria testicular queda rodeada por las venas del plexo pampiniforme, lo que determina que la presión arterial en el parénquima testicular sea extraordinariamente baja. Al penetrar en el testículo, la arteria testicular (a veces existen varias ramas) se sitúa en la túnica vasculosa subalbugínea y se dirige por el borde libre del testículo hacia el polo superior, dando lugar a múltiples arterias que se sitúan en los septos interlobulillares. Estas arterias se dirigen hacia la rete testis -denominadas arterias centrípetas- y en su recorrido emiten ramas que cambian bruscamente de dirección, originando las denominadas arterias centrífugas; ambos tipos de arterias intratesticulares centrípetas y centrífugas, después de la pubertad, presentan un alto grado de espiralización.¹⁶¹ De las arterias centrípetas y centrífugas surgen arteriolas terminales, que

dan lugar a capilares que, siguiendo descripciones anatómicas clásicas, se ramifican alrededor o en el interior de los acúmulos de células de Leydig -denominados capilares intersticiales- y luego se continúan con segmentos capilares que rodean parcialmente a la túnica propia de los tubos seminíferos -denominados capilares peritubulares-.¹⁶¹ Los capilares testiculares se continúan por vénulas y venas que siguen los tabiques interlobulillares. La mayor parte de la porción central del parénquima testicular drena a venas centrípetas, que, siguiendo los tabiques interlobulillares, llegan al mediastino testicular -que está escasamente irrigado-; sin embargo, el tercio externo del parénquima drena por las denominadas venas centrífugas que se dirigen hacia la albugínea testicular.¹⁶¹

La microvasculatura de cualquier órgano, en general, está formada por arteriolas, metarteriolas, capilares y vénulas. Esta parte del sistema vascular es responsable del intercambio de gases, de sustancias nutricionales y de hormonas. Con respecto al testículo, el estudio de su microcirculación ha sido abordado en varios aspectos estructurales y funcionales, debido a la implicación de la microvasculatura en la regulación y modulación de mecanismos endocrinos y paracrinós, de singular importancia en la espermatogénesis y en la esteroidogénesis. Aunque las descripciones ultraestructurales de los capilares testiculares son escasas e incompletas; se sabe el endotelio de los capilares en el testículo humano no es fenestrado, mostrando un bajo grado de transcitosis; sin embargo, en algunos animales de laboratorio, el testículo contiene capilares intertubulares y peritubulares que son no fenestrados. Pero estudios recientemente han demostrado que los capilares de la lámina propia del túbulo seminífero humano normal son parcialmente fenestrados.⁶² En el testículo humano normal, estudios morfométricos, evaluando la microvasculatura identificada con CD34 y con alfa-actina muscular, han demostrado que el número de capilares es significativamente mayor que el de arteriolas y vénulas.⁴²

La organización espacial de la microvasculatura en ratones o ratas ha sido bien estudiada, encontrándose un patrón de crecimiento característico como "escalera de cuerdas".¹³³ Más recientemente, utilizando una reconstrucción tridimensional de cortes histológicos seriados, mediante un programa de computación, Ergün et al en 1994,⁶⁵ reconstruye y describe la organización segmentaria vascular del testículo humano, demostrando que los capilares conectan grupos de células de Leydig con los túbulos seminíferos.⁶⁵ Además, estudios con microscopía de fluorescencia han mostrado que los

capilares testiculares presentan un patrón peritubular e intersticial.⁶⁶ En esta forma de organización de la microvasculatura testicular, los capilares íntertubulares corren a lo largo de los túbulos seminíferos, localizándose en un espacio triangular que se encuentra entre tres túbulos adyacentes. Estos capilares íntertubulares se conectan con los capilares peritubulares, los cuales están rodeando a los túbulos seminíferos y parcialmente en contacto con la lámina propia de los mismos, pero sin penetrar en ella.⁶⁴

Les más, las arterias segmentarias -colaterales de pequeñas arterias centrípetas y sobretodo centrífugas testiculares-¹⁶¹ y los segmentos de tejido circunscrito por ellas están orientados en ángulos rectos con respecto al trayecto longitudinal de los túbulos seminíferos. De este modo, cada segmento de parénquima testicular contiene porciones de diferentes túbulos localizados en un mismo lobulillo testicular. Dentro de cada segmento, los capilares muestran una asociación estrecha con las células de Leydig y los túbulos seminíferos. Cada arteria segmentaria se ramifica generando capilares intersticiales, algunos de los cuales rodean los acúmulos de células de Leydig y otros pasan a través de ellas (capilares arteriales intercélulas de Leydig). Capilares emergentes de los acúmulos de células de Leydig penetran en la lámina propia de los túbulos seminíferos (capilares intramurales). En el tramo siguiente, los capilares ahora venosos quedan incluidos de nuevo en acúmulos de células de Leydig (capilares venosos inter-células de Leydig), antes de terminar en las vénulas intersticiales o en las venas de pequeño calibre intralobulares.⁶³

Esta peculiar disposición de la microvasculatura testicular pudiera tener un significado funcional, ya que es posible que los capilares que rodean a los acúmulos de células de Leydig y se proyectan entre ellas, interconectándose, dan lugar a la generación de un compartimiento vascular hormonal; mientras que, los capilares que se relacionan con los tubos seminíferos forman un compartimiento vascular relacionado con la espermatogénesis. En relación a la lámina propia del tubos seminífero, los capilares se dividen en eferentes y aferentes. En el hombre, la razón de esta capilarización de la lámina propia de los tubos seminíferos puede estar relacionada con su arquitectura multilaminar que determina y facilita un adecuado aporte sanguíneo.⁴⁸

ESTUDIOS DE LA ANGIOGÉNESIS EN TUMORES TESTICULARES

Los pacientes con cáncer testicular infiltrante consiguen llegar a curarse cuando el tumor se detecta precozmente y el estadio clínico no es avanzado (estadio A) y, además, se

establece un tratamiento adecuado que incluye, dependiendo del tipo histológico y del estadio, la orquiectomía, la linfadenectomía inguinal y retroperitoneal, la radioterapia y/o la quimioterapia.¹⁴¹ Se sabe que la supervivencia de los pacientes con TCGTs. no seminomatosos en estadio IA y tratados con orquiectomía es de más del 70% a los 5 años de seguimiento, por lo que hasta hace unas décadas se ha dado poca importancia a los factores pronósticos asociados a estos tumores. Sin embargo, en pacientes con factores de riesgo de comportamiento agresivo del tumor, es importante indicar el uso de quimioterapia posterior al tratamiento quirúrgico, con el fin de mejorar la supervivencia.¹⁵³ En su estudio Read et al.¹⁵³ (1992) valoraron la invasión de células tumorales en vasos linfáticos y venosos y la presencia de tumor del seno endodérmico, concluyendo que la supervivencia en los pacientes con más de tres factores de riesgo fue del 54.5% a los 5 años y, contrariamente, en los pacientes sin factores de riesgo la supervivencia fue del 74%.¹⁵³ Por todo ello, ya desde estos estadios tempranos, pero ya agresivos, de los tumores testiculares, la visualización de permeabilización de vasos sanguíneos y linfáticos intratumorales por células malignas y la inducción de angiogénesis prejuzga un peor pronóstico del paciente, debido al aumento de metástasis en las cadenas ganglionares regionales y de la diseminación a distancia del tumor.²⁷ Es más, las neoplasias que no inducen reorganización significativa de la microcirculación son probablemente limitadas en su potencial biológico y en ausencia de la neovascularización, las células cancerosas rara vez invaden los vasos sanguíneos.¹¹⁷ Todos estos datos clínico-patológicos sugieren un estudio completo de la angiogénesis, lo cual permitirá conocer los mecanismos de infiltración de los vasos en el tumor y su relación con la progresión maligna, datos de importante utilidad en las etapas incipientes de los TCGTs. Así, en un estudio de 65 pacientes con TCGTs.

Aunque existen series de estudios relacionados con la importancia de la angiogénesis en el crecimiento tumoral, son pocos los datos de la angiogénesis en tumores testiculares. En TCGTs. con estadio A, la cuantificación de la densidad de microvasos, mediante el antígeno de factor VIII, se sugiere que la angiogénesis es importante en la decisión de manejo con quimioterapia posterior al tratamiento quirúrgico del paciente.¹⁴¹ De otra parte, en 1990 Emil Nacov¹³³ realizó un amplio estudio de TCGTs. con el fin de determinar la importancia de la angiogénesis en el pronóstico de estos tumores malignos; para ello, realizó una cuantificación directa de los vasos sanguíneos y su distribución en el tejido tumoral, así como una descripción de las fases de la formación de nuevos vasos, concluyendo que la

formación de nuevos vasos puede considerarse como un factor de proliferación del tumor con valor pronóstico predictivo de enfermedad tumoral agresiva. Así mismo, Jones et al.¹⁰² en el año 2000 realizaron un estudio de 28 seminomas y 23 teratomas testiculares en estadio A, midiendo la densidad microvascular, la expresión de VEGF, así como la presencia de timidin-fosforilasa y la actividad de linfangiogénesis, mediante la evaluación inmunohistoquímica del RNAm para el VEGF-C ó VEGF-3 y concluyó que la angiogénesis y la linfangiogénesis pueden considerarse como un indicador pronóstico de los TCGTs. De hecho, el aumento de los vasos sanguíneos, además de la infiltración tumoral por células linfoides, principalmente linfocitos T, CD 4 y CD 8, se considera un factor de mal pronóstico en los tumores testiculares.^{73,74}

En tumores testiculares humanos, la angiogénesis es un fenómeno escasamente investigado.^{4,27,75,102,130,133,141,206} El valor predictivo de la angiogénesis respecto a la producción de la metástasis en ganglios linfáticos ha sido comentado solo en algunos estudios de TCGTs.,^{75,141,206} mientras que otras publicaciones no encontraron una significación pronóstica.^{4,102} Asimismo, los datos cuantitativos aportados acerca del grado de vascularización de los TCGTs son aún motivo de controversia, debido sobretudo al uso de diferentes métodos de cuantificación de la microvascularización aplicados en distintos estudios de TCGTs. De hecho, en algunos estudios las medidas se realizaron definiendo conceptos tan poco randomizados como “cuantificación del área tumoral que contiene el máximo número vasos sanguíneos”;^{4,75,102,141} mientras que en otros estudios, las medidas sí se realizaron al azar en todas partes del área tumoral, pero incluyendo cuantificaciones de microvasos en las áreas de necrosis y de fibrosis.²⁰⁶ Así mismo, en la mayoría de los estudios, no se consideraron la comparación del grado de angiogénesis en testículos tumorales con el grado de microvascularización del testículo de hombres normales (grupo control).^{4,133,141,206} Sin duda, para una adecuada evaluación comparativa entre los diferentes estudios publicados acerca de la angiogénesis es completamente necesario establecer un método aleatorio de cuantificación de la microvascularización en TCGTs, y, obviamente, comparar los resultados con la densidad de microvasos del testículo humano normal.

Recientemente se ha establecido que uno de los principales inductores de la angiogénesis es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF/VPF).¹²⁸ La presencia de este factor VEGF y sus receptores se han demostrado en el testículo humano

normal.^{63,64,75,102,179,206} En una amplia variedad de tumores se ha comentado que el VEGF puede actuar de manera paracrina, induciendo la neovascularización y mediar, de este modo, en los procesos de la angiogénesis.²¹⁹ De hecho, se ha demostrado que el VEGF se sobreexpresa en células germinales malignas^{75,102,128,206} y también en los tumores de la célula de Leydig.¹⁰⁸ También se ha publicado que los receptores de VEGF se expresan en los capilares de TCGTs.²⁰⁶ y en los capilares neoformados en los tumores de células de Leydig.¹⁰⁸ Sin embargo, la neoformación de vasos en los tumores testiculares es un proceso que ocurre solo cuando las células tumorales de CIS han abandonado el tubo seminífero -estructura avascular- y han infiltrado el intersticio, atravesando una gruesa y bien estructurada pared peritubular (constituida por una membrana basal y fibras elásticas y una o dos capas discontinuas de células mioideas, rodeadas por fibras y una matriz extracelular frecuentemente hialinizada) por fuera de la cual se disponen los capilares peritubulares.⁴²

MECANISMOS REGULADORES DE LA CARCINOGENESIS: ONCOGENES Y PROTOONCOGENES

La carcinogénesis es un proceso complejo que supone la alteración de múltiples genes y sistemas reguladores celulares.^{8,19,22,77} El estudio de las bases moleculares de la transformación celular neoplásica requiere detectar, aislar y caracterizar los genes, y sus productos polipeptídicos, implicados en cada etapa de éste proceso de carcinogénesis.^{15,17,53,56,82,188,222} Los mecanismos que dan lugar a la activación de protooncogenes, la pérdida de genes de supresión tumoral o su inactivación funcional, así como la sobreproducción de factores de crecimiento están implicados en el desarrollo de las neoplasias.^{11,15,17,24,85,90,112,214,217,222} En la carcinogénesis se identifican tres fases: iniciación, promoción y progresión tumoral.^{17,82,188,222} Estas tres etapas se han evaluado en varios modelos experimentales, incluido el modelo de carcinoma cutáneo por irradiación ultravioleta solar.^{3,23,77,115} La iniciación de la transformación maligna está causada por una lesión genética no letal, frecuentemente una mutación, que determina un cambio permanente y heredable del genoma celular. Esta lesión genética puede adquirirse por la acción de agentes ambientales -sustancias químicas-fotoproductos que alteran el DNA-,^{3,96,113} la radiación^{3,77} o los virus,^{57,79} o puede heredarse con la línea germinal, tal como se sugiere que ocurre en los melanomas.^{31,40,115} En este sentido, es posible que la transformación monoclonal de una sola célula progenitora que ha sufrido una lesión genética pudiera, en

principio, determinar una neoplasia estable.⁸² Además, existen genes de reparación del ADN que influyen directamente sobre la proliferación o la supervivencia celular, a través de su efecto sobre la capacidad del organismo para reparar la lesión no letal producida por otros genes.⁹⁶

Se han descrito tres tipos de genes reguladores normales: los protooncogenes que estimulan el crecimiento, los genes supresores del cáncer que inhiben el crecimiento (antioncogenes) y los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis.^{15,17,76} Dentro del grupo de protooncogenes se encontraría el PCPH, molécula evaluada en el presente estudio de TCGTs. humanos.

Está establecido que los oncogenes derivan de los protooncogenes, que son genes que estimulan el crecimiento y la diferenciación normal y que son los encargados de ejercer un control sobre el crecimiento celular. Los protooncogenes pueden activarse por mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos o amplificación de genes. Los protooncogenes - que codifican las denominadas oncoproteínas-, y pueden pasar a oncogenes mediante la transducción retroviral (*v-oncs*) o por influencias que alteren su comportamiento *in situ*, transformándolos en oncogenes celulares (*c-oncs*).^{11,17,112,222} Las oncoproteínas, al igual que las proteínas normales, determinan que ciertos factores de crecimiento se unan a sus respectivos receptores específicos de la membrana celular; esta unión produce la activación transitoria del receptor, que activa a su vez a varias proteínas transductoras de señales de la membrana plasmática; las señales se transmiten al núcleo, a través de segundos mensajeros. Una vez que llega la información al núcleo, se produce la inducción y activación de los factores reguladores que inician la transcripción del ADN y finalmente la célula inicia el ciclo celular que concluye con la división.^{1,119,215} Dentro de estos factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el *erbB-2* (también conocido como *neu* HER-2).²⁰⁴ La conversión oncogénica puede ser por una mutación, o mucho más frecuentemente por la sobreexpresión de formas normales de receptores de factores de crecimiento como es el caso del *erbB-2* y *erbB-4*,²⁰⁴ el receptor p185^{*erbB-2*} (HER2/*neu*) y también las moléculas del grupo neurregulinas.^{1,5,89,204,215} Mutaciones de genes de la familia *ras*^{9,17} se han encontrado en varios tipos histológicos de tumores humanos. El H-*ras* tiene gran importancia en la carcinogénesis epitelial cutánea, pues la proteína que codifica no hidroliza la guanosina 5'-trifosfato y su introducción, por ejemplo, en queratinocitos produce

el fenotipo "iniciado" previo al inicio del ciclo celular mitótico.⁸² Otras oncoproteínas reguladoras del ciclo celular o del proceso de señalización en tumores son las determinadas por los genes *myc*, *myb*, *jun* y *fos*.²²⁰

La progresión tumoral, tanto en los TCGTs. como en otros tipos de tumores representa, en realidad, el estadio definitivo de una enfermedad oncológica autorregulada y agresiva. La progresión tumoral queda definida por la alteración genética irreversible por la que se configuran un progresivo genotipo y fenotipo malignos. La selección de determinadas células que portan la inestabilidad genética, conduce a la aparición de células cada vez más malignas, con mayor capacidad de anaplasia, crecimiento e invasión, junto con la capacidad de adaptarse y crear resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia.^{11,112,222} El estadio final de la progresión es el desarrollo de metástasis a distancia.^{6,11}

La progresión ordenada de las células normales y neoplásicas depende de la regulación del ciclo celular por las ciclinas y de las quinasas dependientes de las ciclinas (CDK) y de sus inhibidores (ICDK), que son las proteína p21, p27 y p57 como inhibidores generales y p15, p16, p18 y p19 que son inhibidores selectivos. Las quinasas dependientes de las ciclinas regulan determinadas proteínas críticas del ciclo celular fosforilando, las cuales son necesarias para que la célula progrese hacia la fase siguiente^{111,116}. Estas quinasas se expresan solo durante el ciclo celular, aunque de forma inactiva, y se activan al unirse a las ciclinas para activar a las CDK.^{28,224}

No obstante, en general, las alteraciones de los genes de supresión tumoral son más frecuentes que las de los propios oncogenes.²²² Los productos polipeptídicos de los genes supresores del cáncer son componentes de la vía de inhibición del crecimiento y moléculas que regulan la transcripción nuclear y el ciclo celular^{15,32,217} La inactivación de estos genes supresores suele deberse a una delección, y menos frecuentemente a una mutación; aunque también pueden quedar inactivados por la formación de complejos entre la proteína codificada y otras proteínas celulares o virales.¹²⁴

El gen supresor p53 codifica una proteína nuclear que se liga y modula la expresión de otros genes importantes para la reparación de ADN y cuando se pierde p53, las células se vuelven inestables.^{35,113,188} La alteración del ADN estimula la producción p53, que a su vez estimula la síntesis de p21. Además, p21 inhibe las CDKs que impulsan el ciclo celular. La

activación del gen p53 origina la detención del crecimiento celular y permite la reparación del ADN.^{15,23,28,32,52,223} De otra parte, el gen *p16*, gen de supresión tumoral, regula la fase G1 del ciclo celular y codifica una proteína intranuclear encargada de bloquear la progresión del ciclo celular, inhibiendo la acción de la ciclina D. Cuando las células tumorales tienen inactivada la función p16, se convierten en "inmortales".^{95,188} La carcinogénesis también está regulada por genes reguladores de la apoptosis como es el gen *bcl-2*.⁸¹ Con todo, el proceso de carcinogénesis es extraordinariamente complejo en donde adquieren singular importancia también los mecanismos de señalización celular, dado que, los genes supresores pueden actuar mediante la codificación de moléculas que disminuyen la transducción de señales o regulan la expresión de receptores de superficie celular, entre los que se incluyen el TGF-beta y las cadherinas.^{124,210}

Proteína de Progresión Carcinogénica del Hámster (PCPH)

El protooncogén PCPH ha sido caracterizada como una proteína de progresión carcinogénica del hámster (PCPH) (*protein carcinogenic progression of hamster*).^{137,156,157,170,201,203,205} PCPH ha sido evaluado en líneas celulares^{170,184} y en biopsias de displasias y neoplasias laríngeas humanas con resultados satisfactorios.¹⁸ El *mt*-PCPH es un nuevo oncogén, con un peso molecular aproximado de 42.5 kbp., que se ha identificado en el modelo en hámster a partir de una activación del oncogén *ras*.^{137,195} En el hámster, el protooncogén PCPH codifica una proteína de 469 aminoácidos y el oncogén *mt*-PCPH una de 246 aminoácidos, con un peso molecular de 26 kDa.^{201,203} El protooncogén PCPH del hamster se localiza en el brazo corto del cromosoma X (zona Xpa7).²⁰⁵ La localización de PCPH en este cromosoma sugiere que el oncogén *mt*-PCPH pudiera participar en la conversión maligna de las células neoplásicas.^{10,147,205} En tejidos normales, la expresión de PCPH es más intensa en el riñón y en el hígado.²⁰⁵ En el ratón se ha aislado el protooncogén PCPH en el cromosoma 12. Existe una identidad del 93,7% entre la proteína del hámster y la del ratón.¹⁵⁶ El protooncogén PCPH es un gen altamente conservado en los mamíferos^{157,160} y en organismos invertebrados e incluso en estructuras tan simples como levaduras.

En la especie humana, sin embargo, el protooncogén PCPH se localiza en el cromosoma 14, 14q24.3.²⁰² En humanos, el ADNc del protooncogén codifica también una proteína de 428 aminoácidos (47-kDa) que comparte una homología del 78 y 87% respectivamente con la proteína del hámster y del ratón; así como un polipéptido de 27-

kDa., el cual hasta estudios muy recientes, solo se había aislado en epitelios normales,¹⁵⁷ incluyendo la glándula mamaria normal de la rata y epitelios humanos de la piel y de la mama.¹⁷⁰ Asimismo, el ARNm del protooncogén PCPH humano se encuentra ampliamente distribuido en riñón e hígado, y con menor intensidad en músculo y piel.¹⁵⁷

En las células neoplásicas, el PCPH puede provocar una disminución del ATP intracelular, debido a la actividad difosfohidrolasa de la oncoproteína PCPH. El descenso de la concentración de ATP inhibe el inicio de la apoptosis.^{61,143,155,157} La actividad difosfohidrolasa de la oncoproteína PCPH da lugar a la depleción del ATP intracelular, y estos procesos producirán una inhibición de los sistemas de respuesta al estrés mediados por c-JUN NH₂-quinasa terminal (*JNK* o *SAPK*) y por el sistema extracelular de regulación de quinastas (*ERK*).¹⁵⁵ La inhibición simultánea de JNK y ERK por la oncoproteína PCPH puede ser importante, ya que la activación de ambas quinastas es necesaria para la inducción de la apoptosis provocada por diversos agentes estresantes.^{220,221} Por último, otro mecanismo de acción parece estar implicado con cambios de desregulación de PCPH, de modo que la proteína de 47-kDa, probablemente correspondiente con el protooncogén, y la disminución de la de 27-kDa, que correspondería al oncogén.¹⁵⁷ Estos datos pudieran relacionarse con el efecto regulador negativo en la vía *ras*, solo *mt*-PCPH, pero no PCPH, coopera con la oncoproteína *ras* para producir un estímulo prolongado de la fosforilación y de moléculas de señalización celular reguladas también por proteínquinastas¹⁵⁷ como se ha podido demostrar en tumores de mama inducidos en ratas¹⁸⁴ o tumores de laringe en humanos.¹⁸

Proteína de la familia "Krüppel like", KLF6

Otra nueva molécula aún no explorada en los TCGTs. y que hemos tenido la oportunidad de estudiar en la presente Tesis es el KLF6, el cual es un factor de transcripción perteneciente a la familia "Krüppel like", que se caracteriza porque la unión de esta proteína al DNA promotor de sus genes diana son dedos de Zn. Este gen es un supresor tumoral que bloquea la entrada en la fase S del ciclo celular, estimulando la transcripción de p21, que frena la entrada en ciclo desde G1.^{21,114,134,176} El KLF6 aparece como supresor tumoral y se ha encontrado mutado en el 80% de los tumores de próstata, de modo que las distintas formas mutantes de KLF6 producen sobre la transcripción del promotor de p21. Mientras que la forma normal ("Wild type") activa fuertemente la transcripción de p21 y por tanto

promueve la detención del ciclo celular. Además, diversas formas mutantes aisladas de tumores de próstata no estimulan la transcripción de p21 de la misma manera, y, en este sentido, la mayoría de ellas disminuyen la actividad transcripcional en un 50%. El resultado final de estos procesos reguladores es que la cantidad de p21 producido en las células transfectadas con las formas mutantes de KLF6 no es tan grande como cuando se transfecta con la forma salvaje (“wild type”). En cultivos celulares, las células transfectadas con KLF6 mutantes entran en ciclo y se dividen más frecuentemente que las transfectadas con el gen salvaje, lo cual se comprueba cuando evaluamos la proliferación celular, observando que la incorporación de timidina tritiada es mayor cuando las células reciben el KLF6 mutado, o un vector vacío, que cuando reciben KLF6 normal. Esto explica cómo mutaciones que afectan a la zona codificante del gen están produciendo una división desordenada de las células que determinan su transformación en un tumor maligno.^{21,114,134,176}

Gen PTOV-1 sobreexpresado en tumores

En los TCGTs. hasta el presente estudio no se ha explorado una nueva proteína recientemente caracterizada y relacionada con el ciclo celular en células neoplásicas y que ha sido denominada como PTOV-1.^{174,175} Estudios muy recientes también han identificado y obtenido la secuenciación completa del gen PTOV-1, el cual se sobreexpresa en cáncer de próstata. De hecho, la proteína sintetizada por el gen PTOV-1 en las células neoplásicas pueden adquirir formas anormales, las cuales se sobreexpresan, entre otros varios tipos de células tumorales, en el 71% de los casos de cáncer de próstata, siendo su expresión directamente proporcional al índice de proliferación Ki 67, lo que sugiere que la sobreexpresión de PTOV-1 puede contribuir al mantenimiento de un status proliferativo de las células de carcinoma de próstata.^{174,175} La presencia intranuclear de la proteína PTOV-1 sugiere su participación directa en la regulación de la división de las células neoplásicas, dado que estudios *in vitro* con células quiescentes solo se ha visto expresión de la proteína PTOV-1 intracitoplasmática, pero no nuclear, por lo que su traslocación al núcleo se relacionaría con el comienzo de la fase S del ciclo celular. La presencia inmunohistoquímica de PTOV-1, no solo en los adenocarcinomas prostáticos infiltrantes, sino también en el citoplasma de las células de las neoplasia intraepiteliales prostáticas (PINs.) y su ausencia en las células epiteliales basales y secretoras de la próstata normal, sugiere la participación

de PTOV-1 en la regulación de los primeros estadios de la transformación neoplásica en el cáncer de próstata.

FINALIDADES DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

El objetivo del presente estudio es, de una parte, investigar el aumento de la microvascularización presente en los TCGTs humanos, particularmente en los seminomas, carcinomas embrionarios y en los tumores de seno endodérmico, comparando la expresión del marcador CD34 en las células endoteliales y de alfa-actina en las células de músculo liso vascular del testículo normal, con la observada en las diferentes variedades histológicas de los TCGTs. Además, se pretende evaluar la posible correlación entre la actividad angiogénica, la expresión de los receptores de VEGF en TCGTs. y la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ en íntima vecindad con las células neoplásicas y su participación en el desarrollo de neovasos en los TCGTs. Pero de otra parte, se pretende evaluar las alteraciones que experimentan las uniones de las células de Sertoli en relación con la proliferación de las células de CIS, y los cambios de expresión de algunas moléculas -el protooncogén PCPH,^{137,138,158} el factor de transcripción y supresor tumoral Kruppel-like factor 6, KLF-6,^{21,114,176} el gen sobreexpresado en tumores PTOV-1 y relacionado con proliferación -,^{174,175} aún no exploradas en el testículo humano y que pudieran tener cierta capacidad oncogénica en el CIS. Por último, se pretende correlacionar los cambios degenerativos de la pared peritubular y su participación en el comienzo de los mecanismos de angiogénesis en los TCGTs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

PRIMERA. ¿La angiogénesis es fundamental en la progresión de los tumores de células germinales testiculares (TCGTs.)?.

SEGUNDA. ¿Existen relaciones de la actividad angiogénica con la respuesta de células inmunocompetentes y la expresión de nuevas moléculas oncogénicas en los TCGTs.?

OBJETIVOS

PRIMERO. Investigar el posible aumento de la microvascularización presente en tres tipos histológicos de TCGTs humanos: seminomas, carcinomas embrionarios y tumores del seno endodérmico.

SEGUNDO. Correlacionar la actividad angiogénica con la expresión de los receptores de VEGF en TCGTs. y la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+.

TERCERO. Estudiar los mecanismos de progresión del CIS, en relación con la expresión de nuevas moléculas relacionadas con regulación tumoral, como son el protooncogén PCPH, el factor de transcripción y supresor tumoral Kruppel-like factor 6, KLF-6 y el gen sobreexpresado en tumores PTOV-1 y relacionado con proliferación celular.

CUARTO. Correlacionar los estos cambios degenerativos de las células de Sertoli y de la pared peritubular con el comienzo de los mecanismos de angiogénesis en los TCGTs.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL

Se estudiaron 40 piezas de orquiectomía diagnosticadas de TCGTs.: 15 casos correspondieron a seminomas puros, y el resto a TCGTs. combinados, en los que predominaba la diferenciación de carcinomas embrionarios en 15 casos y tumor del seno endodérmico en 10 casos. Los casos fueron obtenidos del Archivo del Departamento de Patología del Hospital La Paz de Madrid. Como grupo control se estudiaron los testículos, obtenidos durante la autopsia de 8 hombres adultos (cuyas edades estaban comprendidas entre 19 y 57 años) y que murieron por infarto de miocardio (5 casos) o accidente cerebro vascular (3 casos). Estas autopsias fueron efectuadas (entre 6 y 10 horas posteriores a la muerte) en el Departamento de Patología del Hospital Universitario de La Paz. Los casos incluidos en este grupo control no presentaban patologías que claramente producen lesiones testiculares, metabólicas o endocrinológicas. Los casos control fueron procesados de igual forma que los casos con TCGTs, y el re-evaluación histológica del testículo confirmó la presencia de tejido testicular y espermatogénesis normal en cada uno de los casos control.

METODOS

Métodos Histológicos Generales

En todos los casos, los tumores y los tejidos de los casos del grupo control fueron fijados en formaldehído tamponado al 4%, durante 48 horas. Para el estudio histológico se tomaron secciones al azar de los testículos, epidídimos y cordón espermático de los casos control. En los casos diagnosticados de TCGTs. se obtuvieron por lo menos seis diferentes cortes de distintas áreas representativas de cada tumor para el diagnóstico histopatológico, además se practicaron nuevas secciones del área tumoral, del parénquima testicular adyacente al tumor y del epidídimo y del cordón espermático, con el fin de precisar los diferentes tipos histológicos del tumor y su estadio patológico.

Los cortes se lavaron y deshidrataron mediante pases en alcoholes de concentración creciente (70%, 96% y 100%); posteriormente, las secciones se incluyeron en parafina, utilizando un procesador de tejidos de marca Autotechnicon Duo ®. Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron secciones de 6 micras de espesor, mediante un microtomo de la marca Emnst Leitz GMBH(Typ 1212) Wetzlar, Germany®. Las secciones microtómicas se desparafinizaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones

decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE). Para el montaje final de los cortes se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona, España). Posteriormente se realizó el examen con microscopio de luz de las secciones histopatológicas, para la correcta confirmación del diagnóstico y estadio patológico tumoral.

Métodos Inmunohistoquímicos

Para el estudio inmunohistoquímico,^{33,94} se realizaron tres cortes seriados de los bloques de parafina de áreas representativas del tumor, de 6- μ m de espesor; idéntico procedimiento se siguió en el grupo control. Los anticuerpos primarios y las diluciones empleadas fueron:

1) anticuerpo marcador de células endoteliales anti-CD4 (BioGenex, CA, USA) a una dilución de 1:50;

2) anticuerpo anti-alfa-actina de músculo liso (Dakoppats, Glostrup, Denmark) a una dilución de 1:50;

3) anticuerpo anti-linfocitos T CD3+ (Dakoppats) a una dilución de 1:400;

4) anticuerpo anti-linfocitos T CD4+ (Novocastra, Newcastle, UK) a una dilución de 1:100;

5) anticuerpo anti-linfocito T CD8+ (Dakoppats) a una dilución de 1:400;

6) anticuerpo anti-linfocitos B CD20+ (Dakoppats) a una dilución de 1:400;

7) anticuerpo anti-macrófagos CD68+ (Dakoppats) a una dilución de 1:2000;

8) anticuerpo anti-cadenas kappa de células plasmáticas (Dakoppats) a una dilución de 1:2000;

9) anticuerpo anti-cadenas lambda de células plasmáticas (Dakoppats) a una dilución de 1:2000;

10) anticuerpo anti-laminina (Novocastra) a una dilución de 1:500;

11) anticuerpo anti-colágeno IV (Novocastra) a una dilución de 1:500;

12) anticuerpo anti-cadherina E (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución de 1:400;

13) anticuerpo anti-beta-catenina (Trnasduction Laboratory, Kesington, KY) a una dilución de 1:1000;

14) anticuerpo anti-fosfatasa alcalina placentaria (Dakoppats) a una dilución de 1:500;

15) anticuerpo anti-receptor VEGF 1/Flt-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA) a una dilución de 1:400;

16) anticuerpo anti-receptor VEGF 2/Flk1/KDR (Santa Cruz) a una dilución de 1:400,

17) anticuerpo anti-receptor VEGF 3/Flt-4 (Santa Cruz) a una dilución de 1:400;

18) anticuerpo anti-PCPH (donado por el Dr. Vicente Notario) a una dilución de 1:2000;

19) anticuerpo anti-KLF6 (Santa Cruz) a una dilución de 1:400;

20) anticuerpo anti-PTOV-1 (donado por la Dra. Rosana Paciucci y el Dr. Jaume Reventós) a una dilución de 1:1000.

Los anticuerpos anti-células endoteliales CD 34 y anti-alfa-actina muscular fueron procesados usando el método de antifosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina, con el kit Dakoppats, revelándose la inmunoreacción con Fast Red. El resto de los anticuerpos fueron procesados usando el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa (Zymed), y revelándose la inmunoreacción con diaminobenzidine (Sigma, MO, USA).

Método de Estreptavidina-Biotina Peroxidasa

Las secciones se hidrataron y se incubaron por 20 minutos en solución salina de Buffer de fosfatos (PBS), para reducir la actividad de peroxidasa endógena. En los cortes en los que se detectaron los antígenos CD4 y CD8, para acentuar la exposición de los antígenos, se efectuó digestión con tripsina 0.01 M, 0.1% (Merk, Darmstadt, Germany) en PBS 0.01 M, de pH 7.6, durante 15 minutos a 37°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario (diluido en PBS con albúmina sérica bovina al 1%), las secciones se lavaron dos veces en PBS, para remover el anticuerpo primario no fijado y luego se incubaron con inmunoglobulina biotilada de cabra anti-ratón (Biocell, Cardiff, UK) a una dilución de 1:100 en buffer de PBS-suero humano al 20% y pH 7.6. Después de una hora de incubación con el anticuerpo secundario, las secciones fueron tratadas con el complejo

Estreptavidina-biotin-peroxidasa (Zymed), durante 30 minutos a temperatura ambiente y reveladas con 30 mg de diaminobenzidina, disueltos en 10 ml de buffer tris HCl de pH 7.4 conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.015%. Por último, las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron en etanol y se montaron en De Pex (Probus, Badalona, España).

Método de Fosfatasa Alcalina-Antifosfatasa Alcalina

Las secciones desparafinizadas e hidratadas se lavaron en el buffer de inmunoensayo (Biomeda), y se trataron con suero de cabra (Zymed, San Francisco, Ca) incubándose luego con el anticuerpo primario a las diluciones indicadas, durante 90 minutos y a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron y se incubaron enseguida con la inmunoglobulina de cabra anti-ratón (Biocell, Cardiff, United Kingdom) para luego lavarse e incubarse con el complejo enzimático fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (Dako, Glostrup, Denmark). El revelado con Fast Red (Sigma, Sto Louis, Mo) fue seguido de contraste con hematoxilina de Harris y montaje en medio acuoso con Cristal Mount (Biomeda).

La especificidad de los procedimientos de inmunohistoquímica fueron confirmados en cortes seriados, mediante sustitución del anticuerpo primario por suero no inmune. Cada inmunoreacción fue realizada en al menos en tres cortes de cada uno de los patrones histológicos representativos de cada caso de TCGT estudiado. Los controles negativos se procesaron al mismo tiempo omitiendo el primer anticuerpo. Para los controles negativos se utilizaron tejidos humanos de glándula mamaria, de piel y de glándula sudorípara. La incubación de todas las secciones con la solución reveladora de Fast Red se llevó a cabo con exacto tiempo, con el fin de que los resultados de la inmunoreacción pudieran evaluarse comparativamente.

Métodos de Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal

El epítotope KLF-6 fue explorado también por métodos de inmunofluorescencia indirecta y después evaluados los resultados con microscopía confocal. Para ello se usaron cortes histológicos de tejido testicular normal y de casos representativos de cada tipos histológicos de TCGTs., obtenidos en un microtomo de piezas previamente fijadas en formol e incluidas en parafina. En estos casos los cortes fueron incubados con el anticuerpo

primario anti-KLF-6 a una dilución de 1:200 y se incubaron durante 45 minutos a 4° C. Posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario unido a fluorosceína (Santa Cruz) y fueron evaluados en un microscopio confocal Leica, efectuando aproximadamente 90 cortes en cada muestra y después integrando las imágenes, las cuales son las que se presentan en los resultados.

Estudios Histométricos

Para realizar los estudios morfométricos, se utilizaron tres secciones por caso teñidas con el anticuerpo para células endoteliales anti-CD34 y tres secciones por caso teñidas con el anticuerpo anti-actina de músculo liso. En cada sección, la selección del campo microscópico se hizo con un método aleatorio, el cual fue estandarizado siguiendo la misma metodología empleada en un estudio previo de células inmunocompetentes en TCGTs.³⁴

El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se describe a continuación brevemente: la selección de campos se llevó a cabo en dos etapas, en la primera se seleccionaron las áreas dentro del tumor; en la segunda se escogieron los campos dentro de cada área. Las áreas dentro del tumor seleccionadas para el estudio fueron aquellas que, habiendo sido valoradas por tres patólogos, se consideraron adecuadas por no presentar necrosis, abscesos y hemorragias en el tejido tumoral. La selección de campos dentro de las áreas se llevó a cabo aleatoriamente; el límite exterior de las áreas se dibujó sobre la laminilla y ésta se desplazó sin sobrepasar los límites marcados y sin realizar valoraciones subjetivas de visualización directa de los campos microscópicos elegidos.

Se escogieron 10 campos en cada superficie, ya que usualmente este es el número que se selecciona para una visualización de distribución espacial homogénea. Se verificaron dos métodos de selección de campos microscópicos para una superficie dada. En el primero, denominado de "*selección subjetiva*", uno de los más usados hasta este momento, un observador selecciona diez campos asegurándose de que estén distribuidos homogéneamente sobre la superficie seleccionada. Este método, rápido y sencillo, pudiera fácilmente ser sesgado. Las posibilidades de sesgo generadas por el muestreo objetivo de este estudio fue comprobado utilizando un segundo método, denominado de "*selección aleatoria*", la cual es no sesgada. Para este propósito, se utilizó un retículo para dividir la

superficie del campo en 100 partes iguales. A cada campo se les asignó una combinación de dos dígitos, y a través del uso de una tabla de números al azar se escogieron 10 combinaciones. Este método es más laborioso pero garantiza la ausencia de sesgo. Los dos métodos se utilizaron para seleccionar los campos en cada sección.

En cada patrón histopatológico de TCGTs. se midieron los siguientes parámetros: 1) la Densidad de volumen (Dv) de los capilares (esto es, los vasos con el diámetro inferior a 15 μm), 2) la Dv de las arteriolas y vénulas (vasos con capa muscular circular y el diámetro comprendido entre 15-60 μm), y 3) la VD de los microvasos totales intratumorales (capilares + arteriolas + vénulas).

Para el estudio cuantitativo de angiogénesis, utilizamos el procedimiento estereológico estándar de Weibel.²¹¹ Para ello, en los campos seleccionados microscópicamente con un objetivo 20x, tanto de los casos tumorales como del grupo control, se cuantificaron los vasos contando al menos 2.000 puntos.³⁴ Se realizó la histometría mediante el programa informático suministrado por la compañía Videoplan-Kontron (Germany), y usando una cámara CCD Sony conectada a un microscopio de luz Axioskop Zeiss Germany. La significación estadística entre las muestras de TCGTs y el control se evaluó con mediante el método de t-Student, considerando diferencias significativas con una $p < 0.01$.

Métodos de Inmunolectroforesis ("Western blot")

Para métodos de inmunolectroforesis ("Western blot")³⁶ se congelaron tejidos testiculares. Uno de los fragmentos congelados, de aproximadamente 50 mg se procesó para extracción proteica, electroforesis unidireccional y método de Western blot con el fin de confirmar la especificidad de los anticuerpos frente a las diferentes proteínas que se expresan en los TCGTs y en los casos del grupo control (testículos humanos normales congelados en el momento de la autopsia) también seleccionadas para estudios moleculares. El fragmento tisular se homogeneizó en tampón de lisis y se diluyó a una concentración final de 150 mg/ml. Los diferentes homogeneizados se diluyeron en tampón de muestra y se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida, a diferentes concentraciones, las cuales dependen del peso molecular de la proteína a identificar. La cantidad de proteína por pocillo se midió por medio del método de Bradford y se ajustó para que, de este modo obtener una cantidad idéntica de proteína evaluada en todas las muestras de TCGTs. y también de los casos

control (30 µg). Como control metodológico positivo se incluyó en el gel un pocillo conteniendo al menos 400 ng de péptido comercial de una proteína recombinante del anticuerpo que se evaluó inmunoelectroforéticamente. Como control negativo se incubaron membranas idénticas y siguiendo el mismo proceso, pero omitiendo el anticuerpo primario en cada caso. Tras la electroforesis de las proteínas, estas bandas de los geles de electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron mediante el bloqueo de inmunoglobulinas inespecíficas con leche en polvo desnatada, diluida en PBS al 5% y conteniendo Tween-20 al 2%. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios correspondientes, siendo las diluciones recomendadas de 1: 10.000 para PCPH y KLF-6, y de 1: 15.000 para PTOV-1. Después de sucesivos lavados, la actividad peroxidasa fue evaluada con el sistema de sustrato de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), el cual fue transferido en oscuridad a placas radiográficas.

Métodos de Transcripción revertida y PCR (RT-PCR)

Los métodos de RT-PCR¹⁸⁶ permiten evaluar con alta exactitud la expresión de RNA sobretodo en aquellos frecuentes casos en los que la extracción de RNA se realiza a partir de muestras tisulares incluidas en parafina, con lo cual existe un alto grado de degradación del RNA, esto es, de fragmentación en trozos pequeños, de 200-300 bp, haciendo difícil la recuperación intacta en un solo fragmento del RNA completo. Con el fin de evitar la falta de representación de zonas de los extremos del gen, o de zonas intermedias del RNA, se ha diseñado un protocolo de amplificación del cDNA (SBI) obtenido tras transcripción reversa usando como “primers” para la PCR una serie de oligonucleótidos degenerados que permiten amplificar todas las zonas del RNA. Tras estos ciclos cortos de amplificación usando hexanucleótidos degenerados, los trozos obtenidos se someten ya a la PCR con los “primers” específicos del gen a estudiar. En el caso concreto de KLF6, los "primers" usados fueron: 5'-CGGCCAAGTTTACCTCCG-3' Y 5'-CATGAGCATCTGTAAGGC-3'.

RESULTADOS

En la presente Tesis Doctoral se van a exponer los resultados obtenidos de una manera sistematizada, con el fin de intentar resolver, esto es de confirmar o refutar, las siguientes investigaciones:

1. Los microvasos se distribuyen heterogéneamente en los TCGTs.
2. Angiogénesis también se produce en relación a las áreas de necrosis y tejido de granulación en los TCGTs.
3. La angiogénesis está relacionada con la infiltración de linfocitos en los TCGTs
4. Los receptores VEGF se expresan en las células tumorales y endoteliales de los TCGTs.
5. El contenido en microvasos está reducido en TCGTs con respecto al testículo humano normal.
6. Existe alteración de expresión de moléculas candidatas oncogénicas en el CIS.
7. Las alteraciones de las células de Sertoli y la pared peritubular se relacionan con la infiltración de las células del CIS y su transformación en un TCGTs.

1. Los microvasos se distribuyen heterogéneamente en los TCGTs.

Los microvasos tienen una distribución heterogénea en los TCGTs. En todos los tipos histológicos de TCGTs, los capilares predominan sobre los vasos de mayor tamaño (Fig. 1). En todos los TCGTs, la mayor actividad angiogénica tiene lugar en el intersticio que rodea al tumor. Sin embargo, existe también menor, aunque evidente, angiogénesis en el interior de los nódulos tumorales. De hecho, existen áreas con microvasculatura abundante intercaladas con áreas con escasez o ausencia de microvasos. En todos los tipos de TCGTs, existen vasos irregularmente dilatados, y además en ocasiones se evidencian vasos anómalamente configurados, entre los que se encuentran vénulas de contorno muy irregular y posibles fístulas arterio-venosas aberrantes. (Fig. 1)

En los seminomas, los capilares son más frecuentes en la periferia de los nódulos tumorales satélite que en el centro del nódulo tumoral principal. Generalmente, los microvasos están distribuidos en el tejido conjuntivo del estroma tumoral, y se encuentran rodeados de pequeñas acumulaciones de células inflamatorias (Fig. 1). Los capilares están

también muy cerca de las células tumorales. Se pueden observar también células endoteliales aisladas -CD34 positivas- entremezcladas con las células tumorales (Fig. 1). Estas células endoteliales se transforman progresivamente en pequeños capilares con luz. Ocasionalmente, las células tumorales hacen contacto con vénulas grandes e irregulares de paredes delgadas, que están tapizadas por células endoteliales, positivas con el anticuerpo anti-célula endotelial CD34 (Fig. 1).

En los tumores del seno endodérmico, los microvasos se disponen de manera más homogénea, con predominio de capilares, pero también con la formación de estructuras vasculares de mayor calibre y de contorno muy irregular (Figs. 1 y 2). Las células epiteliales tumorales de los cuerpos de Schiller-Duval son negativos con el anticuerpo CD34; pero contrariamente, las células endoteliales que forman las asas capilares de los cuerpos de Schiller-Duval son intensamente positivas con dicho anticuerpo CD34.

Los carcinomas embrionarios estudiados mostraron dos diferentes patrones histológicos de distribución de microvasos, dependiendo de cada respectivo patrón histológico de crecimiento tumoral: en los carcinomas embrionarios de patrón papilar, los microvasos son abundantes en el eje conectivo de cada proyección papilar; sin embargo, en el carcinoma embrionario de patrón sólido los microvasos son escasos y están distribuidos de manera irregular (Figs. 2-4). No se ha encontrado una distribución específica de las células endoteliales CD34 positivas o de los microvasos en relación con los cuerpos embrioides presentes en los carcinomas embrionarios.

El CIS testicular se desarrolla frecuentemente en tubos seminíferos de menor tamaño que los tubos seminíferos normales, y es mucho más habitual encontrar células malignas de CIS en tubos seminíferos atróficos, sobretodo en pacientes con criptorquidia, en los que la pared tubular está más engrosada, y los capilares se disponen por fuera de la capa de células mioideas de la pared. Cuando las células del CIS proliferan, las células de Sertoli desaparecen, y los tubos seminíferos aumentan de diámetro. Esto provoca una enorme dilatación en la pared peritubular, que se comienza a adelgazar de manera progresiva (Figs. 5 y 6). Con frecuencia las células del CIS proliferan tanto que llenan completamente los tubos seminíferos, pero no existe evidencia de que induzcan la angiogénesis en esos tubos (Fig. 5). No obstante, existen algunos tubos en los que la angiogénesis puede comenzar en la parte más interna de la pared tubular (Fig. 6). En este proceso, aparecen inicialmente células

positivas para CD34, y la mayor parte de los capilares presentes son de pequeño calibre o poseen luces de pequeño diámetro y están rodeadas por células endoteliales CD34 positivas. Posteriormente, se forman múltiples acúmulos de células tumorales intraluminares, los cuales adquieren un gran tamaño. Este crecimiento provoca desplazamiento de los capilares del testículo normal hacia la periferia del nódulo.

En estadios más avanzados de los tumores testiculares con patrón de crecimiento infiltrante, los microvasos son muy abundantes en el interior y alrededor de los tubos que contienen células de CIS (Fig. 6). El intersticio contiene también células tumorales infiltrantes y estas áreas con microinfiltración se encuentra altamente vascularizado.

2. Angiogénesis también se produce en relación a las áreas de necrosis y tejido de granulación en los TCGT.

En el centro del nódulo tumoral, la angiogénesis es muy variable, observándose zonas que carecen de microvasos. Esas zonas presentan células tumorales con signos de isquemia celular, esto es, de necrobiosis unicelular que progresivamente confluyen para formar las características áreas de necrosis tumoral, y de este modo, las áreas de necrosis presentes en los nódulos de los TCGTs. pueden llegar a ser muy extensas (Figs. 3 y 4). Estas áreas de necrosis son reemplazadas progresivamente por áreas de tejido cicatricial, en las que tiene lugar la formación de un tejido de granulación muy vascularizado.

3. La angiogénesis está relacionada con la infiltración de linfocitos en los TCGTs

En todos los tipos de TCGTs., la infiltración por linfocitos y macrófagos es muy considerable, siendo más prominente en los seminomas que en los TCGTs no-seminomatosos. Particularmente en los seminomas, las paredes de arteriolas y vénulas están invadidas por linfocitos que migran a través de las células endoteliales (Figs. 7 y 8). Algunos seminomas, incluso, muestran nódulos linfoides activos que presentan que están rodeados por una alta actividad angiogénica (Fig. 8). Los linfocitos son también abundantes en el interior de los tabiques conectivos intratumorales, rodean la pared de los microvasos - hecho que se evidencia en todos los tipos de TCGTs- y, asimismo, se disponen en íntimo contacto con las células tumorales. Estos linfocitos se pueden identificar como linfocitos T-citotóxicos CD8+ y T-auxiliadores CD4+ (Fig. 8). En todos los tipos de TCGTs son más

abundantes los linfocitos CD8+ que los CD4+; es más, en los seminomas el 70% de los linfocitos son células CD8+.

4. Los receptores VEGF se expresan en las células tumorales y endoteliales de los TCGTs.

Los tres anticuerpos contra receptores del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) - VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1/KDR y VEGFR-3/Flt-4- se expresan en las células endoteliales de los capilares peritubulares e intersticiales, y en las células de Sertoli y de Leydig del testículo normal (datos no mostrados). En los TCGTs. estudiados, los distintos receptores de VEGF se marcaron intensamente positivos en las células endoteliales de cada microvaso y también en las células tumorales de cada tipo histológico de TCGTs., siendo el inmunomarcaje más fuerte en los seminomas (Flt-1, Fig. 5a, Flt-4, Fig. 5b, Flk-1, (Fig. 9). No se observaron diferencias particulares de expresión entre los tres tipos de receptores VEGF, con respecto a los diferentes patrones histológicos de TCGTs.

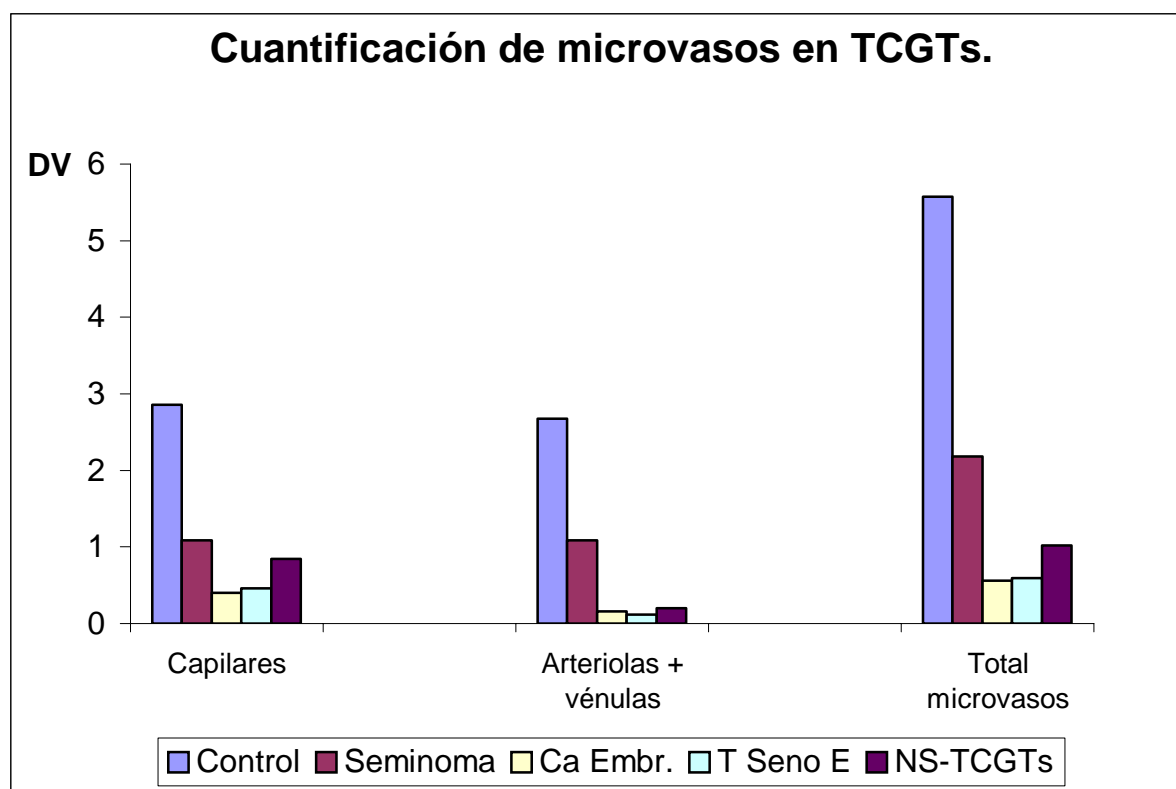
5. El contenido en microvasos está reducido en TCGTs con respecto al testículo humano normal.

La cuantificación de los microvasos en TCGTs se ha comparado con el número de microvasos presentes en el testículo normal (grupo control); en estos casos la cuantificación también se ha realizado usando el inmunomarcaje con el anticuerpo anti-células endoteliales CD34 (para identificar a los capilares) y anticuerpo anti-alfa-actina muscular (para evaluar las arteriolas y las vénulas). Los campos microscópicos en los que se efectuó la cuantificación fueron seleccionados aleatoriamente. Los TCGTs. mostraron menor número de microvasos que el obtenido en el testículo humano normal ($p < 0.01$) (Tabla 1). En todos los casos estudiados de TCGTs, los seminomas presentaron mayor número de microvasos que los carcinomas embrionarios ($p < 0.01$) y que los tumores del seno endodérmico ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas entre la cuantificación de microvasos en los carcinomas embrionarios, con respecto a los datos obtenidos en los tumores del seno endodérmico.

Tabla 1. Cuantificación de microvasos en diferentes tipos histológicos de TCGTs.

Testículo	DV Capilares	DV Arteriolas + Vénulas	Total Microvasos
Control	2.86 ± 0.43	2.67 ± 1.07	5.57 ± 1.29
Seminomas	1.09 ± 0.38 ^a	1.09 ± 0.37 ^a	2.18 ± 0.66 ^a
Ca Embrionario	0.40 ± 0.17 ^{a,b}	0.16 ± 0.18 ^{a,b}	0.56 ± 0.26 ^{a,b}
T Seno End	0.46 ± 0.3 ^{a,b}	0.12 ± 0.16 ^{a,b}	0.59 ± 0.33 ^{a,b}
NS-TCGTs.	0.84 ± 0.47 ^a	0.20 ± 0.19 ^{a,b}	1.02 ± 0.52 ^{a,b}

a: p<0.001 con respecto al control. b: p<0.001 con respecto al seminoma



La densidad de volumen (Dv) de los microvasos se expresa como el número de microvasos por unidad de volumen tisular, que es cuantificada aleatoriamente en todos los tejidos testiculares normales (grupo control) y en la mayoría de los casos con TCGTs. Para este estudio histométrico, los capilares fueron identificados inmunohistoquímicamente con el anticuerpo anti-CD34; mientras que las arteriolas, las vénulas y los vasos intratumorales aberrantes fueron identificados con el anticuerpo anti-alfa-actina muscular. Los datos se expresan mediante su media aritmética y error estándar de la media. Se ha considerado un nivel de significación de p<0.01.

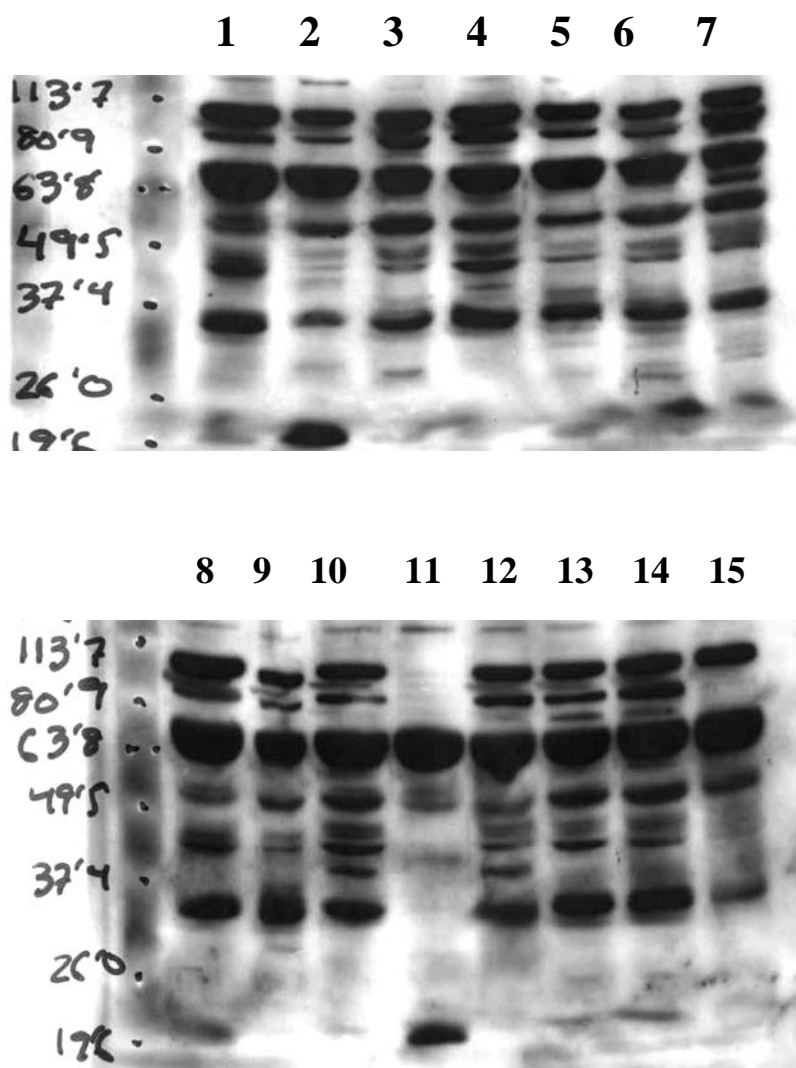
6. Alteración de Expresión de Moléculas candidatas oncogénicas en el CIS

Las células del CIS expresan PCPH (Figs. 10 y 11), mientras que las espermatogonias basales normales solo expresan vestigios de inmunotinción de PCPH en el citoplasma perinuclear; así mismo un marcaje muy débil también se puede observar en el citoplasma de células más maduras de la espermatogénesis y en el interior de las células de Sertoli (Fig. 10).

PTOV-1, protooncogén bien caracterizado en próstata, muestra una señal muy intensa en el testículo humano, aunque es ubicuo en el citoplasma de células de la línea germinal y en el de las células de Sertoli y de las células de Leydig; con todo, el inmunomarcaje de PTOV-1 se intensifica muy notoriamente en el citoplasma de las células de CIS (Fig. 12), sobretodo si se compara con la débil tinción de en las espermatogonias normales.

KLF-6 es muy positivo en todas las variedades histológicas de TCGTs., tanto en los seminomas (Figs. 13, 14 y 15) como en los tumores no-seminomatosos y está sobreexpresado también en los coriocarcinomas. Este incremento de intensidad de inmunotinción de KLF-6 se observa también en el citoplasma de las células del CIS, lo que contrasta con la muy débil tinción en las espermatogonias y células de Sertoli normales (Fig. 13). Estos datos de inmunohistoquímica han sido comprobados también usando la inmunofluorescencia indirecta para la identificación de KLF-6, evaluando los resultados mediante estudio de microscopía confocal, tanto en testículos humanos normales (grupo control), como en casos con CIS (Fig. 16) o con las distintas variedades de TCGTs., siendo los resultados completamente superponibles en ambos métodos.

En la presente Tesis hemos evaluado estas moléculas mediante métodos de Biología Molecular. En efecto, en relación con la proteína PCPH, hemos cotejado los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en el CIS y TCGTs (y también en testículos normales del grupo control), mediante la evaluación molecular a partir de tejidos congelados en el momento de la extirpación testicular, con ulterior extracción de proteínas para estudios de electroforesis y "western blot". De este modo hemos identificado dos bandas precisas de 43 y 27 kD para PCPH en la mayoría de los tumores estudiados.

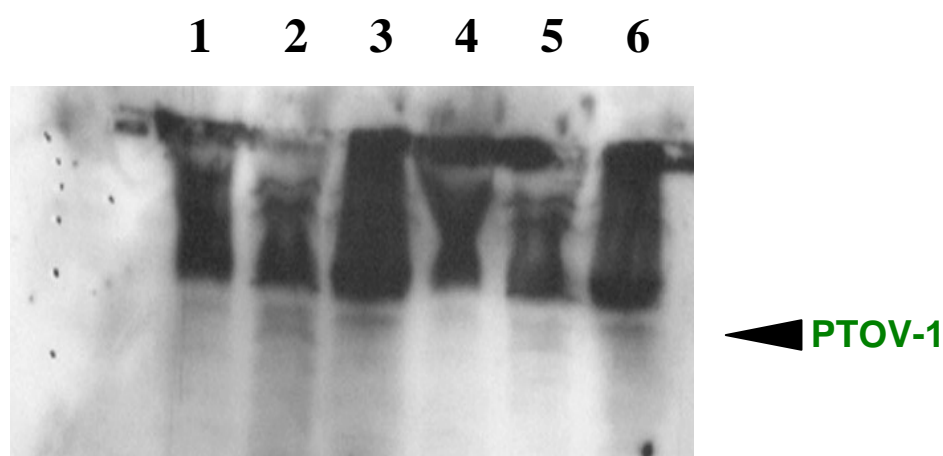
Inmunolectroforesis de PCPH en TCGTs.

Los carriles números 1 y 8 corresponden a un control positivo de placenta humana en la que siempre se expresa intensamente la forma normal de PCPH, con un peso molecular aproximado de 43 kD. Los carriles números 5, 6 y 9 corresponden a testículos normales obtenidos en autopsias, cuyo estudio histológico general de los tubos seminíferos y del intersticio no reveló alteraciones significativas, ni cambios autolíticos; en todos estos casos normales se evidencia una banda intensa de PCPH a nivel de 43kD. y no se ve la banda de

menor peso molecular. El resto de carriles corresponden a seminomas y TCGTs. no-seminomatosos y en ellos frecuentemente se identifica la banda alterada de PCPH de 27 kD, perfectamente inmunomarcada con el anticuerpo anti-PCPH.

En los TCGTs. también hemos evaluado por inmunoelectroforesis la expresión de la fracción 1 de la proteína del gen PTOV, y en algunos tumores hemos observado bandas reveladas con el anticuerpo anti-PTOV-1 (Fig. 8b).

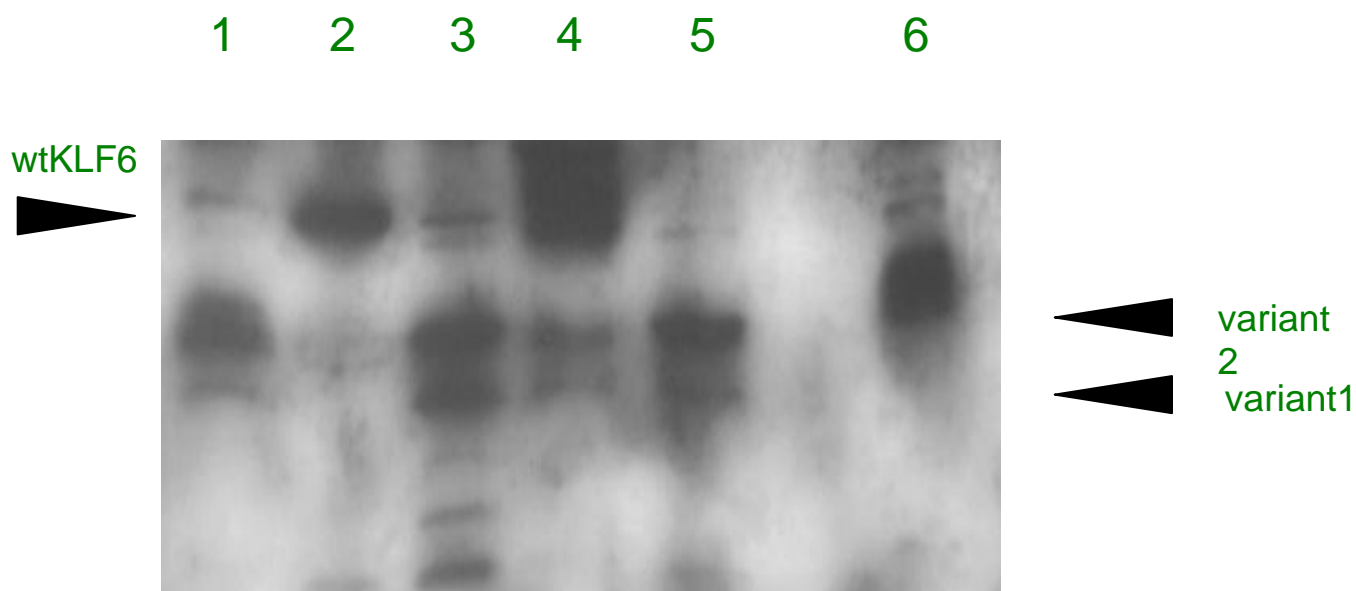
Inmunoelectroforesis de PTOV-1 en TCGTs.



Los datos inmunoelectroforéticos de PTOV-1 en TCGTs. permiten distinguir la forma normal salvaje de PTOV y algunas bandas de menor peso molecular que sugieren mutaciones o deleciones del gen de PTOV-1 y menos probablemente pudieran corresponder a fragmentos metilados. Los carriles 1 y 4 corresponden a testículos normales y el resto de carriles corresponden a cuatro TCGTs. no-seminomatosos y con varios componentes histológicos proliferantes. Dado que estos casos tenían un marcado grado de hemorragia y necrosis, aparece un fondo inespecífico; asimismo se observan bandas de alto peso molecular inespecíficas que corresponden a inmunoglobulinas circulantes, las cuales se acumulan en las áreas de hemorragia intratumoral. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio son superponibles a las bandas obtenidas en el estudios moleculares de PTOV-1 realizados en tejido prostático humano, concretamente en próstatas con neoplasia intraepitelial (PIN) y en carcinomas de próstata de bajo grado y de alto grado de la clasificación de Glisson (datos facilitados pro el Dr. Jaume Reventos, al analizar nuestro western blot, pero no incluidos en el presente estudio).

También en estudios de inmunolectroforesis hemos encontrado bandas salvajes y formas de bandas anormales cuando se explora la actividad molecular de KLF-6.

Inmunolectroforesis de KLF6 en TCGTs.



El carril 2 y 6 corresponden a tejido testicular humano normal (Grupo control) y los carriles 1, 3, 4 y 5 corresponden a TCGTs. no-seminomatosos de patrón mixto o combinado. Nótese varias variantes de menor peso molecular, correspondientes a las variantes 1 y 2 de KLF6 que difieren de la forma salvaje de esta proteína. Los casos del grupo control solo presentan la forma salvaje de KLF6.

Además, en la evolución por RT-PCR de KLF6 en TCGTs. hemos encontrado formas alternativas ("splicing" alternativo), que no están presentes en las muestra incluidas de testículos humanos normales (grupo control). Estos datos quedan más manifiestos cuando se calcula el cociente de KLF6 WT con respecto al KLF6 total; así, cuando este cociente sea más próximo a 1, tendremos una mayor proporción de formas normales de KLF6; por el contrario, cuanto más pequeño resulte el cociente, mayor será el número de variantes anormales de KLF6, lo cual ocurre en nuestros casos de TCGTs. en los que claramente predominan las formas anormales de KLF6, mientras que en los testículos del grupo control predominan las formas normales de KLF6. Se observa de una correlación entre una mayor

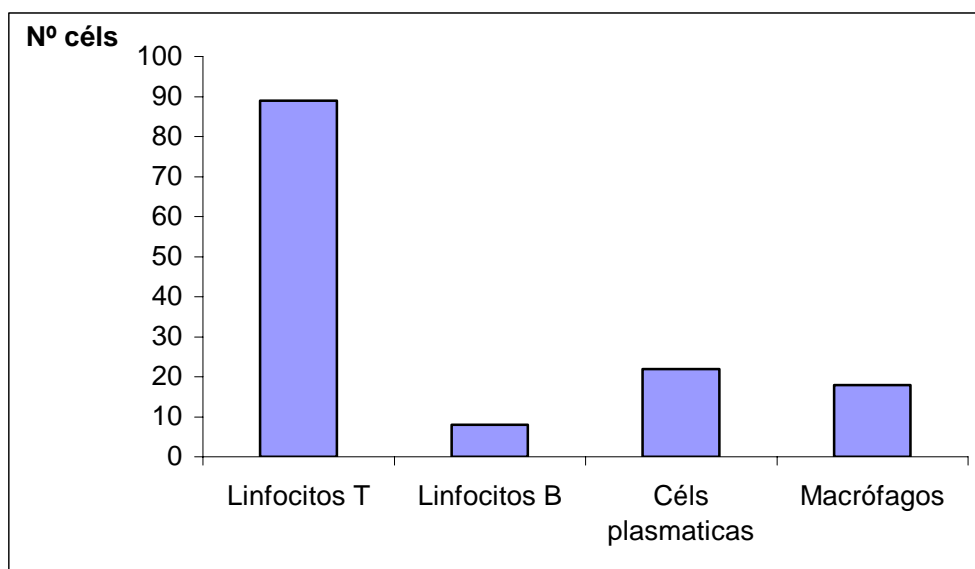
presencia de las variantes anormales de KLF6 en los TCGTs. que en los testículos normales (Fig.17).

7. Mecanismos de infiltración de las células del CIS y su transformación en un TCGTs.

Las células del CIS, cuando dan origen a un TCGT infiltrante, tienen que atravesar la lámina basal del tubo seminífero y penetrar las numerosas células y estructuras que forman la pared del tubo, incluyendo las células mioides peritubulares, la capa externa de fibroblastos peritubulares, las fibras elásticas, el colágeno y la matriz extracelular. La respuesta de la pared tubular a esta agresión de las células del CIS es multifactorial, pero puede concretarse en dos fenómenos fundamentales: 1) la degeneración de la lámina basal, células mioides y matriz extracelular y 2) la respuesta local de células inmunocompetentes, que se disponen alrededor de la pared tubular. En un primer estadio, la lámina basal se hace discontinua y a través de sus soluciones de continuidad penetran las células de CIS. Concomitante con esta capacidad infiltrativa, la pared peritubular presenta rarefacción de las fibras de colágeno y degeneración de la matriz extracelular, que adquiere un aspecto más mixoide; así mismo, se observan fenómenos de elastolisis y progresiva disminución de las células mioides peritubulares. Alrededor de estos tubos seminíferos con CIS y pared degenerada se van a disponer abundantes células inmunocompetentes (Fig. 18), las cuales, en principio atraviesan la pared peritubular y migran hacia el interior de los tubos seminíferos que contienen CIS, pero cuando las células tumorales alcanzan la pared peritubular, aumenta notoriamente el número de células inmunocompetentes se entremezclan con las células tumorales, sobre todo cuando el CIS se convierte en un tumor microinfiltrante en el intersticio testicular.

El estudio cuantitativo del inmunofenotipo de estas células inmunocompetentes dispuestas alrededor de los tubos con CIS demuestra una significativa mayor respuesta de linfocitos T CD 3 positivos que de linfocitos B CD 20 positivos y que de células plasmática kappa o lambda positivas, siendo muy escaso los macrófagos CD68 que se localizan en la pared de los tubos seminíferos con CIS. El número de linfocitos T CD4 positivos presentes en la pared de los tubos con CIS es significativamente mayor que el número de linfocitos T CD8 positivos.

Cuantificación de células inmunocompetentes en la pared de los tubos seminíferos con CIS



Los datos están expresados como número total de linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos infiltrantes por sección tubular con CIS.

Fig. 1. Distribución de microvasos en los diferentes tipos de TCGTs.

- a) Seminoma que contiene un alto número de capilares.
- b). Detalle del inmunomarcaje del citoplasma de las células endoteliales en un capilar dilatado de un seminoma.
- c) Seminoma con un bajo número de capilares.
- d) Seminoma con abundantes capilares asociados con vénulas dilatadas y vasos de contorno irregular.
- e) Tumor del seno endodérmico que presenta un vaso de pequeño tamaño, sugestivo de vena, que muestra una delgada pared muscular, marcada con intensa expresión de alfa-actina muscular.
- f) Carcinoma embrionario con patrón papilar. Nótese la distribución irregular de microvasos que centran las formaciones papilares.
- g) Tumor del seno endodérmico de patrón sólido altamente vascularizado con evidentes capilares y vénulas de contorno irregular.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-d,f,g).

Anticuerpo anti-alfa-actina muscular y hematoxilina (e).

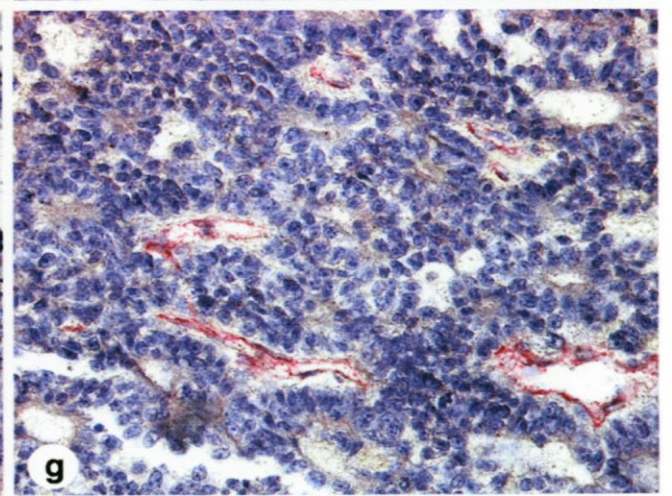
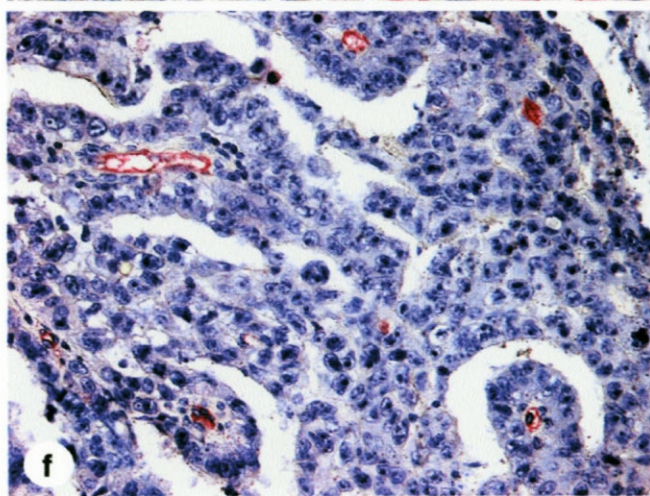
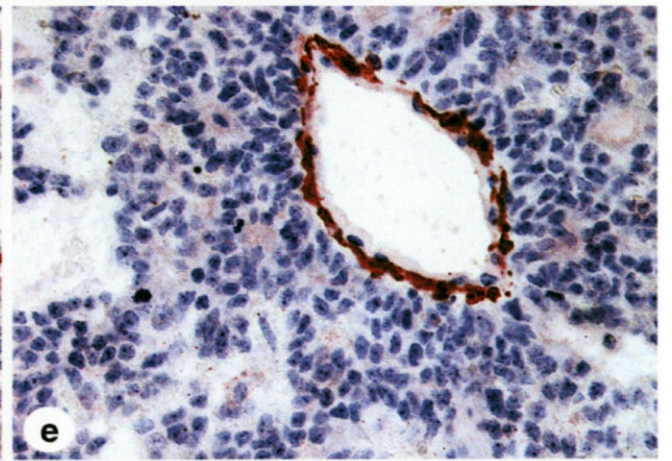
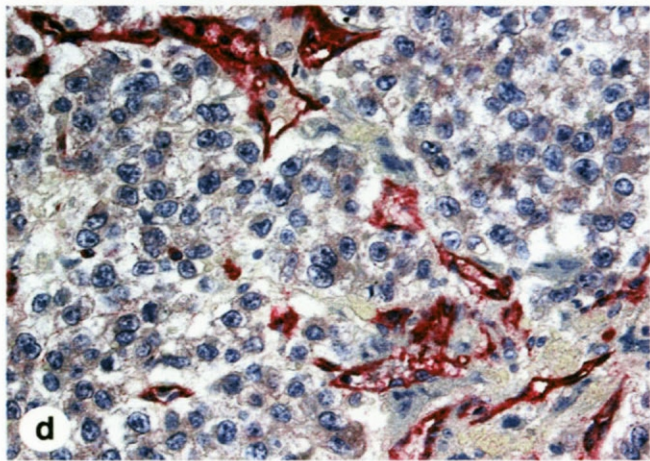
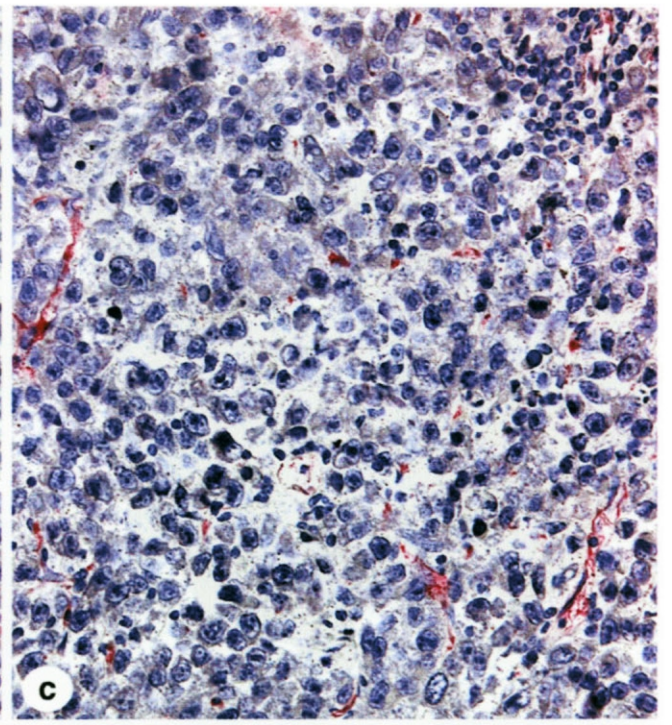
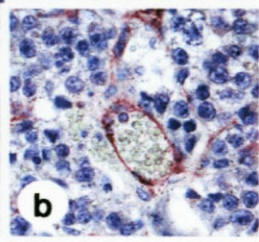
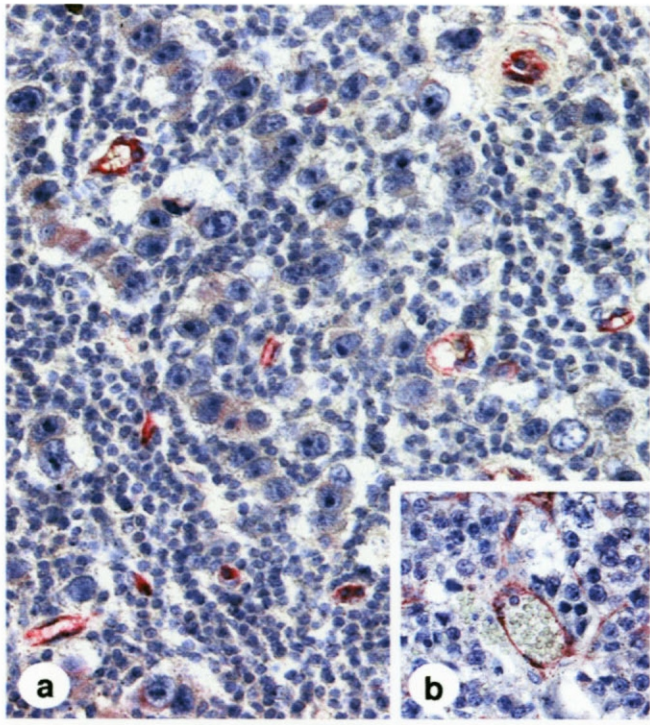


Fig. 2. Patrones angiogénicos en TCGTs. no-seminomatosos

- a)** Imagen panorámica de un carcinoma embrionario con amplias áreas de necrosis
- b)** TCGTs. mixto, con patrón de tumor del seno endodérmico y de carcinoma embrionario de predominio del patrón glandular, con irregular distribución de los vasos sanguíneos. Nótese la presencia de vasos venosos de pequeño calibre con pared muy irregular.
- c)** Papila vascular de Shiller-Duval, centrada por un vaso dilatado, y área sólida adyacente avascular en un tumor del seno endodérmico.
- d)** Nódulo de carcinoma embrionario de patrón sólido y carente de neovascularura. En el tejido conjuntivo, por fuera de la pared desmoplásica se observan vasos capilares neoformados
- e)** Imagen panorámica de un nódulo tumoral sólido, densamente celular y aparentemente encapsulado, correspondiente a un tumor del seno endodérmico, bien delimitado
- f)** Patrón tubular y sólido de un tumor del seno endodérmico pobremente vascularizado
- g)** Tumor del seno endodérmico de patrón glandular y pseudopapilar con evidente angiogénesis

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-g).

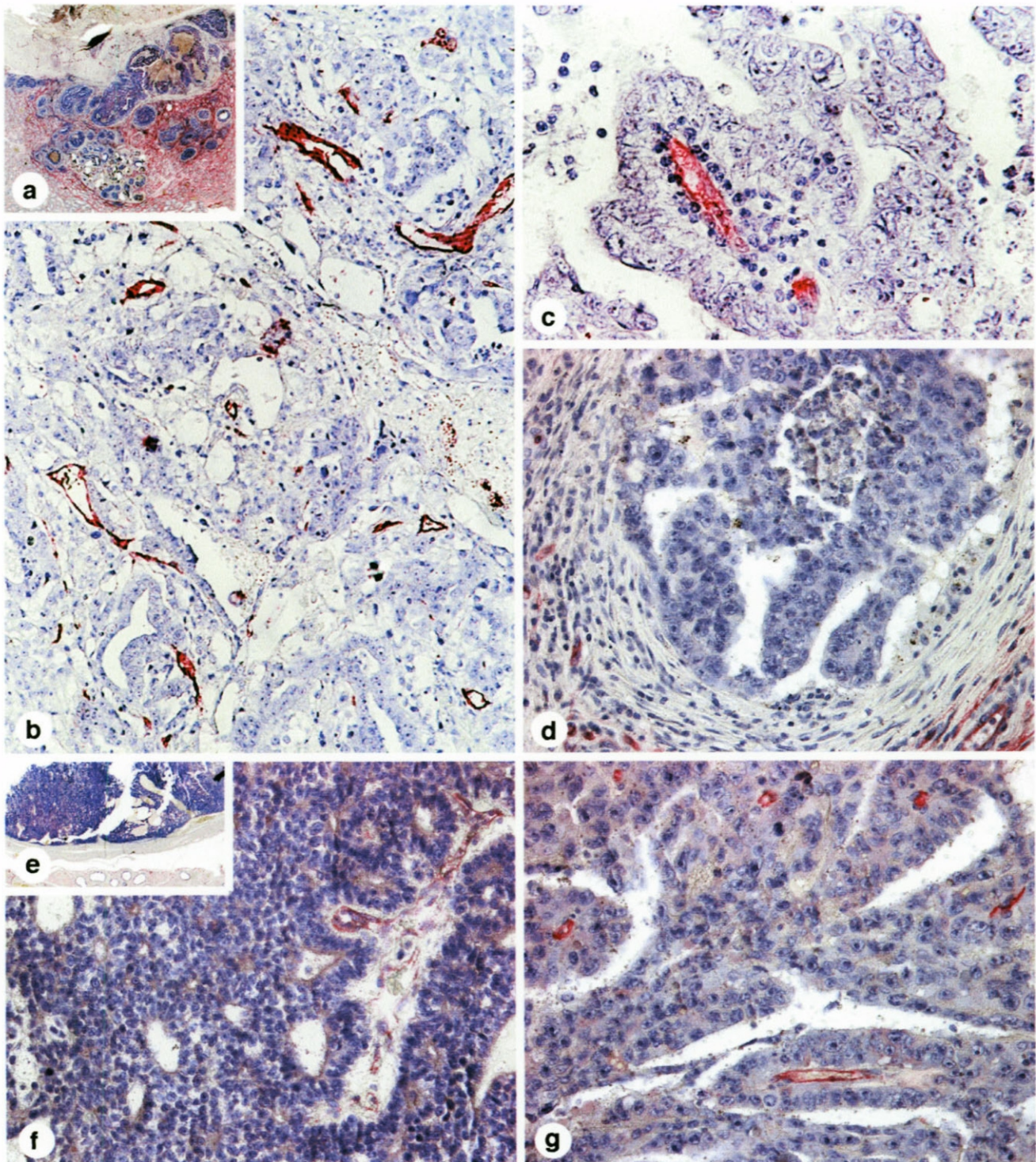


Fig. 3. Angiogénesis asociada a necrosis y tejido de granulación en diferentes tipos histológicos de TCGTs.

- a)** Imagen panorámica de un seminoma que muestra la interfase de un nódulo tumoral y un parénquima testicular atrófico. Destaca la extensa área necrótica en la vecindad de la masa tumoral, en la que se aprecia una distribución heterogénea de los vasos.
- b)** Carcinoma embrionario con escaso desarrollo vascular, rodeado por un área de necrosis que contiene un tejido de granulación con intensa angiogénesis.
- c)** Amplia cicatriz postnecrótica en la que se evidencia un comienzo de proliferación de células endoteliales y microvasos ; adyacentemente se observan células de seminoma con citoplasma claro y mal definido, sugerente de cambios isquémicos.
- d)** Tejido de granulación situado en la capa externa de la albugínea, en el que no se visualizan células malignas. En la túnica vascular de la albugínea testicular se observan yemas angiogénicas adyacentes a un tumor del seno endodérmico parcialmente necrosado.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-d).

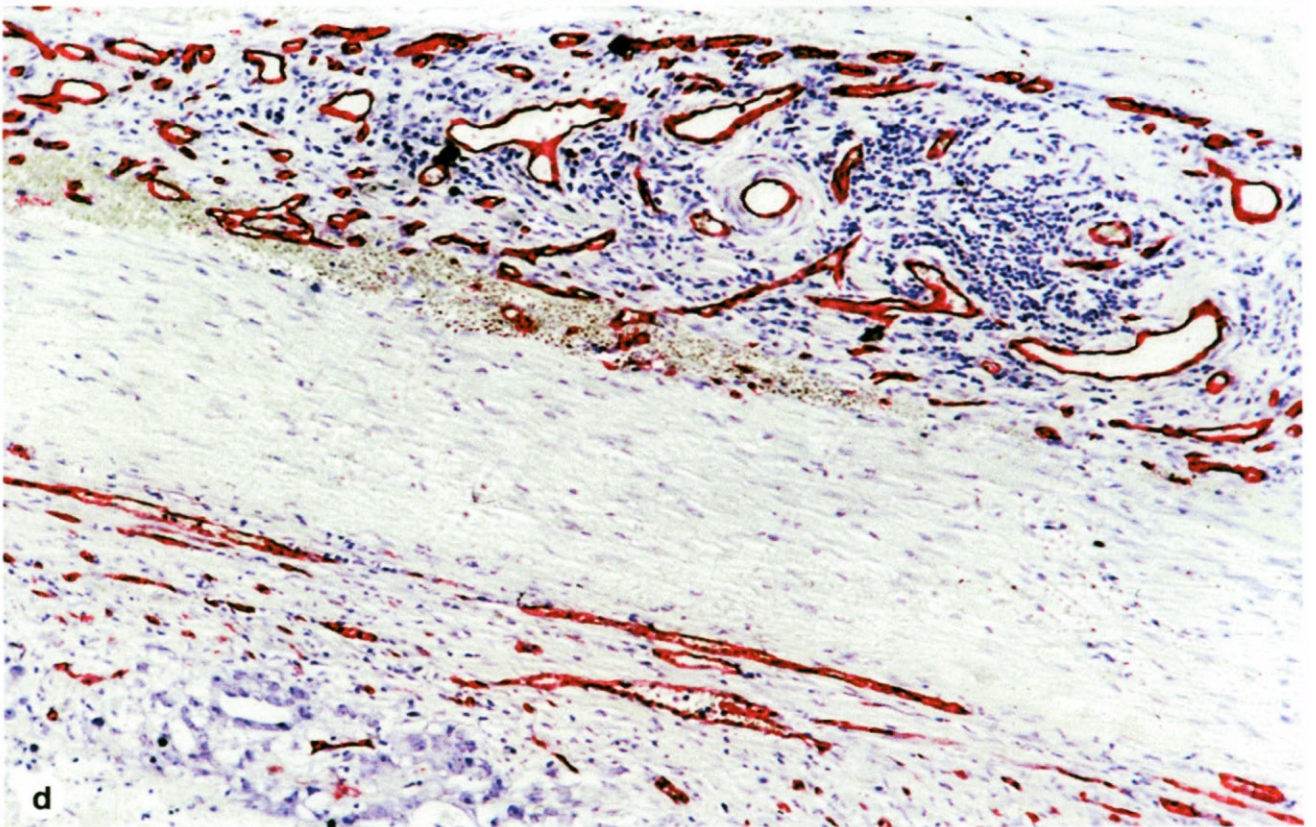
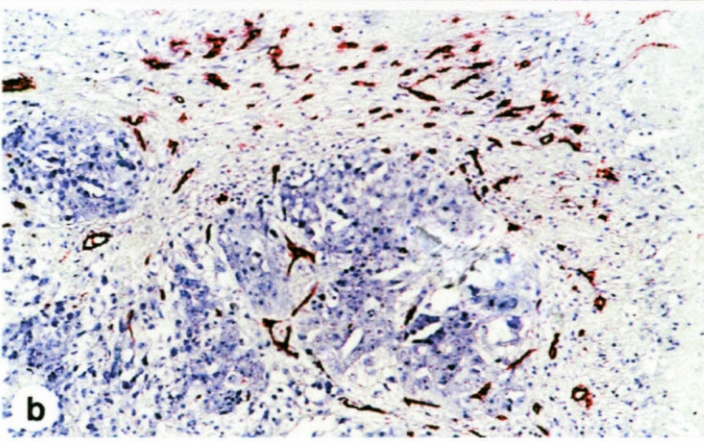
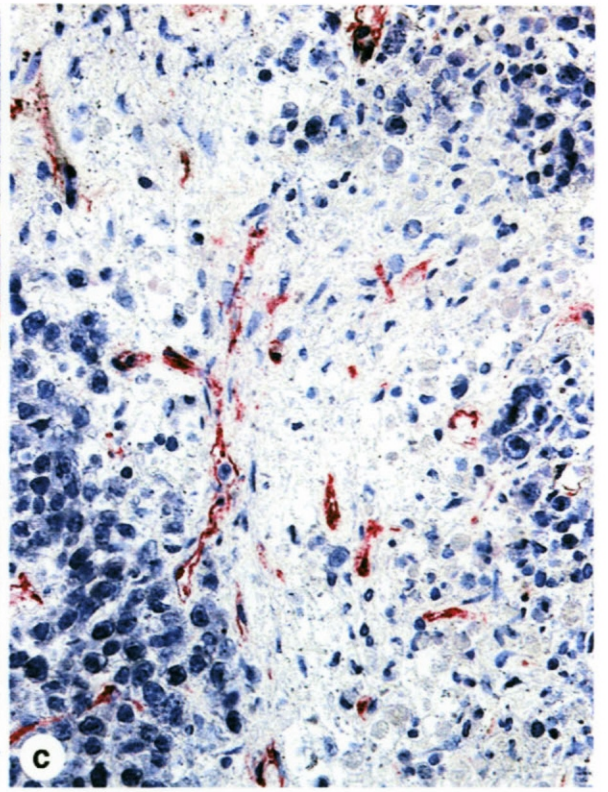
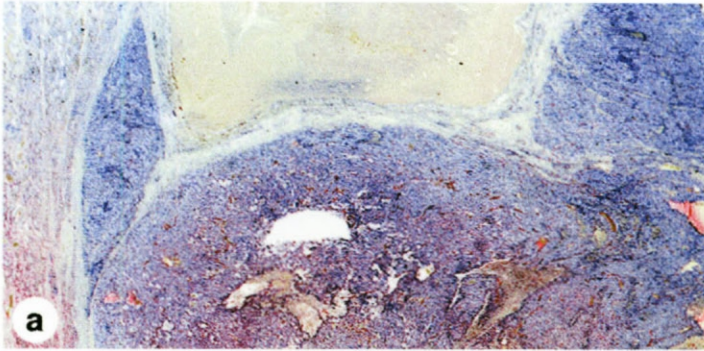


Fig. 4. Cambios isquémicos en los TCGTs.

- a)** Carcinoma embrionario de patrón glandular con escaso desarrollo vascular, asociado a área necrótica con comienzo de angiogénesis.
- b)** Detalle del mismo caso en el que se observan vasos muy dilatados, de contorno irregular, escasos microvasos y amplias áreas avasculares de necrosis reciente.
- c)** Proliferación de capilares, células endoteliales aisladas y formación de angiotubos, asociados a intensos infiltrados linfo-plasmocitarios en un tumor del seno endodérmico con signos de degeneración isquémica.
- d)** Seminoma con proliferación de células endoteliales aisladas e inmunomarcadas con anti-CD34, e inicio de permeabilización de luces en los capilares neoformados.
- e)** Cicatriz desmoplásica con evidente proliferación de células endoteliales aisladas inmunomarcadas y neoformación de vasos capilares. En la vecindad existen células de seminoma parcialmente degeneradas.
- f)** Vasos venosos aberrantes en un seminoma necrosado.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-f).

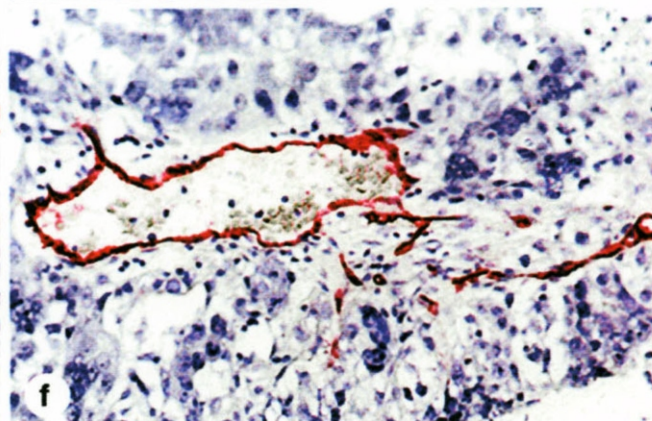
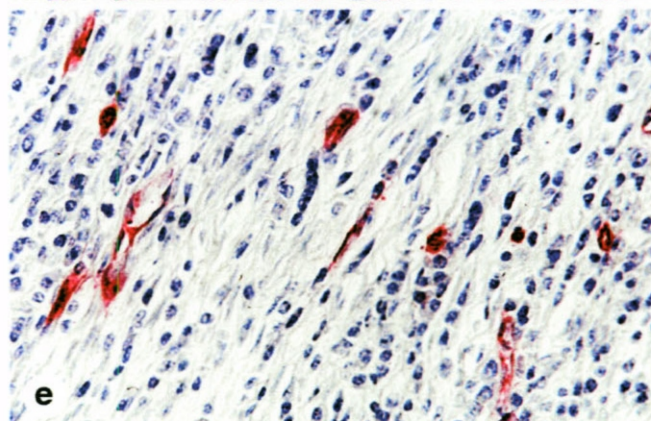
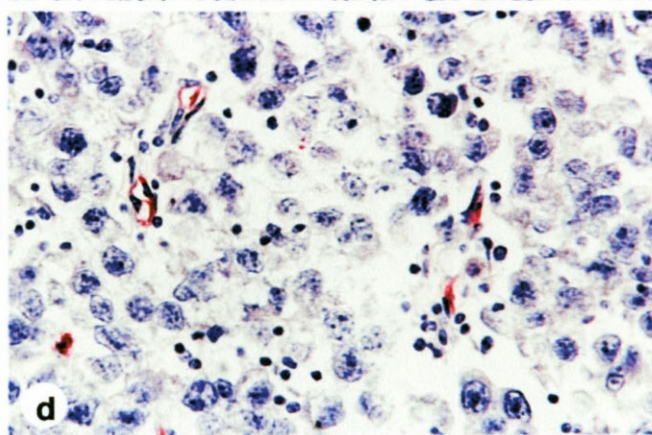
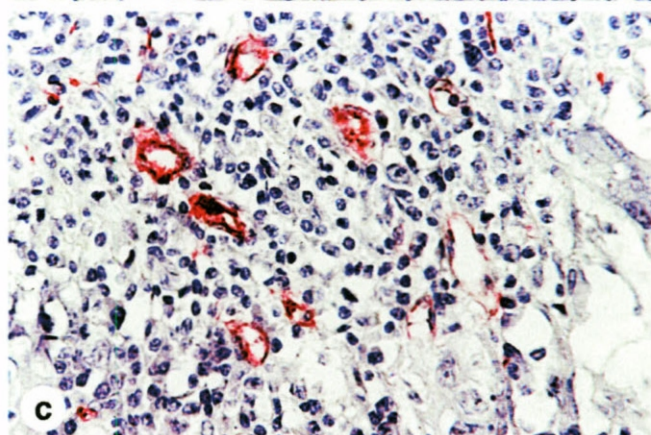
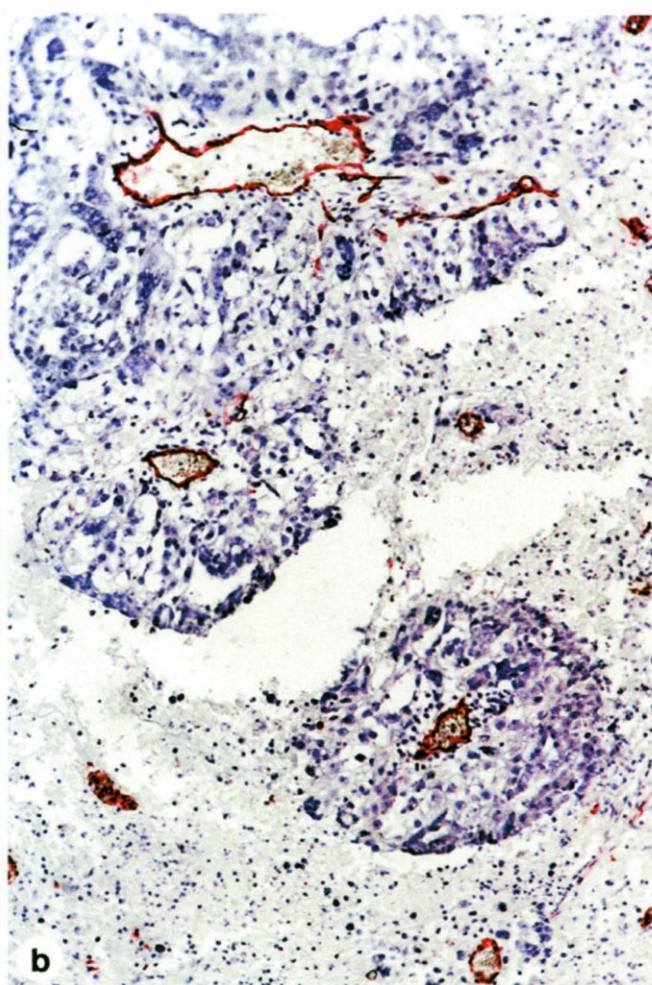
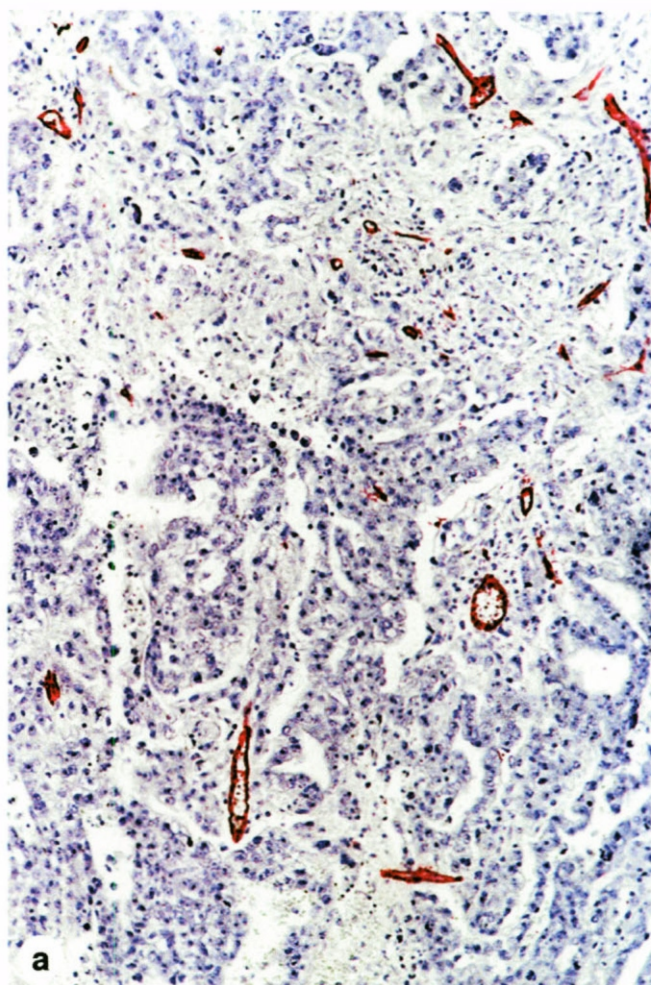
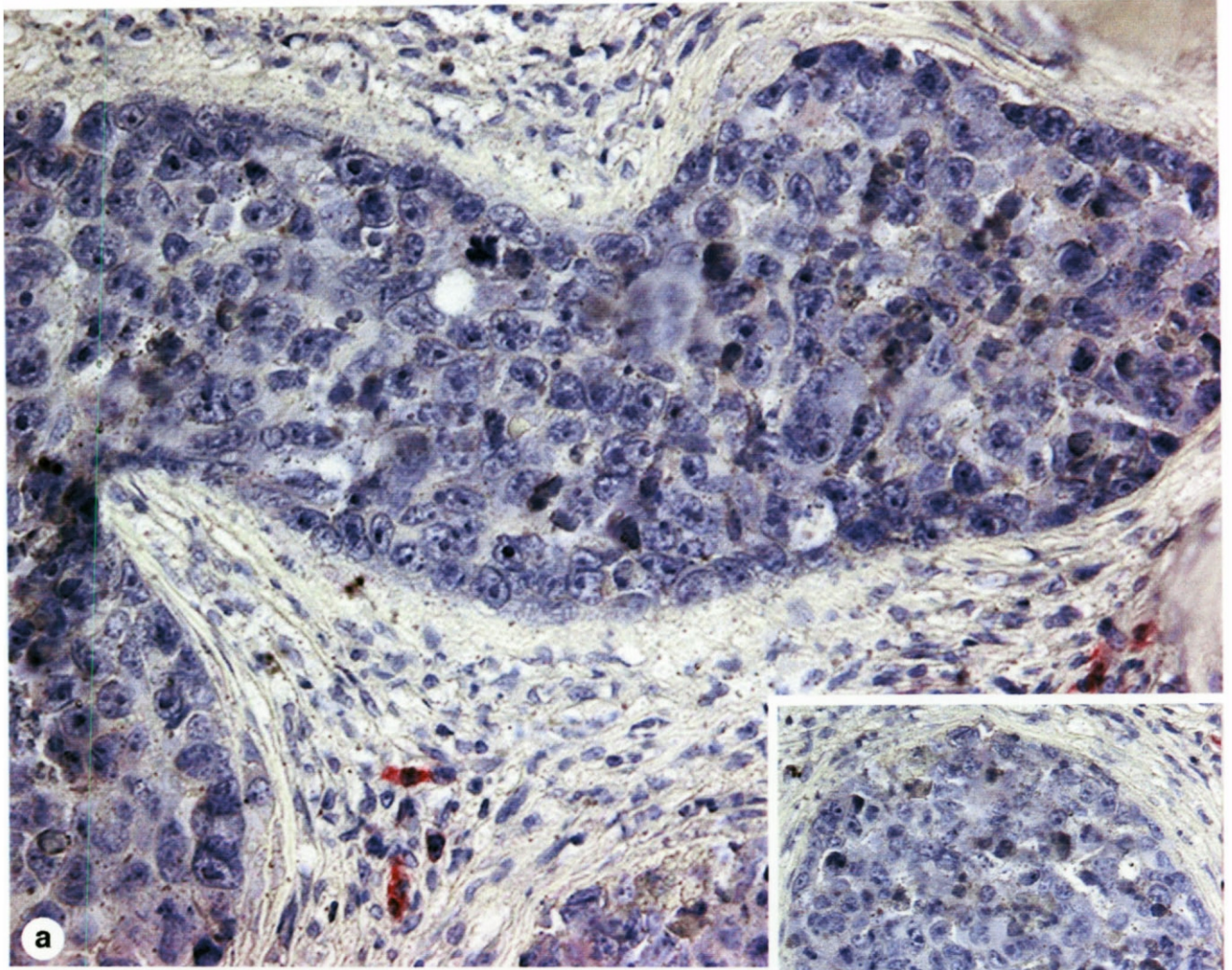


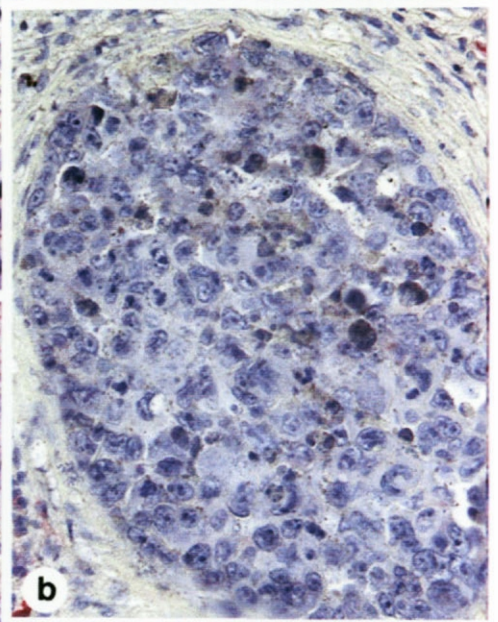
Fig. 5. Microvasos en relación con TCGTs. intratubulares

- a)** Neoplasia intratubular indiferenciada de células germinales, con posible diferenciación hacia carcinoma embrionario y con completa ausencia de microvasos.
- b)** Nódulo tumoral de grandes dimensiones, probablemente aún un seminoma intratubular, en el que no se evidencian células endoteliales ni formación de microvasos capilares.
- c)** Nódulo de grandes dimensiones y con intensa angiogénesis.

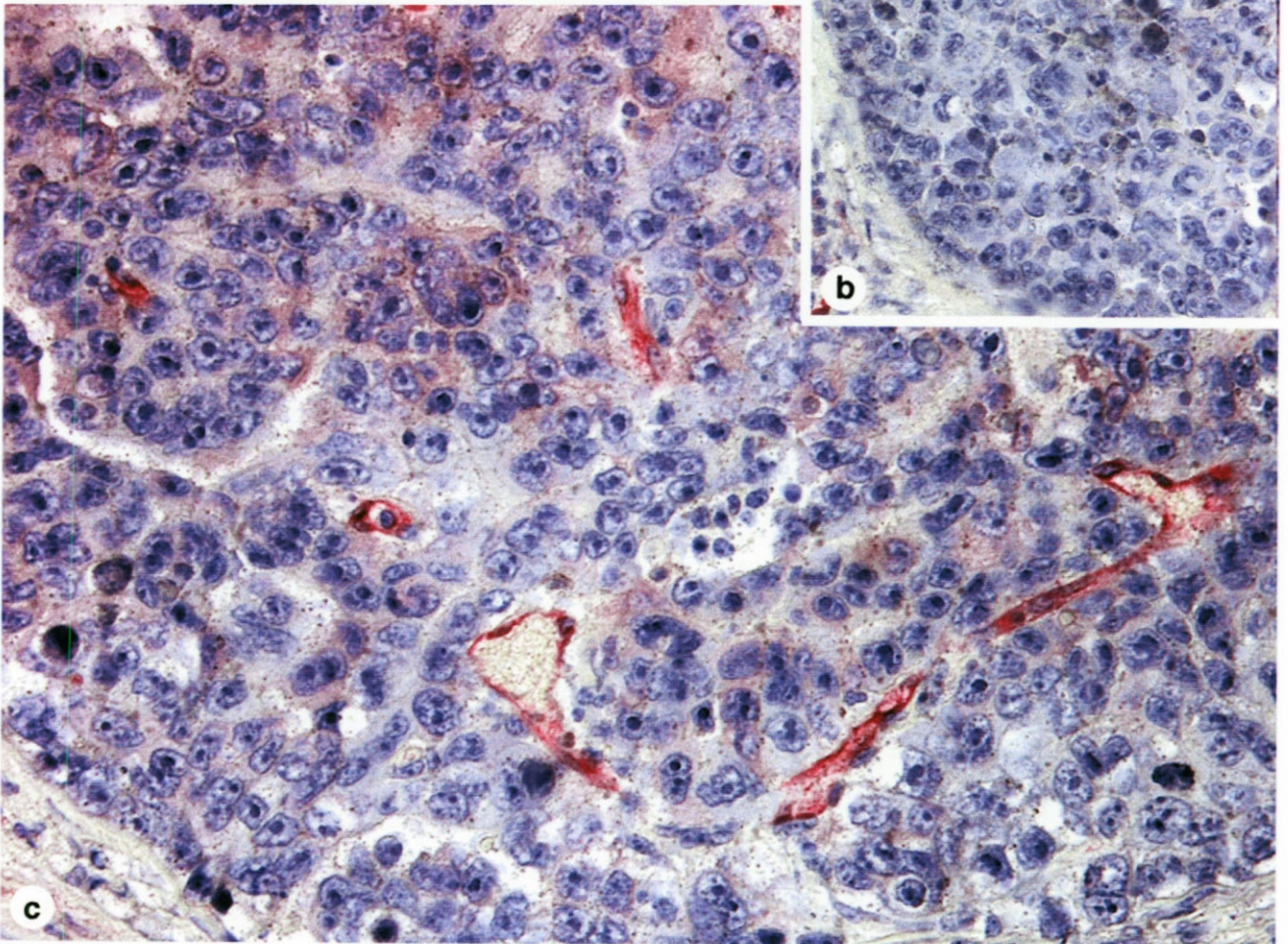
Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-c).



a



b



c

Fig. 6. Inicio de angiogénesis en seminomas intratubulares

a) CIS y neoplasia intratubular indiferenciada de células germinales. Los tubos seminíferos que contienen CIS muestran ausencia de angiogénesis; mientras que, los tubos dilatados con tumor intratubular presentan una pared peritubular engrosada avascular, con un solo capilar intratubular.

b) Nódulo tumoral con una gran proliferación de células germinales indiferenciadas. Es evidente una marcada angiogénesis en la periferia y en el centro del nódulo tumoral.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a y b)

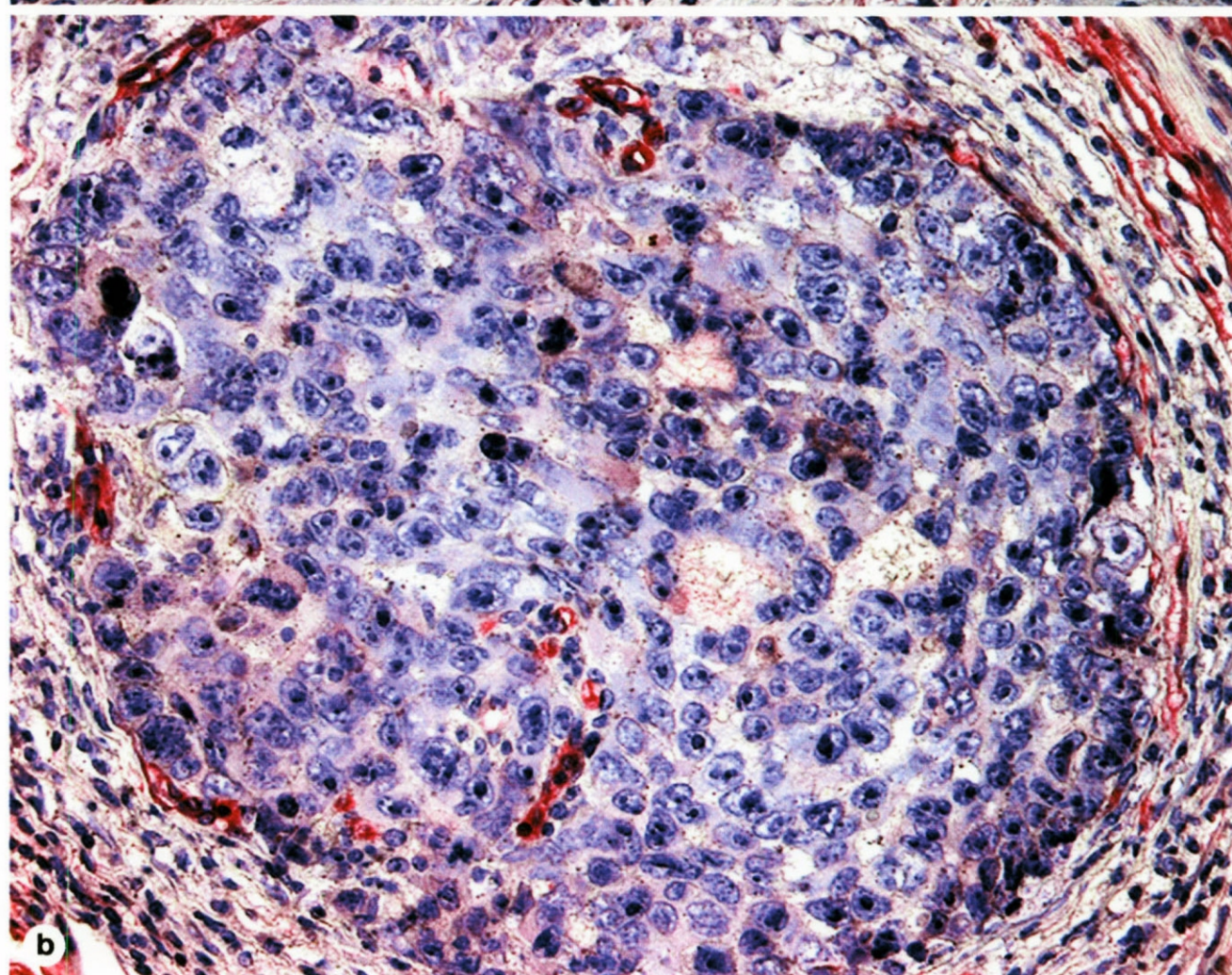
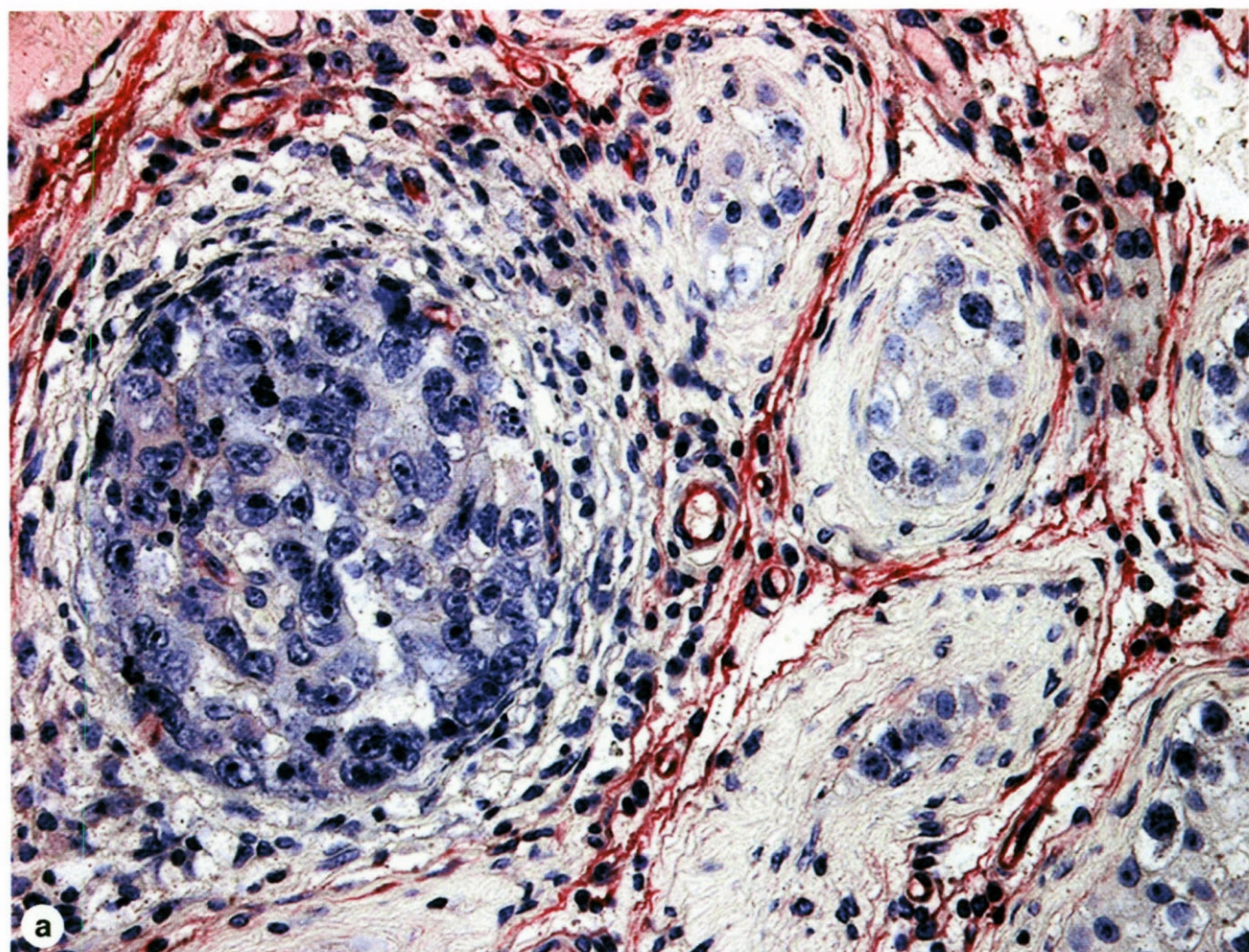


Fig. 7. Relación entre la angiogénesis y los infiltrados linfoides en los TCGTs.

- a)** Se observan células de seminoma infiltrante asociadas a un alto número de microvasos y a una importante infiltración de linfocitos. Destaca que los linfocitos se disponen en contacto íntimo con las células tumorales y con los microvasos neoformados.
- b)** Zona periférica de un seminoma infiltrante que presenta una profusa angiogénesis en los tabiques conjuntivos, asociados con abundante infiltración de células linfoides.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-b)

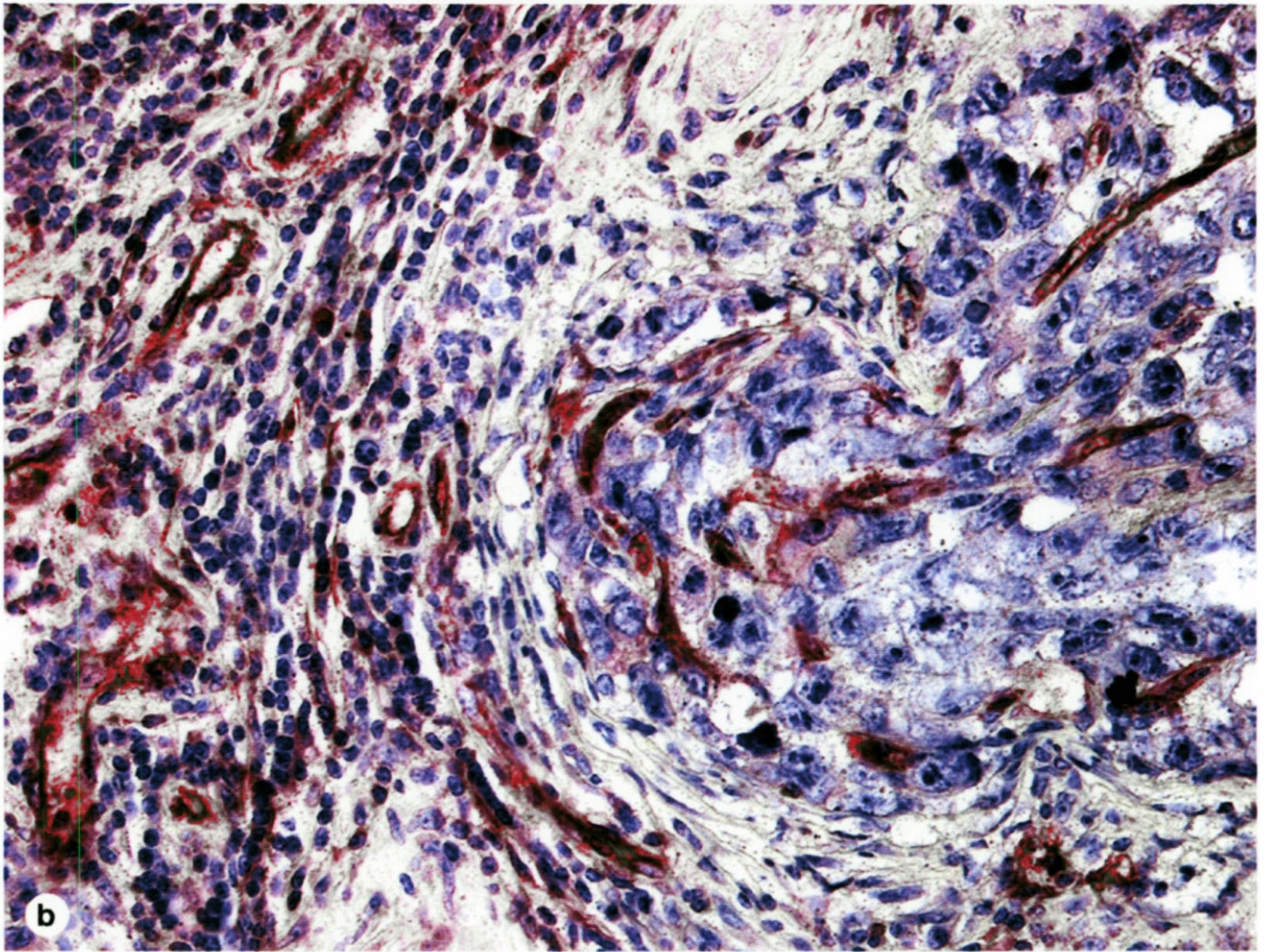
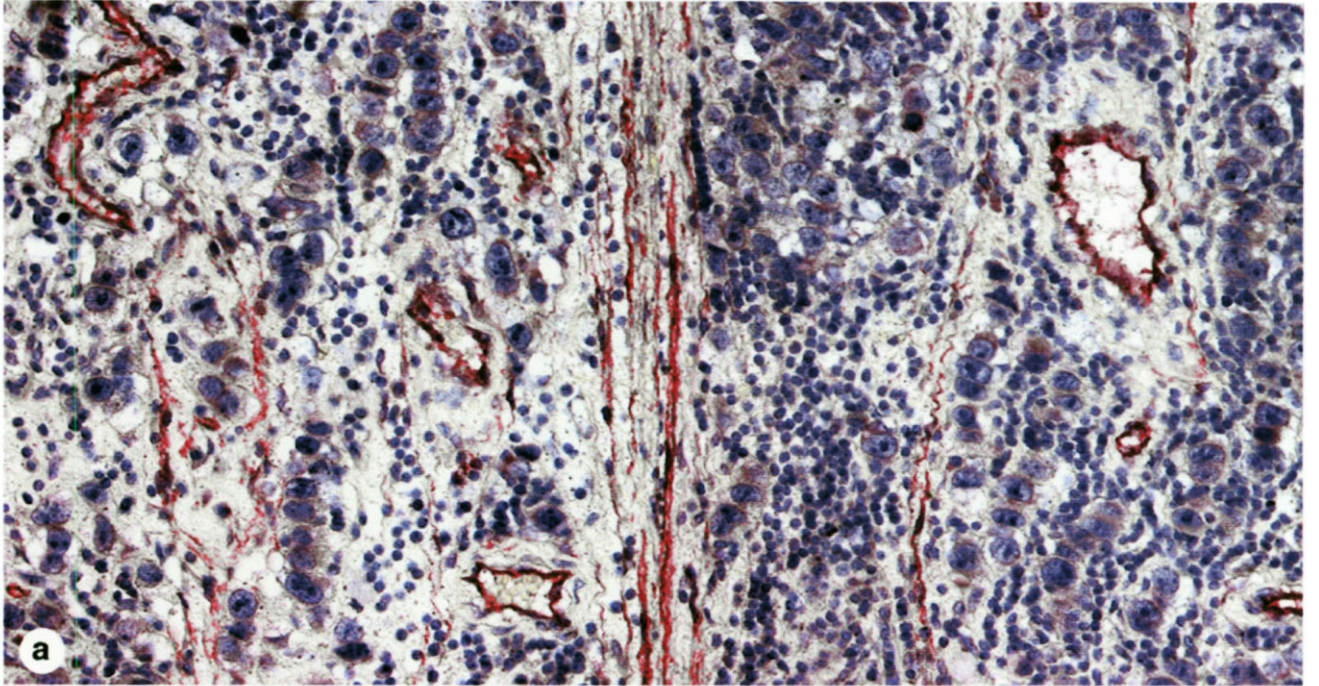


Fig. 8. Relación entre la angiogénesis y los infiltrados linfoides en los TCGTs.

- a) Nódulo linfoide en un seminoma que muestra formación de microvasos en la interfase de la corona linfocitaria folicular con las células tumorales adyacentes.
- b) Seminoma en el que se evidencia una migración de linfocitos a través de la pared de los vasos intratumorales.
- c) Tabique conectivo-vasculares con abundantes células inmunocompetentes perivasculares y con evidente reacción angiocéntrica. Seminoma testicular.
- d) Detalle de inicio de angiogénesis asociado a infiltración linfocitaria en un seminoma con signos de necrobiosis.
- e) Acúmulos irregulares de linfocitos T CD8+ dispuestos en el tejido conjuntivo intersticial de un seminoma.
- f) Presencia de linfocitos T CD4+ en los tabiques conectivos y entre las células tumorales de un seminoma.
- g) Masa irregular de linfocitos en la que existe una intensa angiogénesis, si se compara con la pobre microvasculatura del seminoma adyacente.
- h) Destaca la intensa proliferación de células endoteliales en el interior del nódulo linfoide. En la periferia se observan capilares neoformados en el seno de un seminoma con importante infiltración de linfocitos.

Anticuerpo anti-CD34 y hematoxilina (a-d y g,h).

Anticuerpo anti-linfocito T CD8+.y hematoxilina (e).

Anticuerpo anti-linfocito T CD4+ y hematoxilina (f).

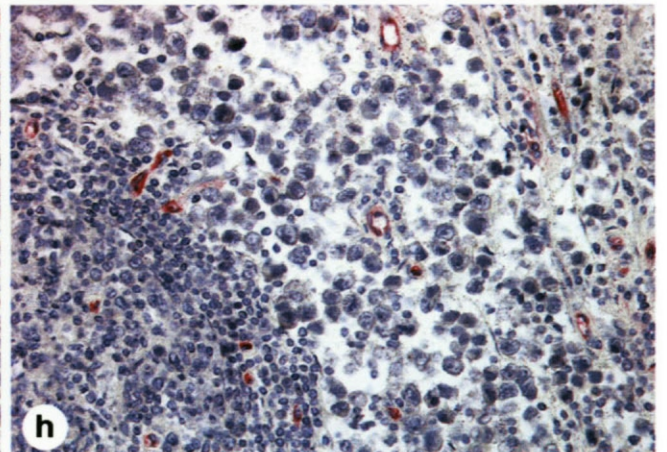
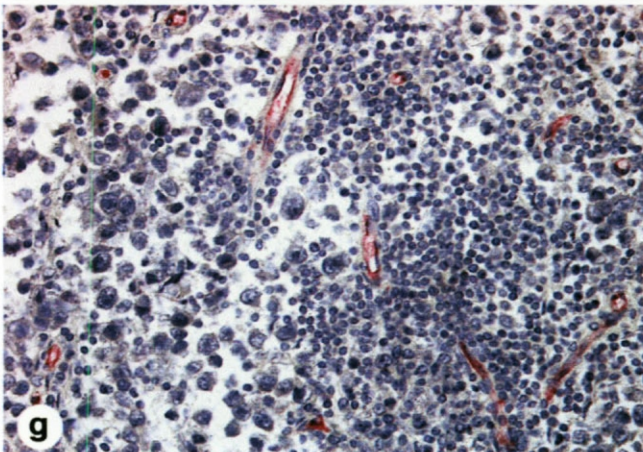
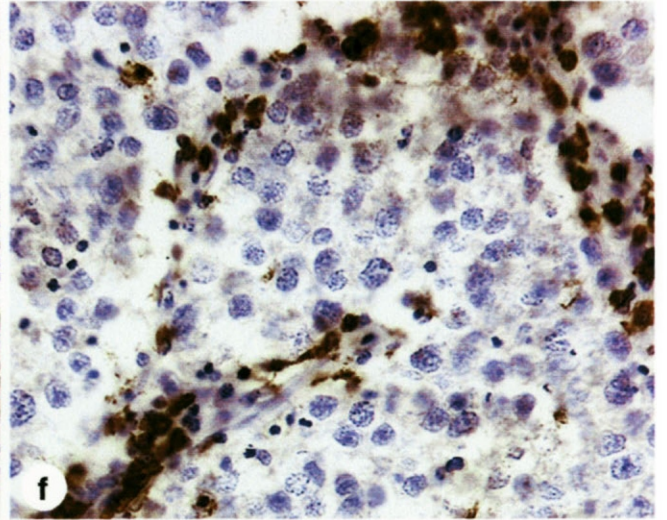
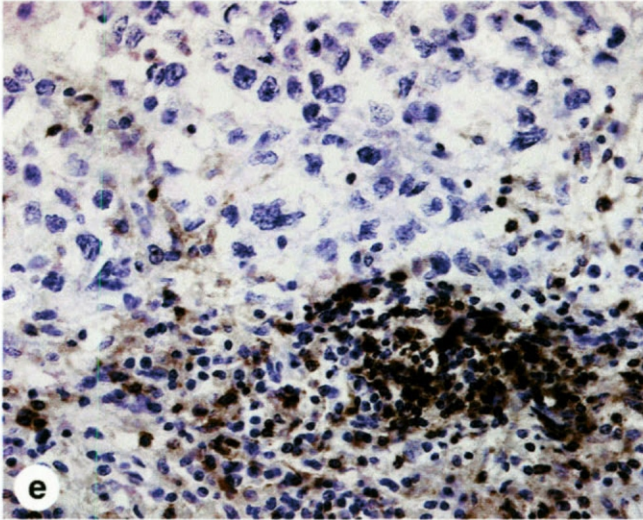
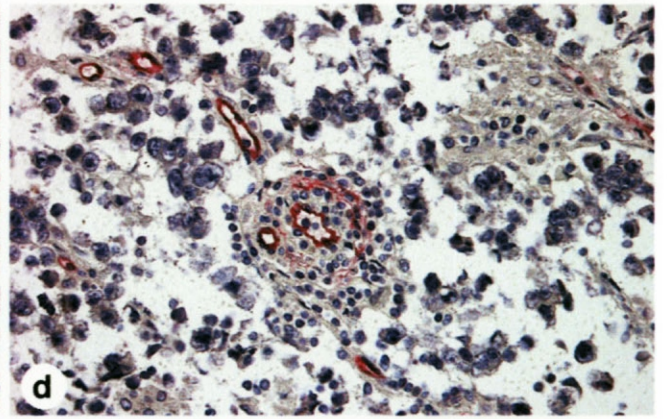
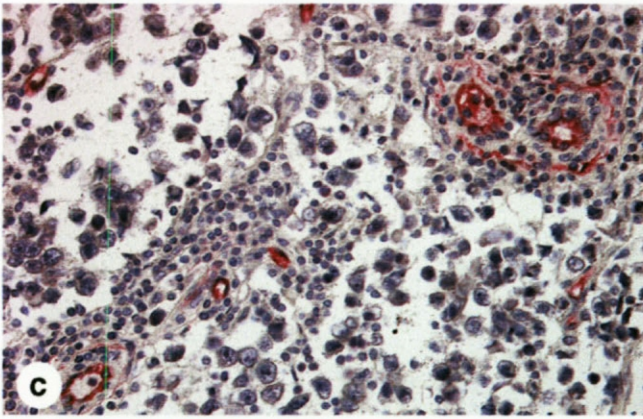
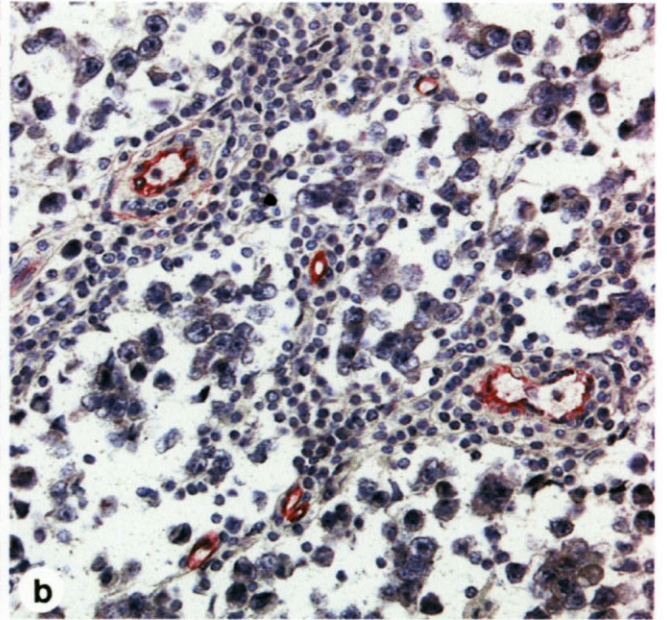
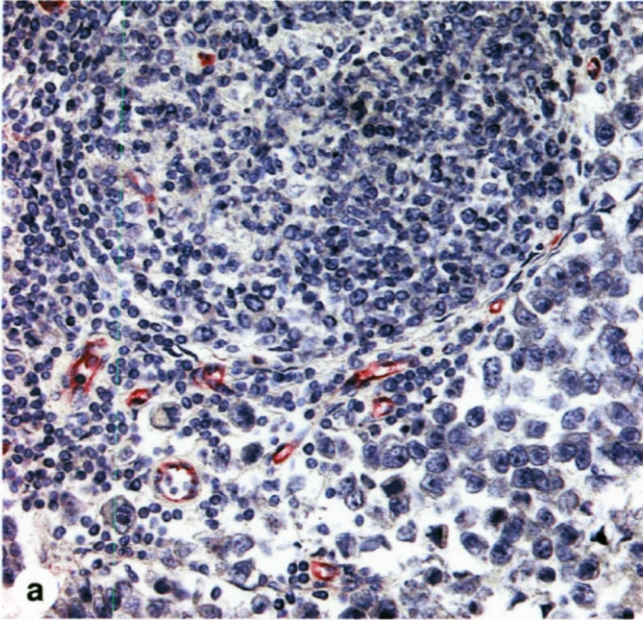


Fig. 9. Expresión de diferentes receptores de VEGF en TCGTs.

- a)** Seminoma con intensa expresión del receptor VEGF-Flt-1 en las células tumorales y también en el endotelio (flecha) de los capilares neoformados.
- b)** Sección seriada del mismo seminoma visto en la figura a. El receptor VEGF-Flt-4 se expresa en las células germinales tumorales y en las células de los microvasos proliferantes (flecha).
- c)** Sección seriada del mismo seminoma visto en la figura a. Tanto las células tumorales, como las células endoteliales de los microvasos (flecha) son positivas para el receptor VEGF-Flk-1.

Anticuerpo anti-VEGF-Flt-1.y hematoxilina (a).

Anticuerpo anti-VEGF-Flt-4 y hematoxilina (b).

Anticuerpo anti-VEGF-Flk-1.y hematoxilina (c).

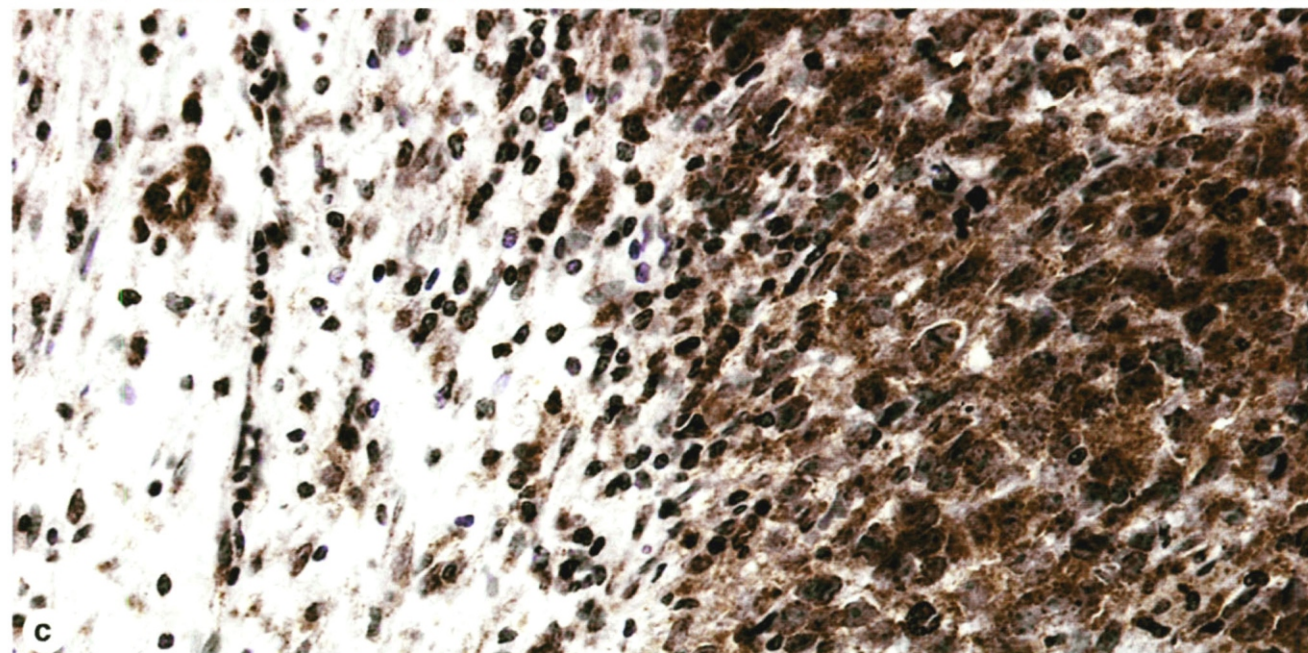
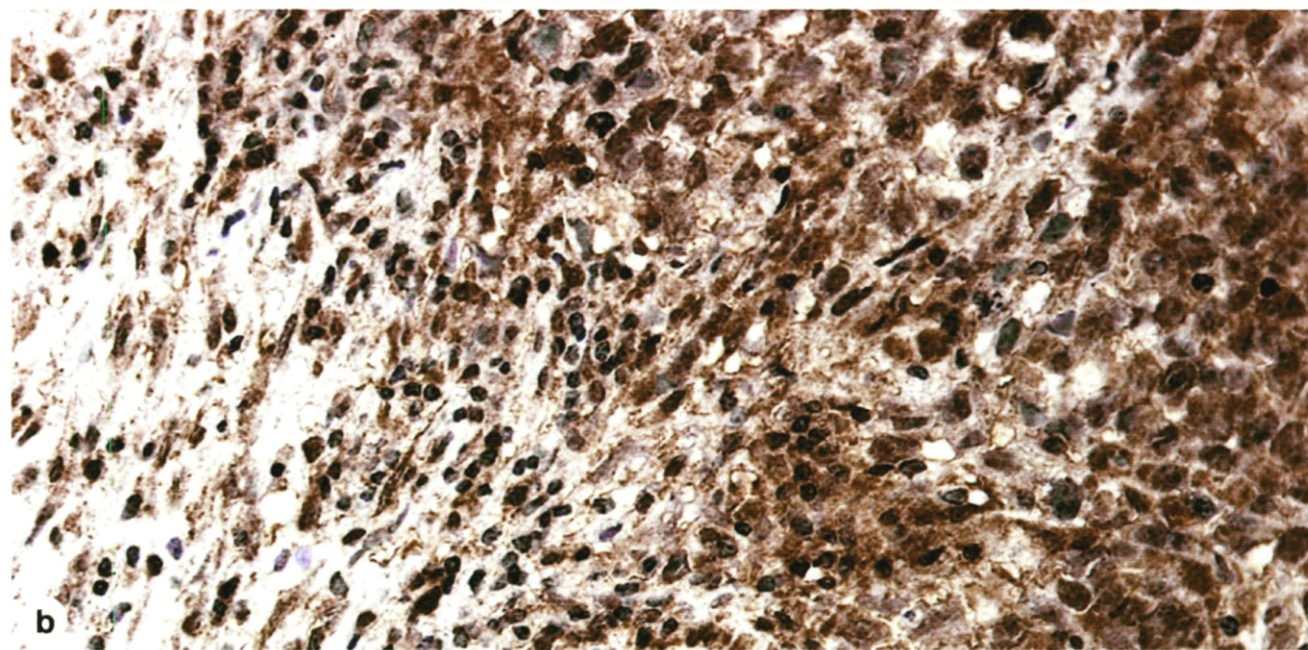
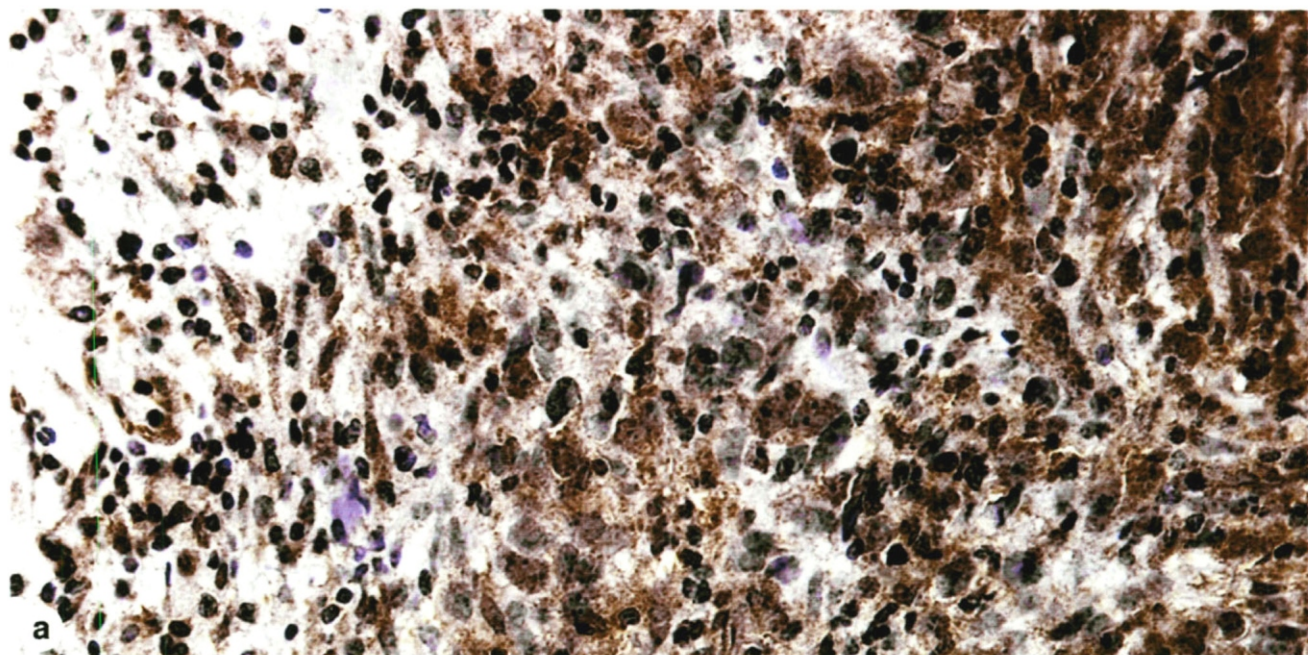


Fig. 10. Expresión de PCPH en seminomas y CIS

- a)** Intenso inmunomarcaje con anti-PCPH en el citoplasma perinuclear de todas las células del seminoma. Nótese trazas de positividad en el citoplasma de las células endoteliales de la arteriola del tabique tumoral.
- b)** Patrón lineal de membrana y granular perinuclear característico de la expresión de PCPH
- c)** Robusta tinción inmunohistoquímica con anti-PCPH en el citoplasma de las células del seminoma. Destaca el marcaje virtual de los linfocitos peritumorales.
- d)** Células muy pleomórficas de un seminoma testicular con una disminución significativa de la intensidad de tinción con anti-PCPH.
- e)** Tubo seminífero atrófico con CIS. Las células malignas presentan una intensa inmunotinción de PCPH en el citoplasma. Destaca la ausencia de tinción de fondo inespecífica en la pared peritubular intensamente colagenizada.
- f)** Tubo seminífero muy dilatado ocupado por abundantes células de seminoma intratubular, la cuales producen una dilatación, adelgazamiento y parcial degeneración de la pared peritubular.
- g)** Seminoma intratubular en tubo con degeneración completa de su pared y abundantes infiltrados linfoides. Nótese la salida de células tumorales a través de soluciones de continuidad de la membrana basal tubular.

Anticuerpo anti-PCPH y hematoxilina (a-g).

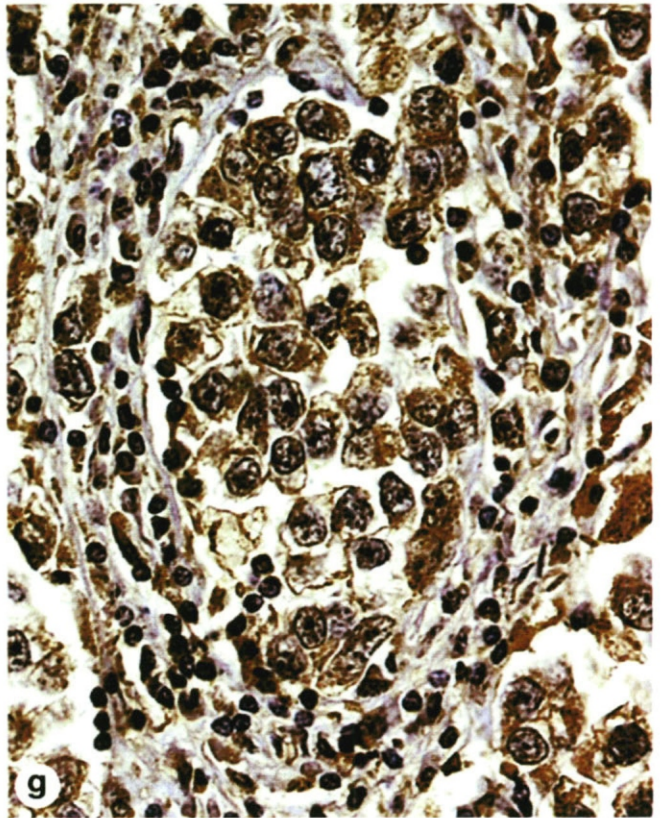
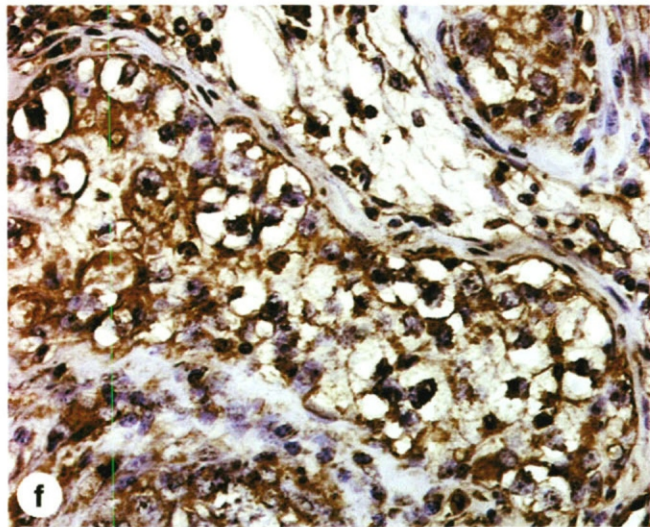
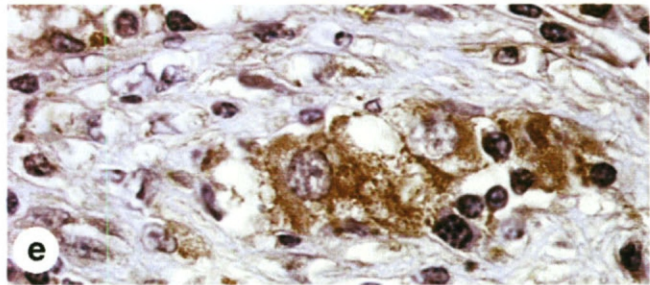
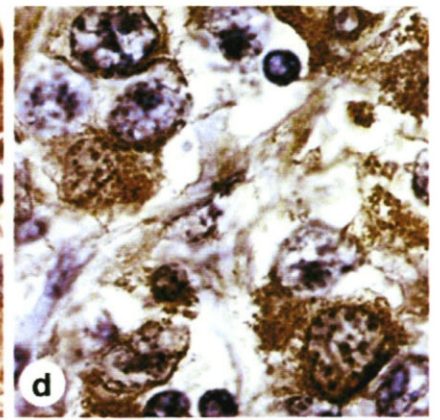
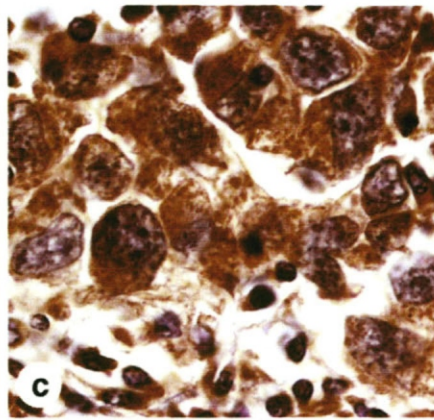
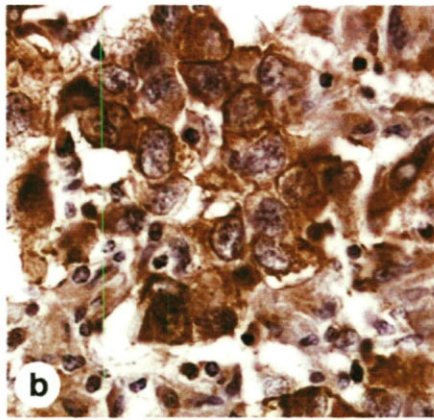
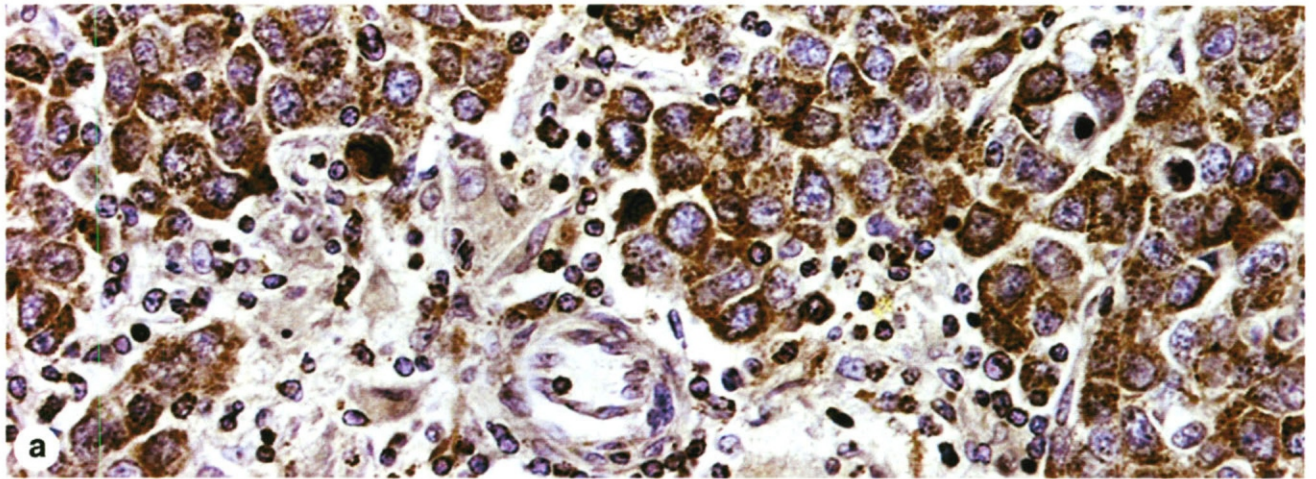


Fig. 11. Expresión de PCPH en el carcinoma embrionario y en el tumor de seno endodérmico

- a) Intensa expresión en el componente glandular de un carcinoma embrionario.
- b) Detalle de la figura anterior con evidente inmunoexpresión de PCPH en el glicocáliz glandular.
- c) Áreas proliferativas de epitelio glandular desdiferenciado en un carcinoma embrionario con menor expresión de PCPH.
- d) Patrón sólido con células de carcinoma embrionario inmaduras que siguen mínima expresión de PCPH si se compara con el epitelio glandular.
- e) Cuerpo embriode con intensa expresión de PCPH en las células de revestimiento del componente embrionario y extraembrionario.
- f) Vesícula extraembrionaria de un cuerpo embriode revestido por un epitelio plano con trazas de inmunotinción de PCPH.
- g) Detalle del caso anterior, en donde se comprueba marcaje de PCPH en el componente embrionario y extraembrionario.
- h) Componente glandular y sinusal de un tumor de seno endodérmico con mínima expresión de PCPH.
- i) Áreas sólidas y edematosas de un tumor del seno endodérmico compuesto por células fusiformes que contienen trazas de marcaje de PCPH.
- j) Glicocáliz intensamente marcado con anti-PCPH en el componente glandular de un tumor del seno endodérmico.
- k) Células monstruosas de sincitiotrofoblasto en un TCGT combinado que muestran un intenso marcaje con anti-PCPH.

Anticuerpo anti-PCPH y hematoxilina (a-k).

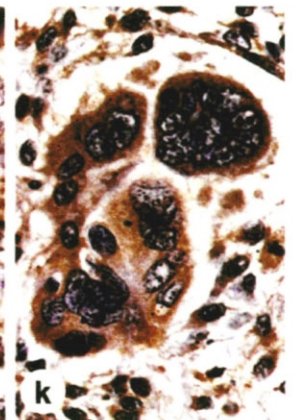
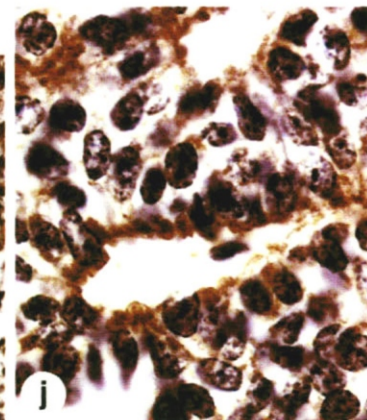
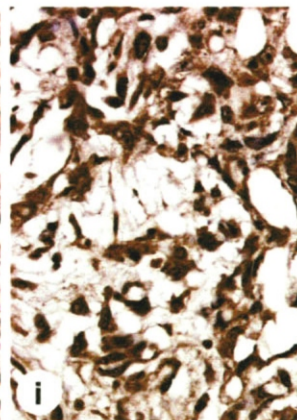
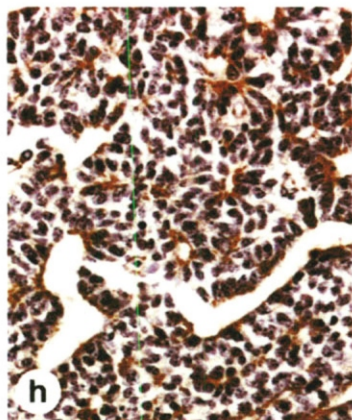
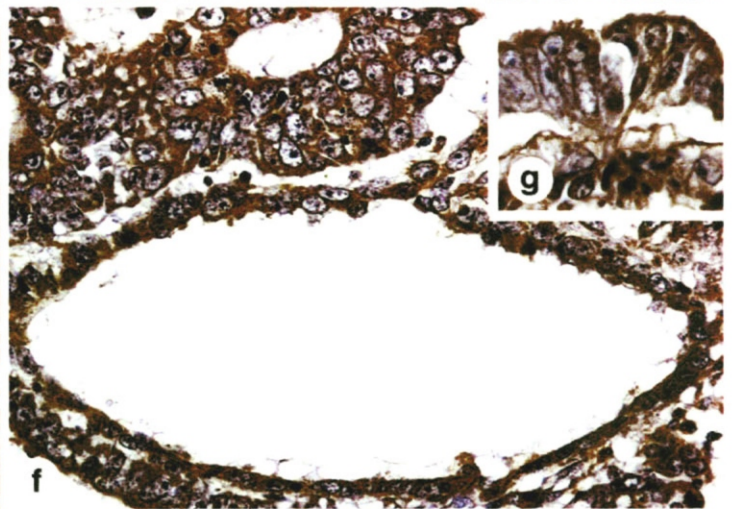
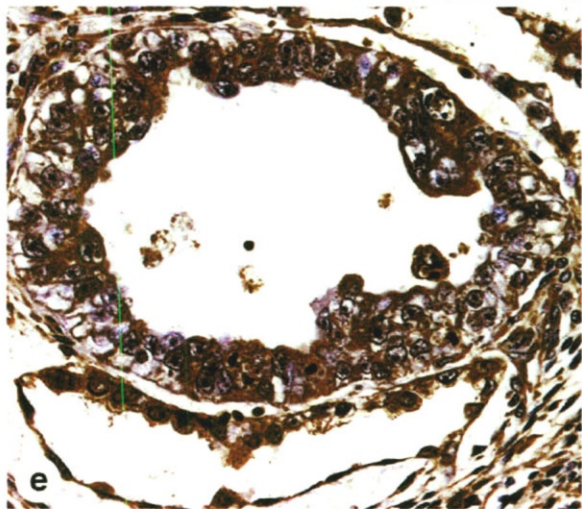
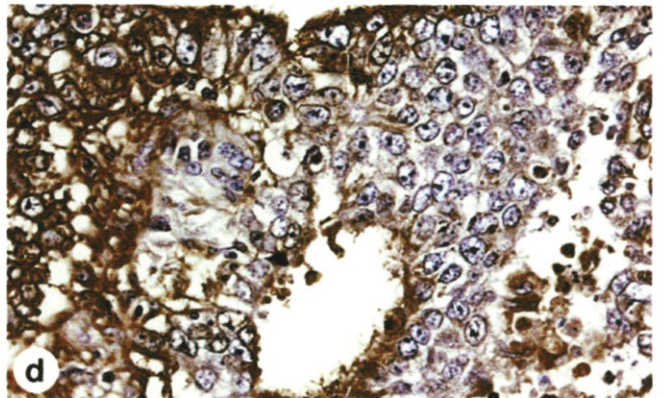
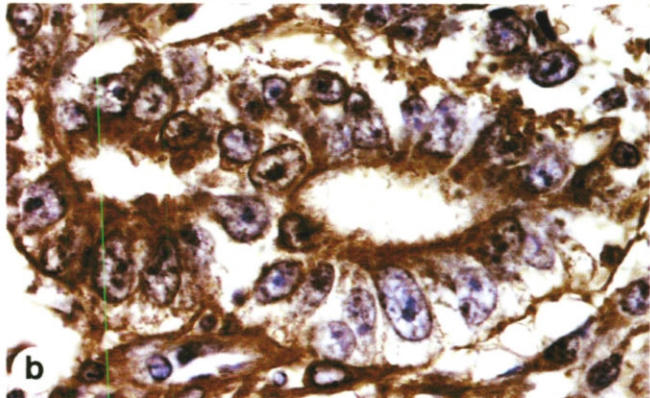
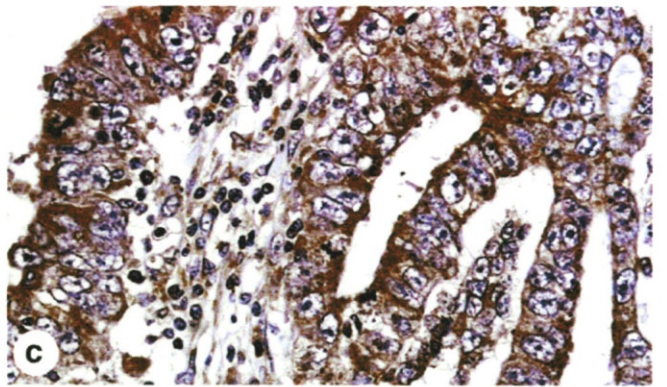
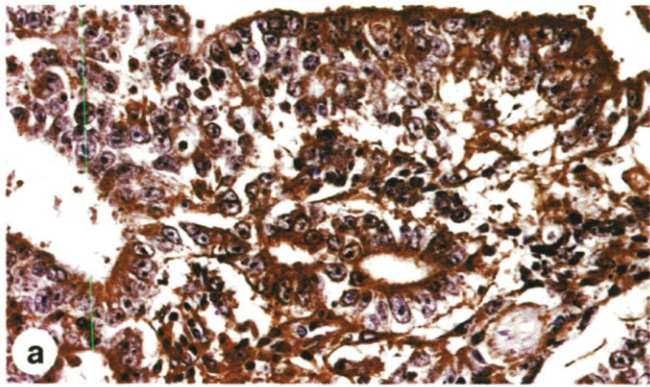


Fig. 12. Expresión de PTOV-1 en TCGTs.

- a) Intensa expresión del PTOV-1 en el citoplasma de todas las células de seminoma y ausencia de inmunomarcaje en los linfocitos infiltrantes en el tumor.
- b) Inmunomarcaje intenso con anti-PTOV-1 en toda la superficie del citoplasma de las células de Sertoli y también en el citoplasma perinuclear de las células del CIS. Nótese la ausencia de tinción inespecífica de fondo en el colágeno de la pared peritubular.
- c) Área de carcinoma embrionario con irregular distribución de inmunomarcaje en el epitelio glandular.
- d) No se observan cambios de intensidad de tinción de PTOV-1 en las áreas glandulares más diferenciadas de carcinoma embrionario, con respecto al patrón sólido inmaduro.
- e) Carcinoma embrionario de patrón sólido con moderada expresión de PTOV-1
- f) TCGT combinado, con característico patrón en guirnalda en el que se entremezclan vesículas de seno endodérmico con glándulas de carcinoma embrionario. En ambas estructuras la inmunoexpresión de PTOV-1 es muy evidente en el citoplasma apical de las células tumorales.
- g) Formaciones glandulares malignas con intenso marcaje de PTOV-1, lo que contrasta con la tenue tinción del citoplasma de las células mesenquimales. Tumor del seno endodérmico.

Anticuerpo anti-PTOV-1 y hematoxilina (a-g).

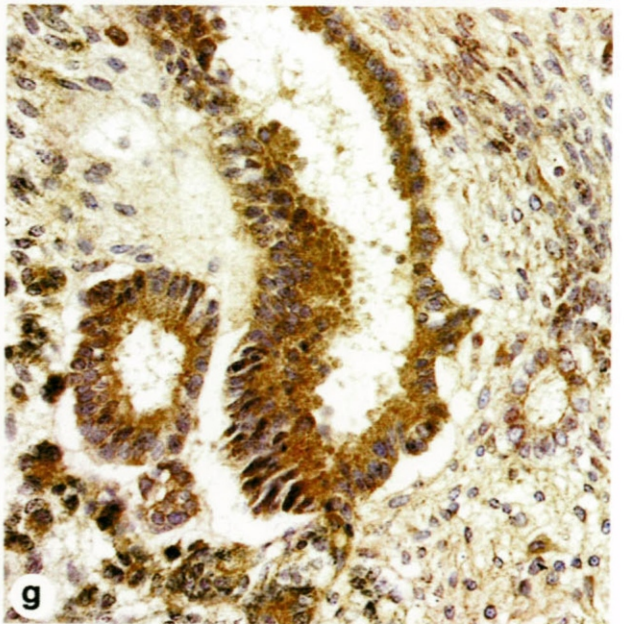
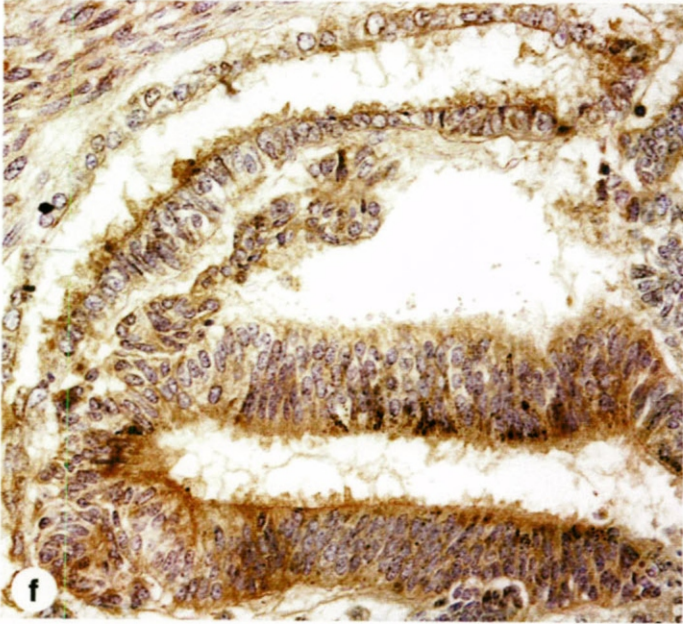
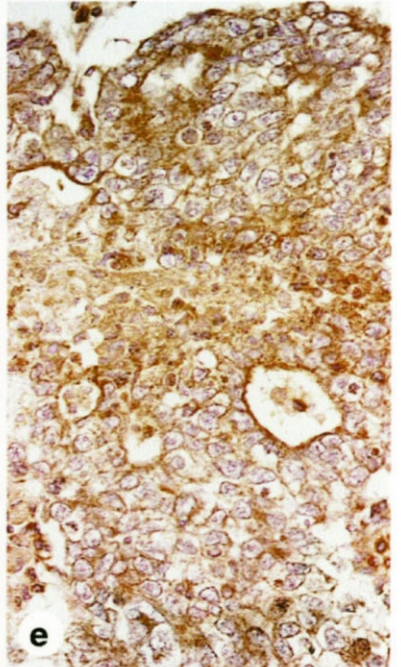
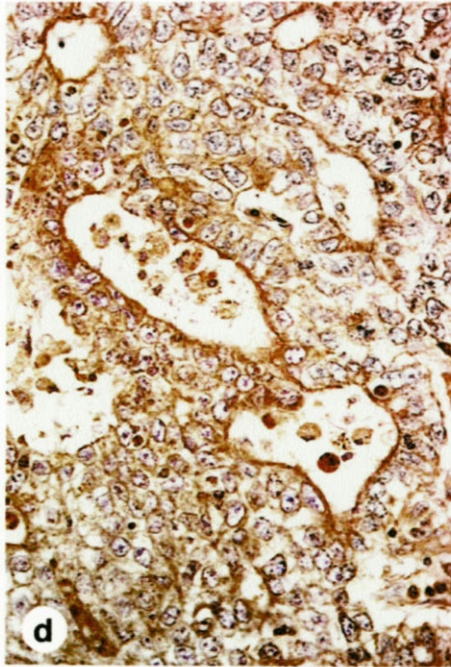
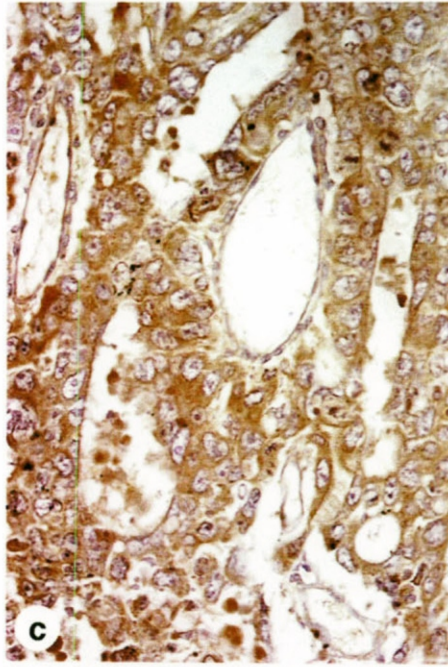
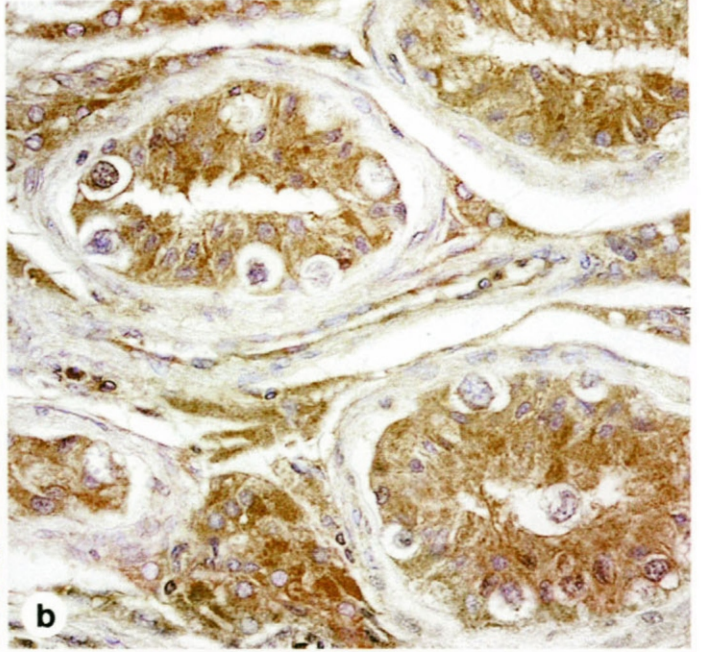
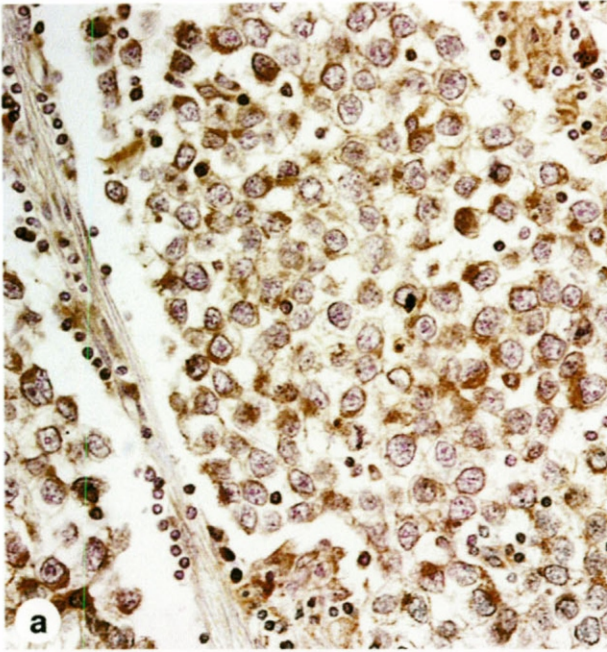


Fig. 13. Expresión de KLF6 en el testículo normal y en las células de CIS

- a) Tubo seminífero normal, con mínima tinción de fondo e inmunomarcaje de las espermatogonias.
- b) Detalle de la figura anterior en el que se observa inmunotinción de KLF6 en el citoplasma de todas las espermatogonias basales.
- c) Tubo seminífero con moderada hipoespermatogénesis y presencia de espermatogonias hipertróficas. La expresión de KLF6 es tenue en las espermatogonias basales.
- d) CIS con células neoplásicas que muestran intensa tinción de KLF6.
- e) La expresión de KLF6 en las células del CIS se evidencia en el citoplasma perinuclear y está ausente en las células de Sertoli. Las células de Leydig están intensamente inmunomarcadas.
- f) La mayoría de las células del CIS presentan inmunodetección de KLF6 focal con un típico patrón de marcaje del complejo de Golgi.
- g) Seminoma testicular con una muy intensa expresión de KLF6 de todo el citoplasma perinuclear, lo que contrasta con el marcaje focal del citoplasma de las células del CIS del tubo seminífero adyacente al tumor infiltrante.

Anticuerpo anti-KLF6 y hematoxilina (a-g).

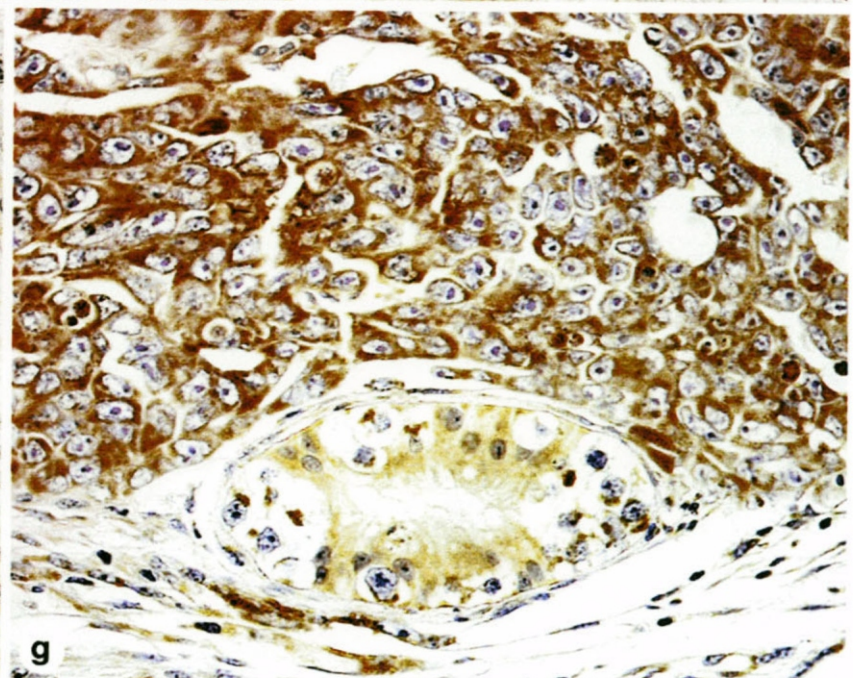
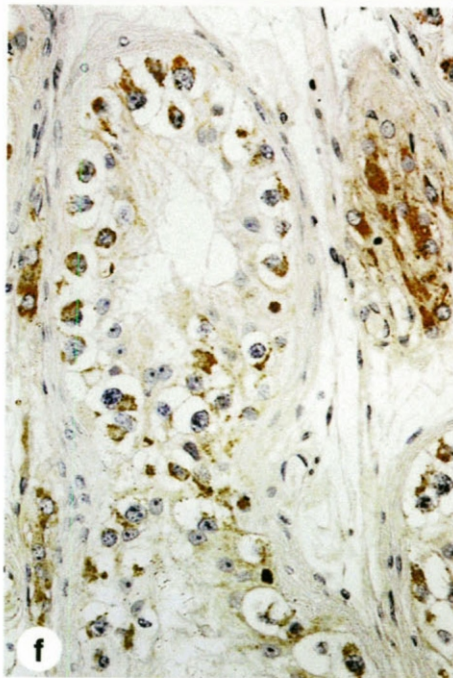
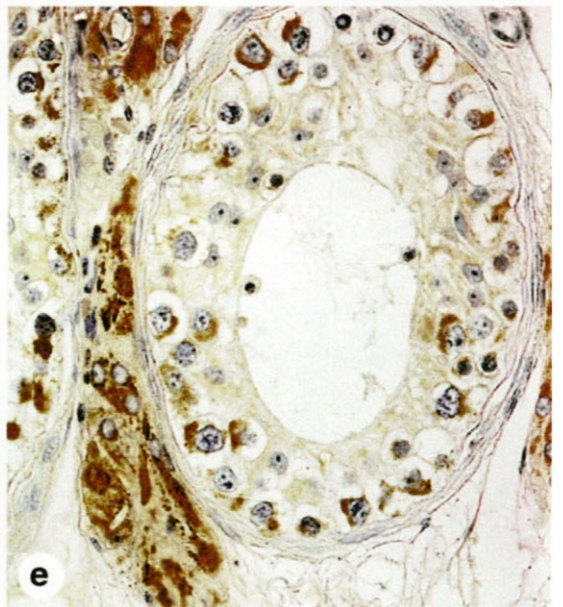
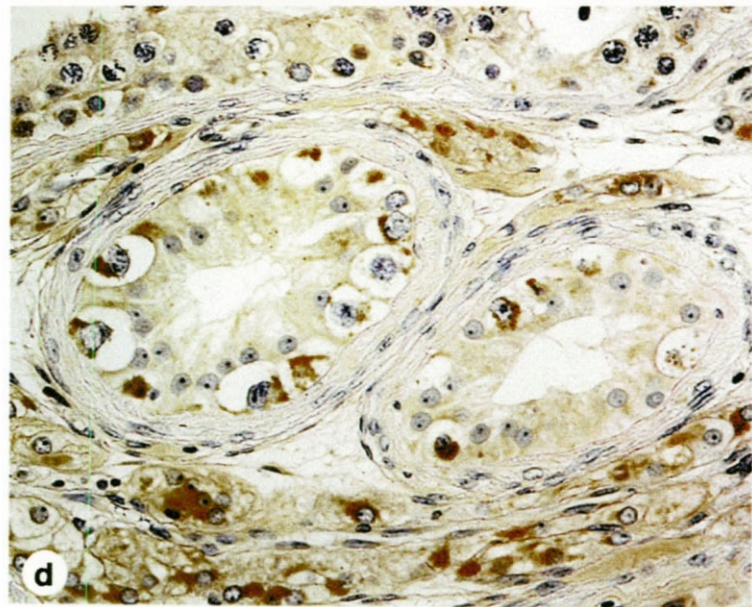
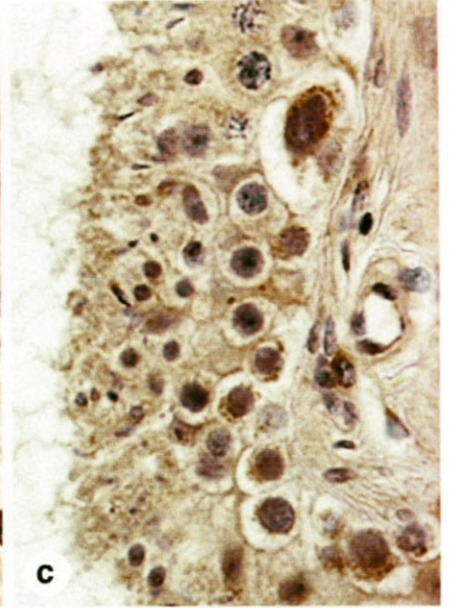
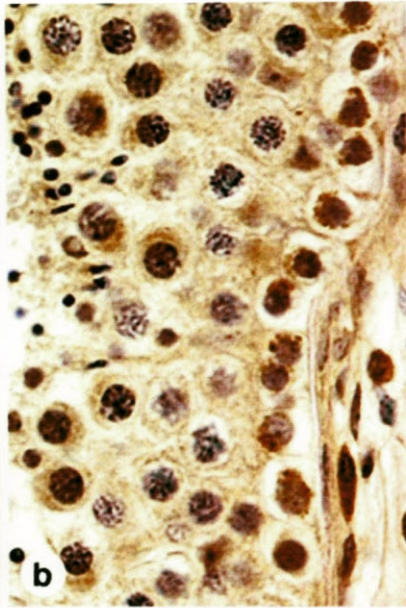
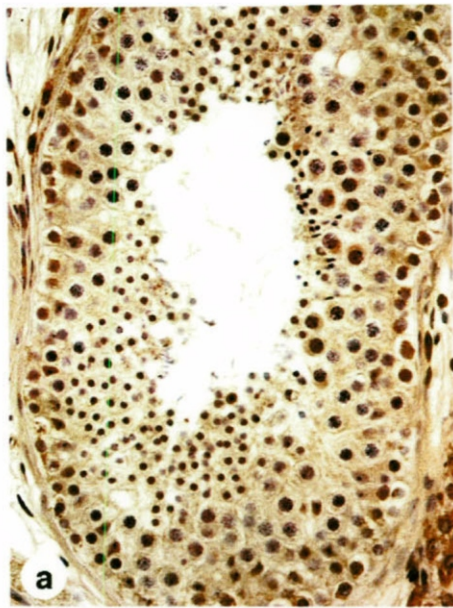


Fig. 14. Inmunomarcaje de KLF6 en los TCGTs. infiltrantes

- a)** Seminoma testicular con un patrón de tinción de KLF6 multifocal en el citoplasma perinuclear.
- b)** El inmunomarcaje de KLF6 en las células de este seminoma es tenue y este epítipo está ausente en los linfocitos infiltrantes.
- c)** Componente glandular de un carcinoma embrionario con moderada expresión de KLF6.
- d)** Variable expresión de KLF6 en células pobremente diferenciadas de un carcinoma embrionario de patrón glandular.
- e)** Destaca la disminución de expresión de KLF6 en las áreas sólidas de un carcinoma embrionario, si se compara con el componente de diferenciación glandular.
- f)** Vestigios de KLF6 en el componente sólido de carcinoma embrionario e intensa inmunoexpresión en el componente de seno endodérmico en un TCGT combinado.

Anticuerpo anti-KLF6 y hematoxilina (a-f).

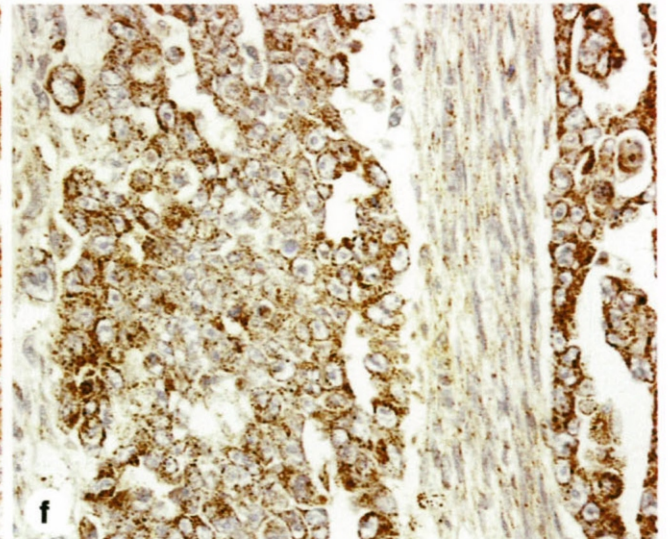
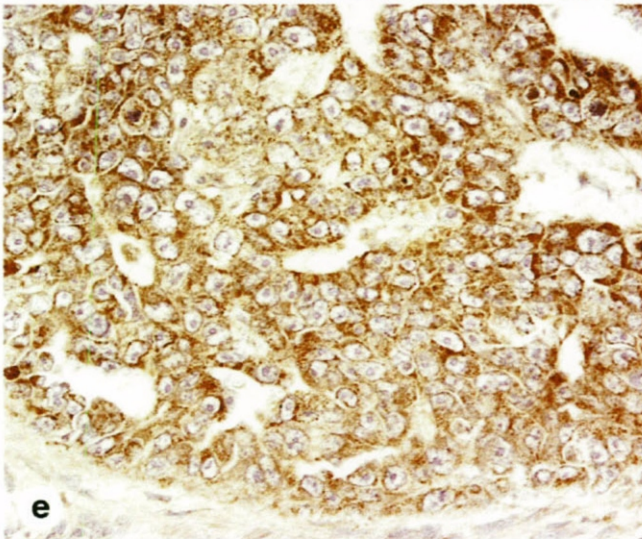
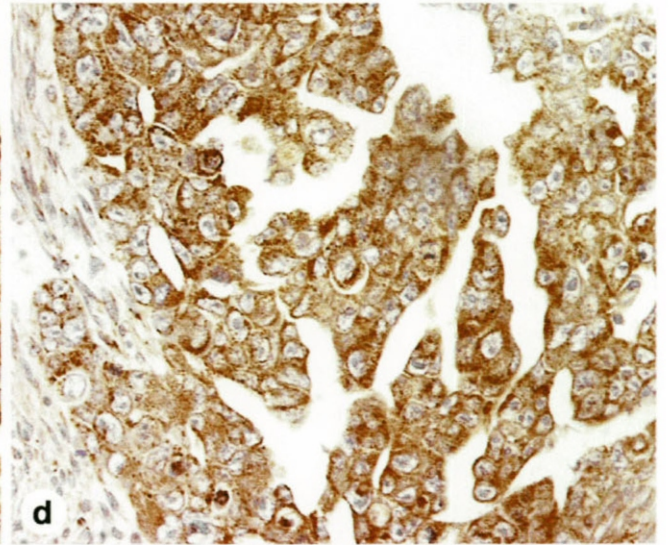
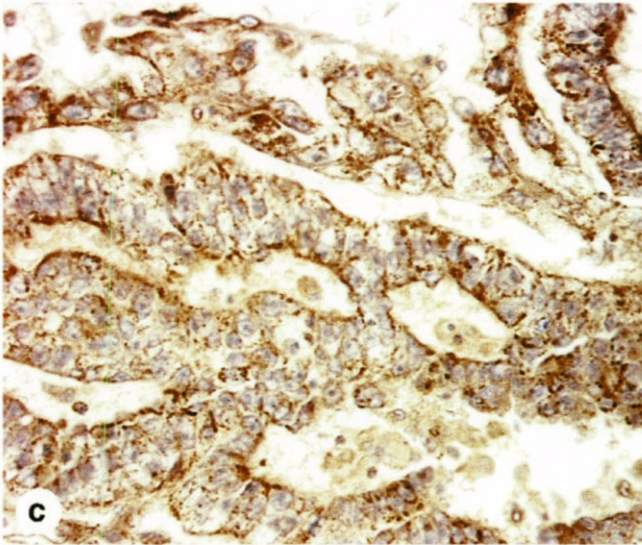
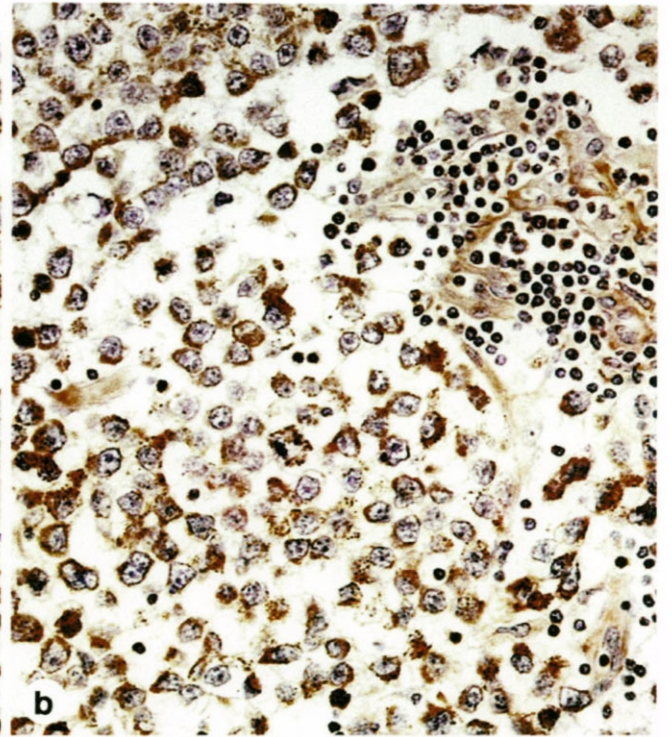
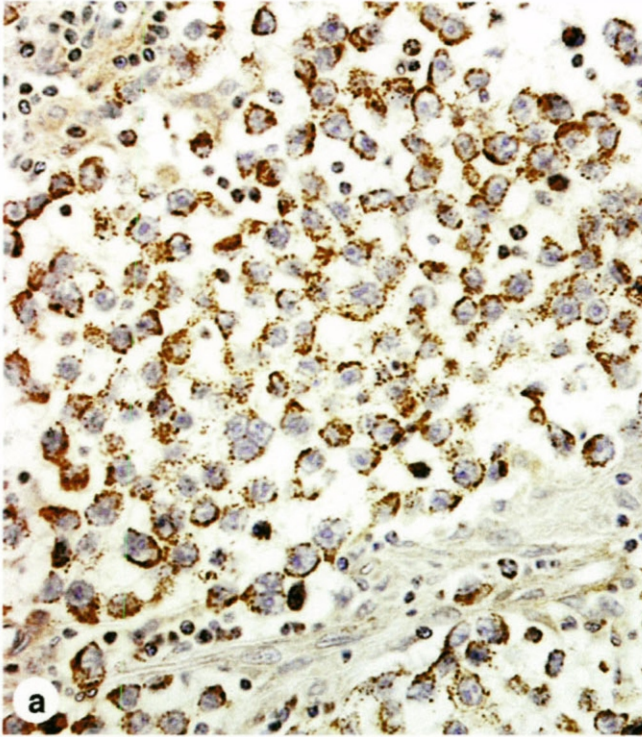


Fig. 15. Expresión de KLF6 en TCGTs. mixtos

- a)** Senos endodérmicos revestidos por un epitelio cúbico o plano con trazas de inmunomarcaje de KLF6.
- b)** El componente sinusal del tumor es muy irregular y está rodeado por células fusiformes y estroma mixoide con tenue expresión de KLF6.
- c)** Se observa una mayor intensidad de KLF6 en las células cúbicas que en las células aplanadas de revestimiento de los senos endodérmicos. La mayoría de las células fusiformes sólo muestran trazas de KLF6.
- d)** Mínima diferenciación glandular con intenso marcaje de KLF6 si se compara con los vestigios de tinción en el componente fusocelular predominante en este tumor del seno endodérmico.
- e)** Característico patrón en guirnalda de un TCGT mixto en el que se observa una evidente mayor expresión de KLF6 en la diferenciación de senos endodérmicos (zona inferior de la imagen) que en el componente glandular y sólido del carcinoma embrionario.
- f)** Diferenciación de cito y sincitiotrofoblasto con intenso marcaje de KLF6 si se compara con las células tumorales desdiferenciadas y con el tabique fibroso adyacentes.

Anticuerpo anti-KLF6 y hematoxilina (a-f).

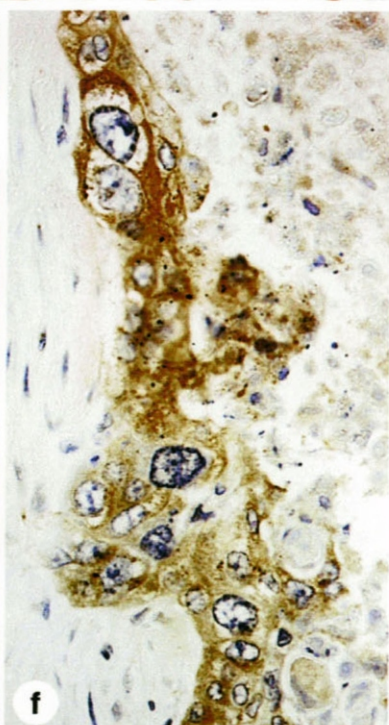
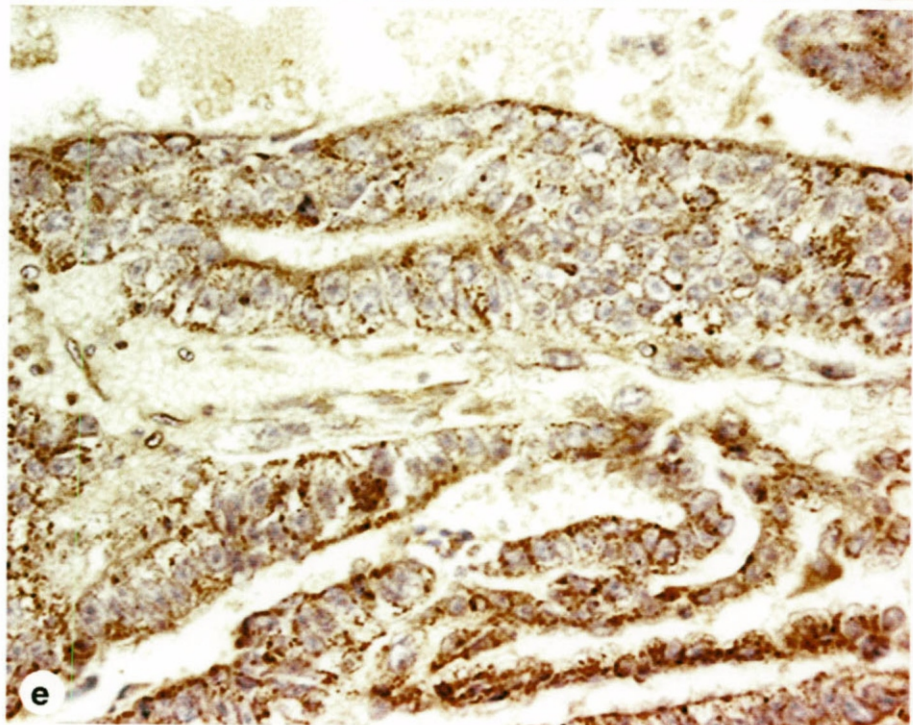
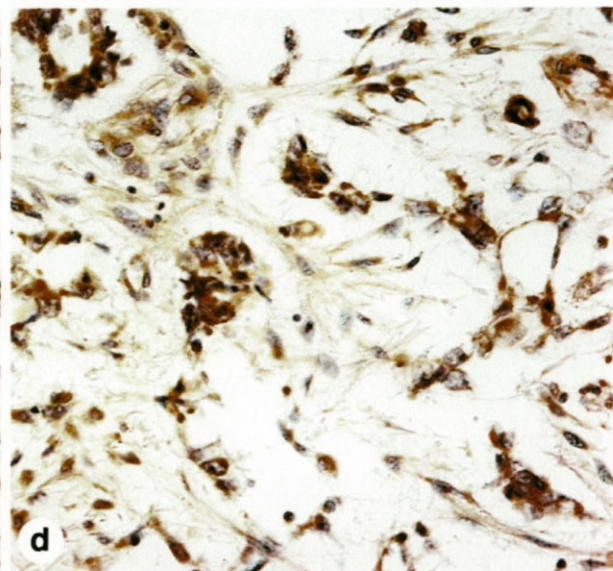
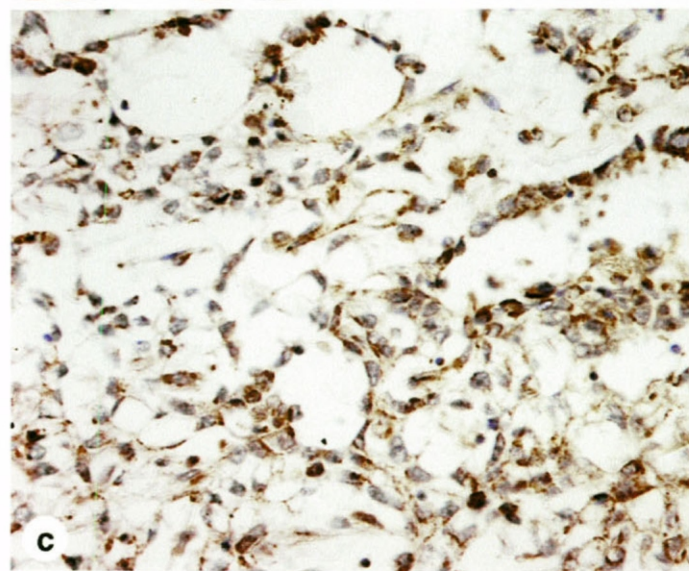
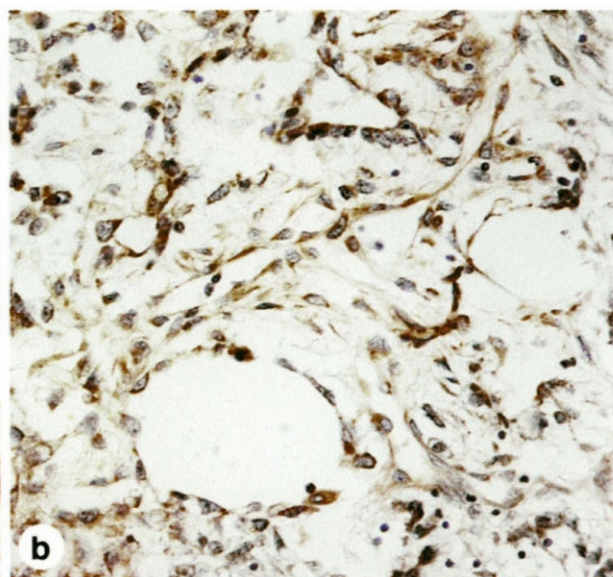
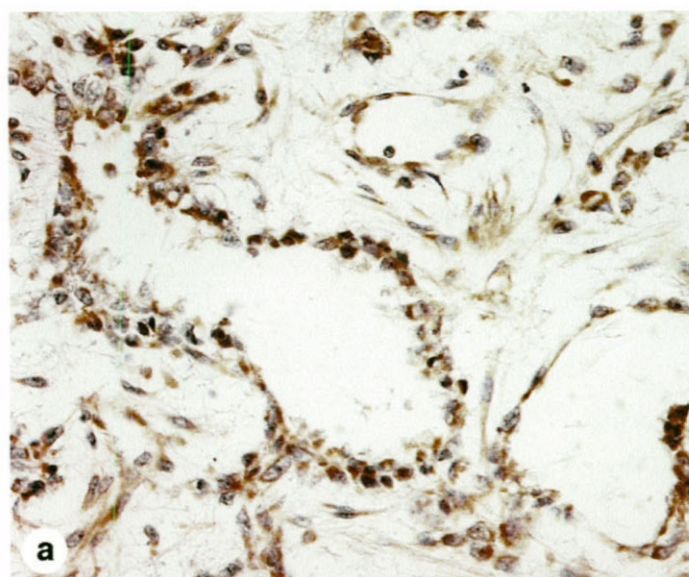


Fig. 16. Expresión de KLF6 en TCGTs.: microscopía confocal

a) Testículo humano normal. Composición digitalizada de múltiples cortes obtenidos mediante microscopía confocal. Inmunofluorescencia indirecta con anti-KLF6 en la que se evidencia ausencia de marcaje en las células del epitelio germinal y autocontrol positivo de intensa fluorescencia de KLF6 específica en las células de Leydig.

b) CIS con intenso marcaje fluorescente de KLF6 en el citoplasma perinuclear de las células malignas.

Anticuerpo anti-KLF6 (a y b).

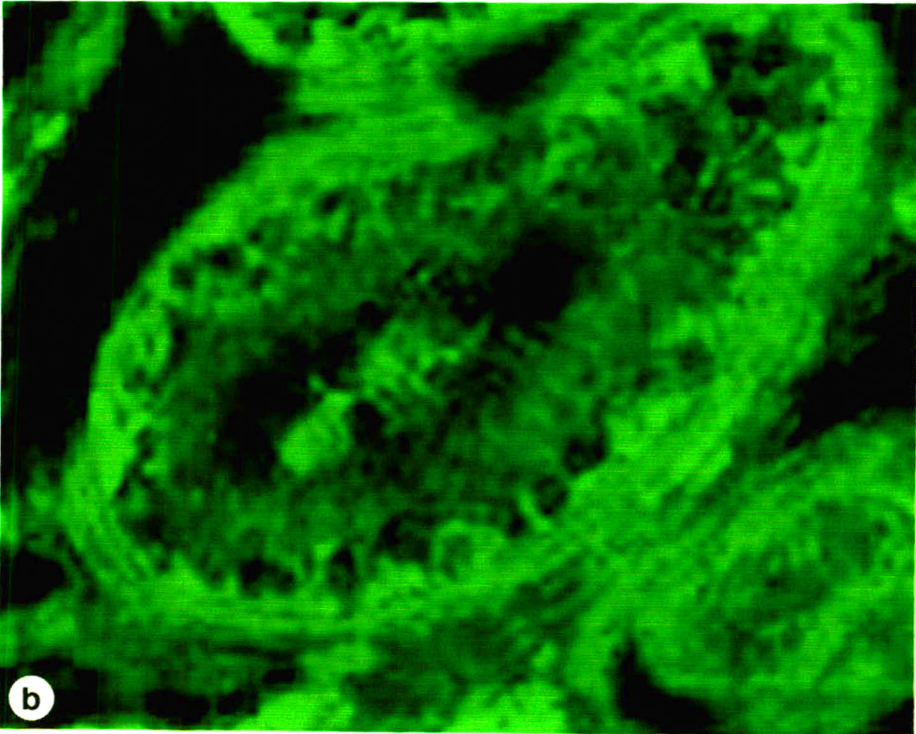
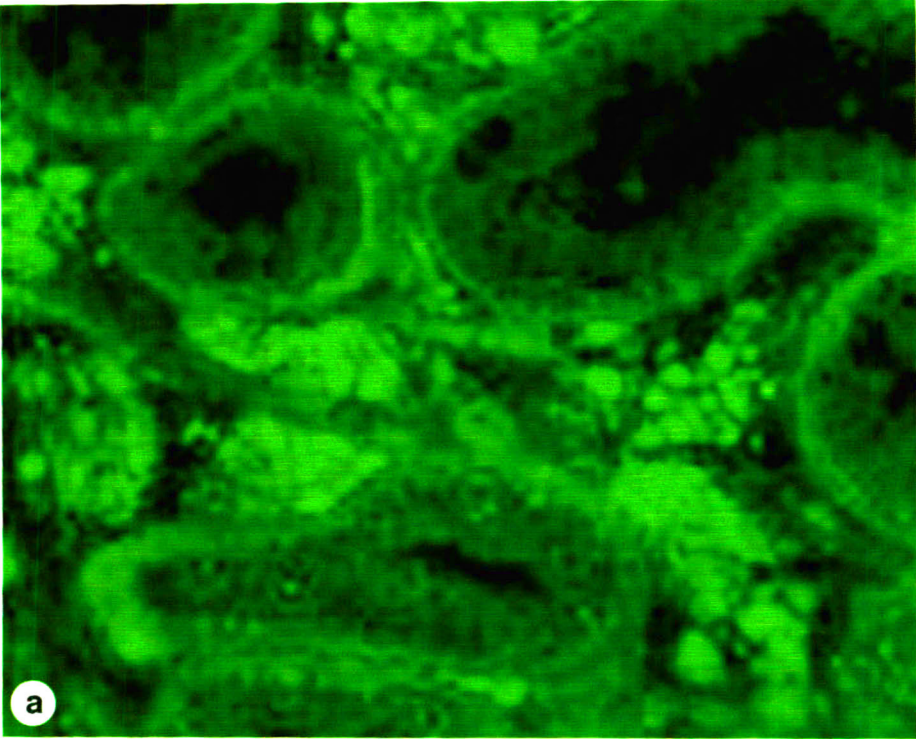
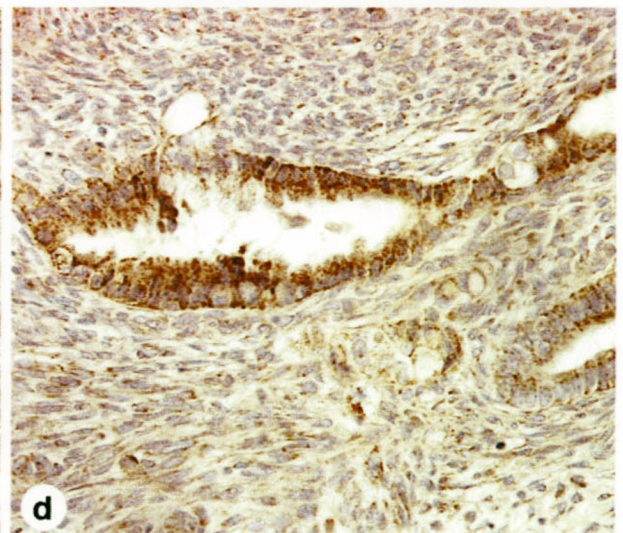
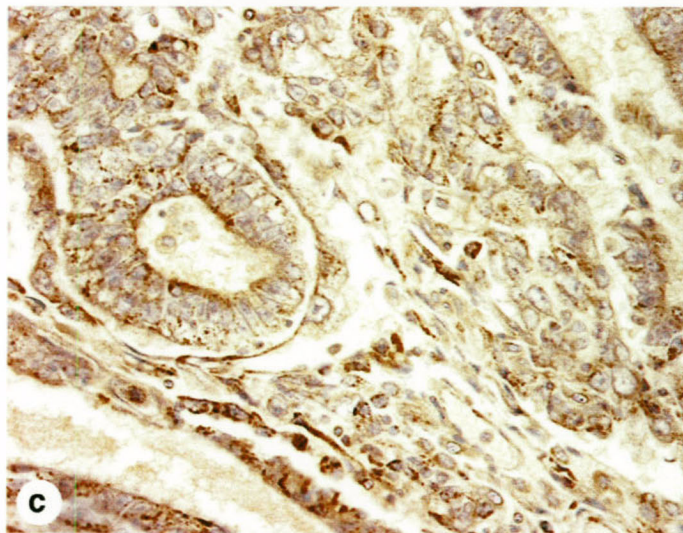
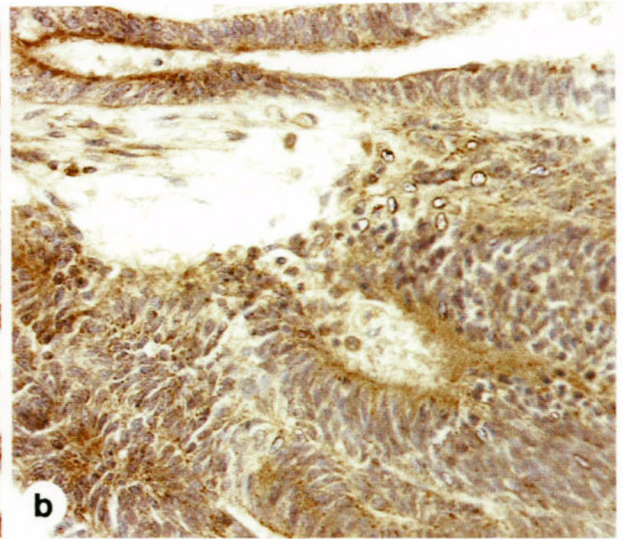
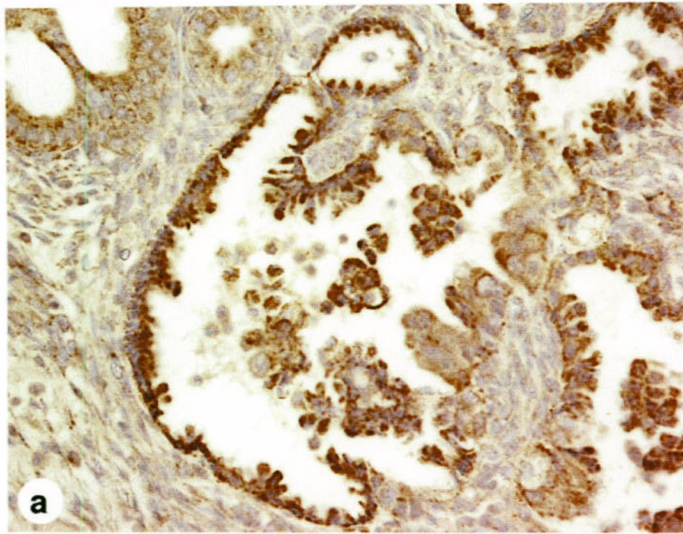


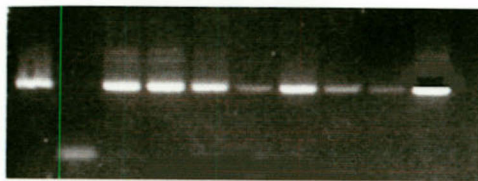
Fig.17. Expresión de KLF6 en teratomas y evaluación molecular de KLF6 en TCGTs. por técnica de RT-PCR

- a) Intenso inmunomarcaje de KLF6 en el componente glandular y mínima expresión en el componente mesenquimal de un teratoma maduro.
- b) Interfase epitelio-mesenquimal en un teratoma inmaduro con moderada expresión de KLF6.
- c) TCGT combinado en el que se observa un espectro de expresión de KLF6, con mayor intensidad en la diferenciación epitelial de carcinoma embrionario y de tumor de seno endodérmico que en las áreas mesenquimales desdiferenciadas de un teratoma inmaduro.
- d) Teratoma inmaduro con intenso o moderado inmunomarcaje de KLF6 en la diferenciación epitelial y leve marcaje en el componente mesenquimal de un teratoma inmaduro.
- e) Evaluación de KLF6 total y forma salvaje ("WT: wyle type") mediante RT-PCR en ocho casos diagnosticados de TCGT y en dos testículos humanos normales (grupo control, carriles 2 y 9). En el gráfico se muestra el cociente entre la forma salvaje y el total de KLF6.

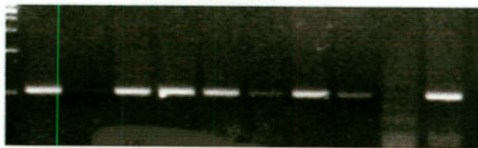
Anticuerpo anti-KLF6 y hematoxilina (a-d).



KLF6 TOTAL

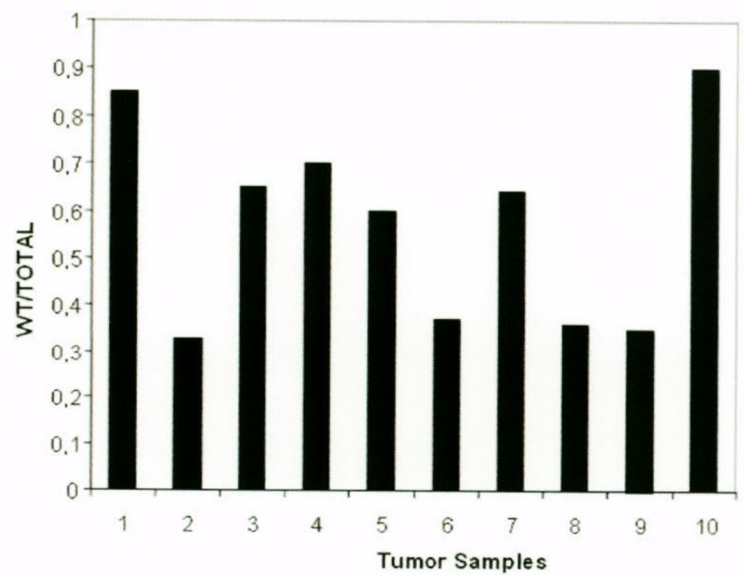


KLF6 WT



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tumor Samples



e

Fig. 18. Cambios de las células de Sertoli y pared tubular asociados al CIS

- a) Células de CIS dispuestas en el compartimento basal del tubo seminífero y rodeadas completamente por células de Sertoli con intensa expresión de PCPH.
- b) Degeneración de las células de Sertoli en el CIS.
- c) Desprendimiento de las células de Sertoli hacia la luz tubular y alteración del patrón de membrana de expresión de beta-catenina; nótese un pared peritubular engrosada y desestructurada.
- d) Tubo seminífero con CIS asociado a un seminoma intratubular: en ambos tubos se observa un importante adelgazamiento y degeneración de la pared peritubular.
- e) Pared peritubular edematosa e infiltrada por linfocitos en un tubo con células de CIS.
- f) Detalle de una pared peritubular hialinizada que muestra rarefacción inicial de las fibras de colágeno asociada a la migración de linfocitos.
- g) Patrón de tubulitis en el CIS, caracterizado por abundantes linfocitos T CD4 + que destruyen la pared peritubular y se acumulan en la luz, entremezclándose con las células neoplásicas.

Anti-PCPH y hematoxilina (a).

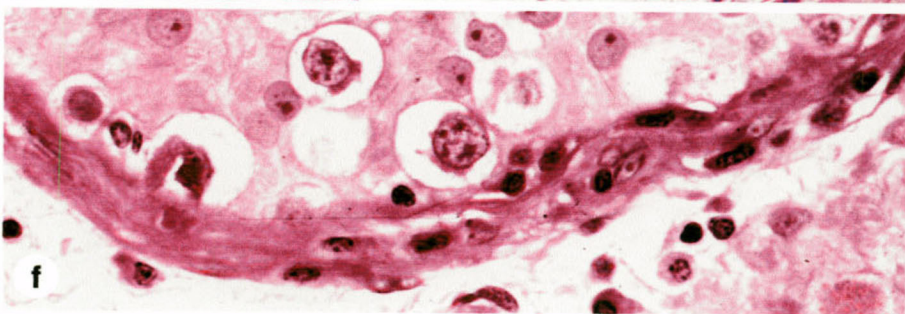
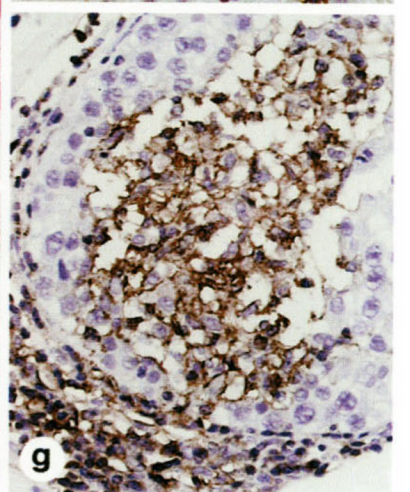
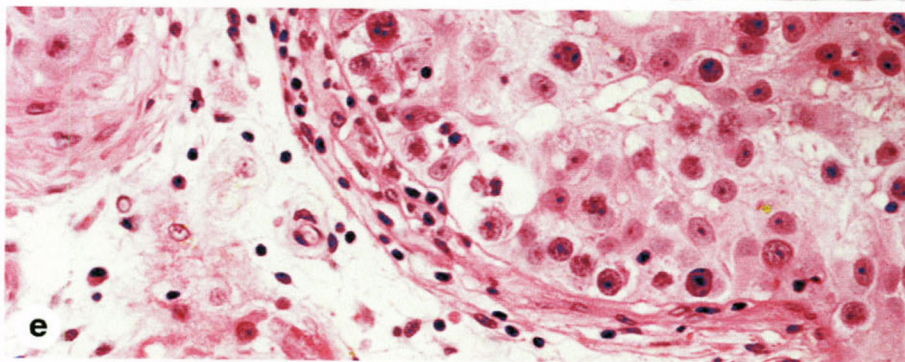
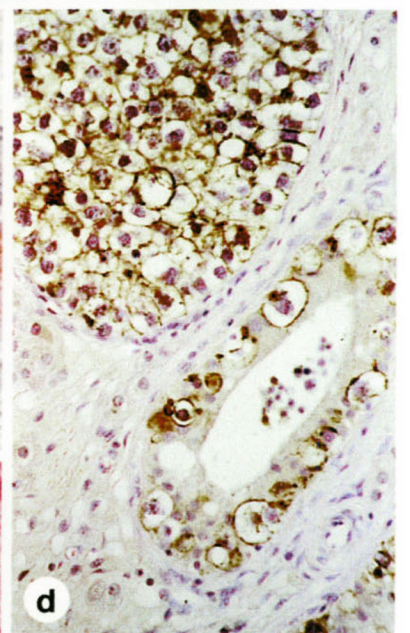
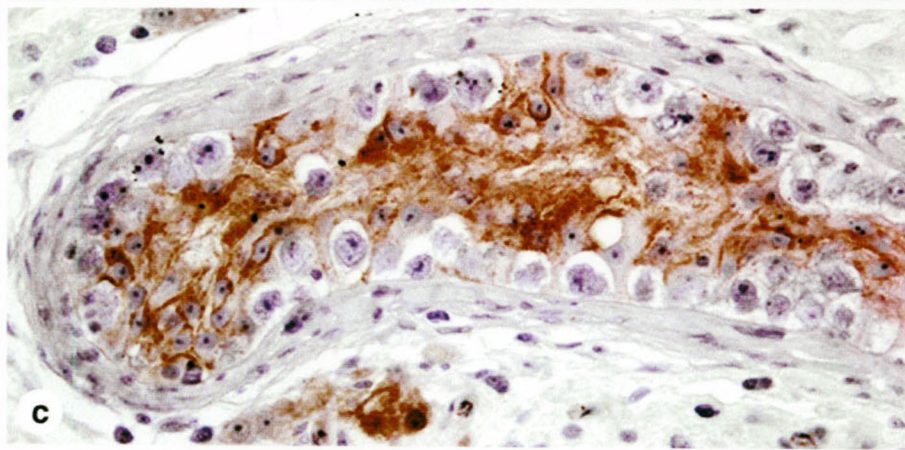
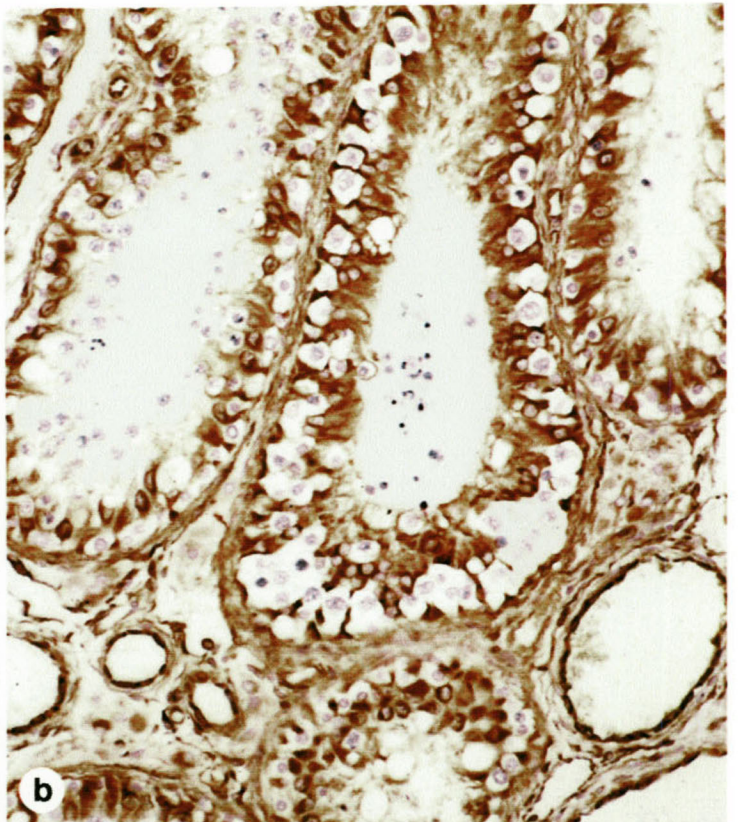
Anti-vimentina y hematoxilina (b).

Anti-beta-catenina y hematoxilina (c).

Anti-fosfatasa alcalina placentaria y hematoxilina (d).

Hematoxilina-eosina (e,f).

Anti-linfocitos CD4 y hematoxilina (g).



DISCUSIÓN

Los TCGTs. pueden clasificarse en tres grupos: a) TCGTs. infantiles-prepuberales, b) TCGTs. de adolescentes y adultos jóvenes y c) seminomas espermatocíticos.¹⁶³ Dos aspectos histológicos hacen únicos los TCGTs., con respecto a los tumores germinales ováricos y extragonadales: la presencia del CIS y el desarrollo de la variante de seminoma espermatocítico.¹⁹⁹ Los TCGTs. mixtos o combinados representan aproximadamente el 30-50% de todos los tumores testiculares, y curiosamente se ha encontrado una inexplicablemente fuerte asociación entre teratomas y tumores del seno endodérmico.¹³²

El presente estudio se centra en primer lugar en los mecanismos implicados en la angiogénesis en los TCGTs. Se sabe que las alteraciones en el normal control de la regulación de los mecanismos de angiogénesis pueden contribuir al peculiar crecimiento, progresión y agresividad clínica que experimentan los distintos tipos de tumores sólidos. En los TCGTs. hemos utilizado el anticuerpo anti-células endoteliales CD34 con el fin de identificar correctamente las células endoteliales aisladas y los capilares neoformados entremezclados con las células tumorales, ya que, en ocasiones es difícil identificarlos por métodos histológicos convencionales. Además, hemos usado el anticuerpo anti-alfa-actina muscular para identificar las arteriolas, las vénulas, así como otros tipos de vasos intratumorales anormalmente desarrollados. La justificación del uso de ambos anticuerpos como marcadores de la microvascularización ha sido ampliamente aceptada.¹⁷¹

Está establecido que la microvascularización del testículo humano normal está constituida por capilares, arteriolas y vénulas.¹⁶¹ Los capilares intersticiales están en estrecho contacto con las células de Leydig, y rodean los tubos seminíferos.^{62,64,66,161} Nuestros resultados inmunohistoquímicos en testículos humanos normales permiten distinguir claramente vasos capilares (revestidos por células endoteliales CD34 positivos) con respecto a vasos de mayor calibre (arteriolas-vénulas) que, además de expresar este epítipo endotelial, están rodeados por una fina pared muscular, específicamente marcada mediante el anticuerpo anti-alfa-actina de músculo liso.⁴²

De este modo, el presente estudio cuantitativo de la microvasculatura del testículo normal demuestra que el empleo del anticuerpo anti-CD34 permite identificar un mayor número de microvasos que el obtenido cuando se cuantifican los vasos que expresan actina de músculo liso. Esta misma situación ocurre cuando se cuantifican los microvasos en los TCGTs, concluyéndose que en los tumores testiculares también predominan los capilares

sobre los vasos de mayor tamaño del lecho microvascular. Sin embargo, el estudio histométrico efectuado con ambos anticuerpos ha demostrado que los TCGTs. presentan una disminución significativa del número de microvasos por unidad de volumen tisular, cuando se compara con el obtenido en los testículos del hombre normal (grupo control).⁴² Nuestros resultados están en desacuerdo con estudios previos de angiogénesis en neoplasias testiculares, los cuales encuentran un incremento significativo en el número de microvasos en los TCGTs, cuando eran comparados con el testículo normal;¹⁰² sin embargo, en ese estudio, no se realizó una selección aleatoria de las áreas que se iban a cuantificar, antes bien, sólo se evaluaron y cuantificaron histométricamente las áreas más vascularizadas. En otros estudios centrados en la angiogénesis de los TCGTs. no se realizó una comparación entre el número de microvasos encontrados en los TCGTs y los presentes en el testículo normal.^{4,75,141,206} Nosotros hemos encontrado que el recuento de los microvasos es mayor en los seminomas que en los carcinomas embrionarios y tumores del seno endodérmico. Hasta ahora, en nuestro conocimiento, no se había realizado la comparación del patrón microvascular entre los diferentes tipos histológicos de TCGTs, con la excepción del trabajo de Jones et al.¹⁰² que, valorando exclusivamente las áreas más vascularizadas de la muestra histológica, encontraron un elevado contenido de microvasos en las áreas más vascularizadas del teratoma -sin especificar su naturaleza madura o inmadura- respecto a esas mismas áreas más vascularizadas en los seminomas, no habiéndose evaluado en este estudio casos de carcinoma embrionario o con tumor del seno endodérmico, tumores testiculares muy frecuentes y de singular importancia en la evolución clínica y actitud terapéutica.

En el parénquima testicular conservado adyacente a los TCGTs., cuando se estudia pormenorizadamente, se detecta células de CIS en un número alto de casos.⁹⁸ Sin embargo, en nuestro conocimiento no existen estudios centrados en la posible participación de las células del CIS en relación con la microvascularización testicular y con los mecanismos iniciales implicados en la angiogénesis de los TCGTs. Es interesante considerar que el bajo número de capilares en los TCGTs pudiera estar relacionado con el particular origen de estas neoplasias en el interior de los tubos seminíferos, que, como es bien sabido, carecen de vasos sanguíneos. De hecho, las células del CIS proliferan en el interior de los tubos seminíferos, y en un primer estadio de proliferación de estas células malignas, el tamaño de los tubos seminíferos no cambia o es incluso más pequeño, puesto que el CIS habitualmente

se desarrolla en tubos atróficos, sobretodo en testículos criptorquídicos tardíamente descendidos en niños o aún presentes en hombres adultos.⁵¹ Posteriormente, en estadios más avanzados de la proliferación de las células del CIS, el tubo seminífero aparece muy dilatado y repleto de células malignas, usándose en este caso particular el término de seminoma intratubular (para revisión, ver trabajo de Dieckmann y Skakkebaek, 1999⁵⁵). En estos tubos muy dilatados repletos de células de CIS, los capilares peritubulares -los cuales, en el testículo normal, se localizan en las proximidades de los tubos seminíferos y rodean externamente a la pared peritubular-, son progresivamente rechazados hacia la periferia de estos tubos seminíferos que rápidamente aumentan notoriamente de diámetro.^{65,66} Incluso, en estadios aún más avanzados de esta masiva proliferación intratubular de células malignas de CIS, la masa tumoral crece de manera extraordinaria -transformándose ahora en verdaderos micronódulos tumorales-, pero los microvasos aún pueden permanecer en la periferia del los tubos seminíferos.

Este primer patrón de crecimiento de los TCGTs. en el interior de tubos seminíferos pudiera, en parte, explicar el bajo número de microvasos que hemos cuantificado en los TCGTs. En este sentido, en los estadios poco avanzados de tumores no expansivos de otras localizaciones -carcinoma in situ o tumores microinfiltrantes-, se ha postulado que los requerimientos nutricionales del tumor son aportados suficientemente por los sistemas de redes vasculares de las proximidades de las células tumorales.¹² Por ejemplo, en neoplasias intraepiteliales de próstata, los capilares se localizan en la proximidad de las membrana basal de los ductos y acinos prostáticos. Por el contrario, en el carcinoma invasivo de próstata, los capilares son abundantes y están intercalados en el estroma tumoral y los septos intersticiales.¹³¹ De otra parte, se sabe que la organización de los microvasos en las áreas angiogénicas desarrolladas en los tumores difiere de la habitual disposición de los microvasos presentes en los tejidos normales, y no solo en su estructura microscópica, sino también en su función.^{71,177} Asimismo, también en los diferentes tipos de TCGTs estudiados se pueden observarse estructuras dilatadas e irregulares que difieren de los vasos de órganos normales y que recuerdan histológicamente a la estructura de verdaderas fístulas y formaciones arteriovenosas.

Está bien establecido que la actividad angiogénica en tumores -y también en procesos inflamatorios- está modulada por la acción selectiva de numerosos procesos inmunológicos,

siendo los más importantes los mediados por los linfocitos T dispuestos en íntima vecindad con las células neoplásicas. En este sentido, es bien conocido que los seminomas testiculares desencadenan una importante respuesta del sistema inmune, que involucra principalmente a macrófagos y linfocitos T.¹⁹⁶ En el presente estudio se han encontrado linfocito T-auxiliares CD4+ y linfocitos T-citotóxicos CD8+ que se disponen frecuentemente alrededor de los vasos sanguíneos intratumorales. Estos linfocitos podrían modular los mecanismos angiogénicos de los tumores testiculares, tal como se ha descrito en otros tipos de tumores y en el tejido de granulación, caracterizado también por una intensa angiogénesis. Sin embargo, es probable que la angiogénesis sea el resultado de la activación de factores producidos por las células malignas, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores, los cuales pueden ser producidos por las células de los TCGTs.^{102,206} En el testículo humano normal hemos encontrado receptores de VEGF en las células endoteliales de los capilares peritubulares, así como en las células de Sertoli y en las de Leydig y además estos receptores los hemos inmunolocalizados en las áreas de parénquima testicular no infiltradas por el tumor. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en testículos humanos normales.^{63,179} Nuestro estudio, además, demuestra que los tres receptores de VEGF explorados están ampliamente expresados en las células endoteliales de los capilares dispuestos en íntimo contacto con las células tumorales, con independencia de la presencia o ausencia de células inflamatorias dispuestas alrededor o en la propia pared de los vasos intratumorales, lo que sugiere que las células malignas de los TCGTs son las principales productoras de los factores de crecimiento que inducen la proliferación de células endoteliales entre las células neoplásicas. Este resultado está en acuerdo con estudios previos^{102,206} que muestran sobreexpresión de VEGF en las células tumorales de TCGTs. Además, por primera vez se ha demostrado que el receptor Flt-4 está presente en el testículo humano normal y en los TCGTs.; este peculiar receptor sólo se había localizado previamente en tumores de células de Leydig.¹⁰⁸ La presencia de receptores de VEGF en las células de los TCGTs. de nuestro estudio indica un posible papel autócrino para el VEGF presente en las células de TCGTs que favorecería, no solo el desarrollo de una neoformación de vasos capilares en estos tumores, sino también una cierta actividad mitogénica de las células germinales tumorales, dato que ha sido evidenciado en otras células no endoteliales.¹²⁵

Los TCGTs. tienen, pues, un crecimiento rápido debido a una intensa actividad proliferativa, pero también pueden experimentar mecanismos de regresión natural que son, en primer lugar el frecuente y extenso desarrollo de áreas de necrosis y en segundo lugar, con menos repercusión en la evolución de la masa tumoral, los fenómenos de apoptosis. Referente a estos últimos mecanismos de apoptosis en los TCGTs., se ha encontrado una hiperexpresión de la molécula Mcl-1, un miembro de la familia anti-apoptótica Bcl-2, este dato es sugerente puesto que se ha demostrado que miembros de la familia de Bcl-2 participan en los constantes fenómenos de apoptosis que regulan las células germinales normales, concluyendo que Mcl-1 que se relaciona con la progresión maligna de los TCGTs.¹⁷³ De otra parte, los TCGTs. presentan altos niveles de p53, pero este p53 se encuentra en un estado de latencia,⁴⁷ asimismo, recientemente se ha investigado la relación entre la expresión de p21 y la sensibilidad de las células de TCGTs. al estímulo apoptótico, de modo que niveles bajos de proteína p21 están causados por una reducción de transcripción del gen p21, lo cual pudiera, al menos en estudios in vitro, determinar cambios de la respuesta de células de TCGTs. tratadas con cisplatino.¹⁸⁷

En referencia a la necrosis, tan frecuente en los seminomas y también en los TCGTs. no-seminomatosos, lo cual sugiere un intenso y rápido crecimiento de la masa tumoral,^{99,164} los cambios patológicos pueden explicarse, en parte, si se tiene en cuenta el bajo número de microvasos que hemos encontrado en los diferentes tipos de TCGTs.; dicho de otro modo, la alta actividad proliferativa de los TCGTs.⁴ no conlleva el desarrollo de un número adecuado de microvasos, de una angiogénesis idónea, lo que dificultará el mantenimiento de la oxigenación, la nutrición y otras actividades metabólicas de todas las células tumorales.

Las áreas de necrosis que frecuentemente se observa en la mayoría de los tumores de numerosos órganos -y también la necrosis que está presente en la mayoría de los procesos inflamatorios- son progresivamente reemplazadas por un tejido de granulación y ulteriormente por una cicatriz fibrosa. Estos procesos también ocurren en las áreas de necrosis de los TCGTs. que son progresivamente sustituidas por fibrosis y un tejido de granulación, en el que se observa una intensa proliferación de capilares en las áreas necróticas, que, en ocasiones, recuerda a verdaderos angiomas. En definitiva, estos hallazgos observados en relación con los TCGTs. son bastante similares a los que ocurren en las distintas fases de desarrollo del tejido de granulación que se pueden desarrollar por

múltiples causas -incluidas las neoplásicas- en otros órganos.¹⁷⁷ En nuestra opinión, esta angiogénesis postnecrótica presente en los TCGTs es exclusivamente reactiva al proceso de reparación tisular del área necrosada, y no es el resultado de los procesos de angiogénesis desencadenados directamente por las células tumorales. Por tanto, la abundante angiogénesis descrita en otros trabajos previos de TCGTs. no debe ser considerada como una angiogénesis tumoral. Es más, en un estudio de angiogénesis de TCGTs. en el que se ha descrito un elevado número de vasos,¹⁴¹ las figuras publicadas en este trabajo muestran claramente que los microvasos se disponen abundantemente en el tejido necrótico o en el tejido de granulación, pero no son evidentes en las áreas que contienen células tumorales, lo que invalida, en nuestra opinión, los resultados de este estudio.

El bajo contenido de microvasos presente en los TCGT es probable que provoque una inducción de los mecanismos de hipoxia tisular de algunas áreas del tumor, como ocurre en otros tipos de tumores.^{84,216} Esta hipoxia puede ser la causa que induzca los cambios isquémicos en las células tumorales, y en consecuencia provoquen la necrosis en esas áreas. Y estas áreas isquémicas son las que en determinados seminomas, tumores habitualmente de un crecimiento sólido, muestran un patrón de crecimiento tubular, lo que puede confundirse con tumores del seno endodérmico, neoplasias mucho más agresivas que requieren un adecuado tratamiento poliquimioterápico.²⁰⁰

Es interesante mencionar que la hipoxia ha sido demostrada como regulador positivo de la expresión de VEGF en diferentes órganos, incluido el testículo.^{123,180,206} La unión de VEGF a sus receptores en las células endoteliales puede favorecer la proliferación y la angiogénesis en las áreas de necrosis, dando lugar a la formación de un tejido de granulación altamente vascularizado, como hemos visto en el presente trabajo de TCGTs. Este resultado está de acuerdo con la relación directa entre los niveles de expresión de VEGF y el contenido de microvasos de los TCGTs.²⁰⁶ Además, se ha demostrado que el VEGF incrementa la permeabilidad de la microvasculatura,^{44,165} un hecho que puede relacionarse con los comunes fenómenos de edema y hemorragia presente en los TCGTs.²⁰⁶ También es sugerente considerar que los diferentes receptores de VEGF expresados en nuestro estudio en los distintas variedades histológicas de los TCGTs -y también el mismo VEGF- pudieran relacionarse con el alto grado de infiltración de linfocitos T presentes en los TCGTs..^{34,196}

Las bases moleculares implicadas en el desarrollo de los TCGTs., después del gran progreso en la caracterización de su histogénesis, es aún motivo de controversias, y el conocimiento acerca de las alteraciones genéticas y moleculares, incluidas la expresión y regulación de numerosos oncogenes, en los diferentes tipos histológicos de TCGTs. De hecho, no se conocen completamente mutaciones u otras alteraciones de genes implicados en cáncer son aparentemente poco frecuentes en TCGTs,¹³⁰ por lo que se necesitan nuevos y exhaustivos estudios de geonómica y proteómica que aclaren la biología tumoral de tumores tan complejos como son los TCGTs. combinados.

La relación unívoca entre la expresión de determinados genes candidatos en el desarrollo del cáncer testicular no está aún completamente establecida y surgen numerosos artículos contradictorios, dado la alta -pero a la vez muy parcial- información acumulada, puesto que, hasta el año 2004 se han publicado 265 artículos de genes y TCGTs. y se ha detallado que existen una amplia variedad de copias de regiones cromosómicas distintas y 245 genes descritos.²⁰⁷

El dato molecular más característico y muy constante de los TCGTs. es la presencia de una o más copias de un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12 [i(12p)] u otras formas de amplificación del cromosoma 12p, o por la presencia de aneuploidías. La ganancia constante del material genético a partir del cromosoma 12 encontrado en los TCGTs. sugiere que este evento es crucial en el desarrollo del tumor.¹⁶³ Además, estudios in vitro de líneas establecidas de TCGTs. han sugerido que las dos diferentes regiones -una proximal y otra distal- del cromosoma 12p pueden ser de singular importancia en la patogénesis de los TCGTs.⁸⁷

En el testículo humano, el gen PTEN está abundantemente expresado en las células germinales, mientras que está virtualmente ausente en la mitad de los seminomas y en el 86% de los carcinomas embrionarios; sin embargo, paradójicamente PTEN se expresa intensamente en las células del CIS, lo cual indica que la pérdida de expresión de PTEN en los TCGTs. no es un proceso temprano en el desarrollo de tumores testiculares.⁵⁸ De otra parte, mutaciones del gen BRAF, una isoforma humana de RAF que es activada por el oncogén Ras, son infrecuentes en los TCGTs.¹⁸⁵ El control de la progresión mitótica de células transformadas es crucial en los mecanismos de oncogénesis^{80,83,197} y, en este sentido, muy recientemente se ha encontrado en todos los seminomas testiculares evaluados la

expresión de la quinasa Aurora B, cuyos valores elevados son característicos de un rápido incremento de la división de células normales y tumorales.³⁸ Además, se ha demostrado ganancias en mutaciones funcionales del receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR2) en espermatogonias adultas, lo cual pudiera estar relacionado con su potencial tumorigénico. Así mismo, la expresión de KIT-tirosín quinasa es un proceso crítico en el desarrollo de las células germinales normales y también de la mayoría de los seminomas, por lo que mutaciones del gen de KIT pueden contribuir a la tumorigénesis de los seminomas, pero, contrariamente, este proceso no afecta a los TCGTs. no-seminomatosos.¹⁰⁵

Las células del CIS comportan un inmunofenotipo alterado, relacionado con cambios de la expresión génica de oncogenes, de genes supresores y de genes reguladores, los cuales están implicados en la transformación, proliferación y apoptosis de las células de CIS. Está bien establecido que los genes p53, c-kit, K-ras y también el gen del retinoblastoma se hiperexpresan en los TCGTs. y también el CIS.

En el presente estudio hemos explorado inmunohistoquímicamente y también por métodos moleculares la expresión de otras moléculas de reconocida implicación en la regulación de células neoplásicas. En concreto, hemos encontrado una importante expresión del protooncogén regulador de proliferación celular PCPH con un robusto marcaje en las células de diferentes tipos de TCGTs. y también en las células del CIS.¹⁵⁸

La detección inmunohistquímica de la proteína expresada ante la activación del gen PCPH es constante y de similar intensidad en todos los seminomas testiculares explorados; también se evidencia inmunoreacción en los TCGTs. no-seminomatosos, pero en éstos los resultados son más variables: así en los tumores del seno endodérmico el PCPH aparece como trazas de marcaje en el citoplasma perinuclear de las células tumorales, no evidenciándose un mayor marcaje cuando se valoran separadamente los patrones más diferenciados con cuerpos glomeruloides, respecto a los patrones sólidos más inmaduras. Contrariamente, en el carcinoma embrionario testicular, la expresión de PCPH es notoriamente mayor en los patrones glandular y papilomatoso, mucho más maduros, que en los patrones sólidos desdiferenciados, en los que no existe inmunomarcaje de PCPH o sólo se observan trazas de inmunotinción. En la actualidad sabemos que los carcinomas embrionarios constituyen un tipo histológico de TCGTs. peculiar, cuyas células pueden

sufrir una diferenciación en parte similar a la que ocurre en los estadios más tempranos del desarrollo embrionario normal. Sin embargo, hasta la actualidad no existe un marcador histológico específico que permita identificar fehacientemente estas células tumorales indiferenciadas. Por ello, es necesario realizar un abordaje diagnóstico mediante métodos moleculares. En este punto, se ha encontrado que existen patrones de expresión génica característicos de cada subtipo histológico de TCGTs., y en estos tumores se ha identificado desregulación de procesos selectivos, tales como procesos de señalización o metilación del DNA, que operan durante el desarrollo embrionario normal.¹⁸³ Un excelente modelo natural de futuros estudios lo constituyen los teratomas testiculares, en los que se ha sugerido que existe un origen clonal común de los teratomas maduros con el resto de componentes de un TCGTs. combinado.¹⁰⁷

En el presente estudio de TCGTs., la detección de PCPH por métodos de biología molecular se realizó mediante inmunolectroforesis (*western blotting*) de tejidos testiculares normales (grupo control) y de varios casos de diferentes tipos histológicos de TCGTs., siguiendo métodos previamente descritos para la evaluación de esta proteína PCPH.¹⁷⁰ De este modo, hemos podido comprobar que en los TCGTs. malignos se identifica claramente la forma anómala correspondiente al polipéptido de aproximadamente 27-kDa; además, también se detecta el polipéptido normal de PCPH en la banda que migra a nivel de los 47-kDa. Junto a estos dos polipéptidos inmunomarcados, aparecen otras bandas inespecíficas de mayor peso molecular que pudieran corresponder a inmunoglobulinas tisulares, teñidas inespecíficamente con este anticuerpo policlonal. Dado que en los carcinoma embrionarios con patrón sólido, las células tumorales son muy inmaduras y en ellas la expresión inmunohistoquímica de PCPH es menor e incluso puede desaparecer, muy probablemente el predominio de estos patrones más inmaduros en un determinado caso de TCGTs. combinado pueda relacionarse con la disminución o incluso la pérdida de expresión de los polipéptidos de PCPH de 47-kDa y de 27-kDa, y con la aparición de bandas incompletas y de poca intensidad de polipéptidos de mayor peso molecular. Esta hipótesis puede ser verosímil, si se tiene en cuenta estudios previos *in vitro* en los que se ha demostrado la presencia de bandas incompletas de PCPH en los *westerns* de líneas celulares establecidas de células humanas procedentes de displasias laríngeas moderadamente diferenciadas;¹⁸ así mismo, la banda de 27-kDa que hemos obtenido en tejidos congelados durante la orquiectomía de varios TCGTs. es superponible a la observada en el *western* de extractos

proteínicos de carcinomas epidermoides de laringe humana.¹⁸ Estudios previos realizados en otras líneas celulares establecidas de tumores humanos,¹⁵⁷ de ratón¹⁵⁶ y de rata¹⁸⁴ han confirmado este patrón de inmunolectroforesis de PCPH obtenido en los TCGTs. humanos..

El PCPH es, pues, un protooncogén conservado e hiperexpresado en los TCGTs. humanos, por lo que muy probablemente participe en diferentes mecanismos de regulación de la carcinogénesis de los TCGTs., ya que este protooncogén está presente en todas las variedades histológicas y también su expresión inmunohistoquímica es muy evidente en todos los casos con CIS. Algunos datos conocidos de la biología molecular del PCPH corroboran esta hipótesis. Estudios previos han demostrado que el protooncogén PCPH se ha aislado inicialmente dentro de un amplio grupo de proteínas G-reguladoras, y participan en la función intercambiadora GDP/GTP.²⁰¹ La actividad GDPasa se confirmó con la caracterización del protooncogén PCPH.^{143,154,205}

Este intercambio de bases nucleotídicas está en relación la capacidad que tiene el PCPH en participar en mecanismos de regulación de células tumorales, incluidas las del CIS. La idea inicialmente expuesta acerca de que la expresión de la proteína de 27-kDa es exclusivamente la forma oncogénica del PCPH y que, por tanto, ésta sería la que se expresaría en los tumores, no es una hipótesis actualmente verosímil, ya que este polipéptido de PCPH de bajo peso molecular es el único que se expresa en las células epiteliales normales;^{157,170} aún más, como se ha comprobado en estudios previos^{18,170,184,194} y también en los resultados de nuestros casos evaluados mediante el método de inmunolectroforesis, el polipéptido que desaparece más precozmente en las células neoplásicas, incluidas las células de los carcinomas epidermoides de laringe, es el de 27-kDa. Así mismo, queda por aclarar, entre otros procesos moleculares en los que pudiera participar el PCPH, el origen de los restantes polipéptidos de mayor peso molecular que aparecen en los *westerns* de algunos casos de TCGTs. y en los descritos por otros autores.^{18,184} Se supone que estos polipéptidos de mayor peso molecular pudieran representar formas metiladas o glicosiladas de la proteína PCPH, pero también cabe la posibilidad de que estos polipéptidos de diferente peso molecular pudieran representar productos de translación de transcriptasas defectuosas^{18,184} o modelos alternativos de transcripción y procesado post-traslacional de la proteína PCPH.¹⁷⁰ Finalmente, la aparente

discrepancia entre la pérdida de expresión y la aparición de nuevos polipéptidos también podría explicarse por una baja sensibilidad de los métodos inmunohistoquímicos para PCPH observada en algunos casos con TCGTs. que, sin embargo, pudieran identificar mejor la actividad de PCPH, usando inmunodetección de bandas anómalas de PCPH mediante *Western blotting*.¹⁸

No conocemos aún si estas bandas anómalas presentes en TCGTs. humanos pudieran, en parte, representar mutaciones del protooncogén PCPH. En este sentido, estudios *in vitro* han descrito una mutación puntual de PCPH,²⁰² que daría lugar a la forma activada de la proteína denominada *mt*-PCPH. Basándose en los cambios derivados de esta mutación puntual, se ha postulado que la actividad transformante de la proteína *mt*-PCPH pudiera ser la consecuencia de la desregulación de la actividad normal, por pérdidas o adiciones de restos C-terminales de ambas proteínas.^{137,138,202,204} Otra consecuencia de posibles mutaciones de PCPH, que igualmente pudieran ser las responsables del mantenimiento de la transformación neoplásica, es la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, que pueden estar mediados por la secreción de una $\alpha 2b$ -neuregulina -relacionadas más con la activación de protooncogenes,^{119,204} que con la transformación celular-⁷ que expresan el oncogén *mt*-PCPH.²⁰⁴ Estos resultados apoyan la teoría de que las neuregulinas juegan un papel importante en el mantenimiento del fenotipo de la células *mt*-PCPH transformadas, confiriéndole resistencia o ventajas en su crecimiento.²⁰²

La robusta inmunoexpresión de PCPH en las células del CIS y su ausencia o solo vestigios de expresión en las espermatogonias basales presentes en testículos humanos normales¹⁵⁸ sugiere que el PCPH sea un protooncogén regulador de la proliferación celular de las células transformadas del CIS. En este sentido, estudios previos en cultivos de líneas celulares establecidas se ha observado que PCPH y su forma activada (*mt*-PCPH) ocasionan una inhibición del factor de crecimiento epidérmico -estimulante de la proliferación celular- sobre los oncogenes activados *ras* o *raf* de la vía de las proteinkinasas; sin embargo, solo *mt*-PCPH, pero no PCPH, coopera con la oncoproteína *ras*. Este mecanismo de regulación negativa de la vía *ras* puede sugerir que el PCPH contribuya a la regulación de la proliferación celular normal. La pérdida de PCPH, esto es, de éste regulador negativo de la vía *ras*, podría provocar un estímulo progresivo de la vía *ras* y, de este modo, contribuir al desarrollo del fenotipo neoplásico.¹⁵⁴ Los resultados de la presente tesis están de acuerdo

con datos previamente publicados^{18,154,157,170,184} en los que se demuestra que la pérdida de PCPH se correlaciona directamente con el incremento de la proliferación celular en los tumores malignos más agresivos.

En definitiva, respecto de la oncoproteína PCPH, el desarrollo de células neoplásicas no dependería tanto del aumento de la expresión su forma de 47-kDa, ni de la desaparición de la de 27-kDa, si no de la aparición de polipéptidos de peso molecular superior a 47-kDa.¹⁷⁰ Esta desregulación del PCPH puede estar implicada y además ser un marcador de la progresión neoplásica¹⁸⁴ tal como ha sido sugerido previamente de varias líneas celulares tumorales experimentales^{154,157,170,184} y también en las displasias y neoplasias laríngeas humanas.¹⁸

Otro nuevo oncogén que por primera vez se ha identificado en los TCGTs. es el denominado PTOV-1. La proteína sintetizada por el gen PTOV-1 en las células neoplásicas pueden adquirir formas anormales, las cuales se sobreexpresan, entre otros varios tipos de células tumorales, en el cáncer de próstata, siendo su expresión directamente proporcional al índice de proliferación Ki 67.^{174,175} En el presente trabajo PTOV-1 se expresa en los diferentes tipos histológicos de TCGTs. y también en las células de CIS y en los seminoma intratubular, por lo que se sugiere que pudiera estar implicado en la transformación tumoral de los gonocitos y en su mayor actividad proliferativa; el mantenimiento del mismo inmunofenotipo de PTOV-1 en los distintos tipos de TCGTs. permite especulativamente sugerir que este gen también se pudiera relacionar con los mecanismos de infiltración tumoral en los TCGTs.

También hemos encontrado una evidente expresión del denominado "Kruppel-like factor 6", KLF-6 en el citoplasma de las células de CIS y esta actividad se conserva en los TCGTs. En el presente estudio molecular de KLF6 hemos encontrado cambios de expresión en las bandas de inmunoelectroforesis de la proteína KLF6 en los tumores testiculares respecto con sus controles de testículos normales; pero además, estos datos son superponibles a los obtenidos por métodos de RT-PCR en los que se demuestra que existen alteraciones del RNA, en los mismos tumores en los que se ven bandas anormales de proteína detectadas en la inmunoelectroforesis. De hecho, nuestros datos en TCGTs. corroboran la existencia de formas alternativas de procesado ("splicing") del gen KLF6, que conlleva la formación de proteínas defectuosas en las regiones de unión de KLF6 al

DNA, por lo que gen de KLF6 muy probablemente sea un gen candidato en al carcinogénesis de los TCGTs. En concreto, hemos encontrado dos de las formas anormales de expresión génica ("splicing") de las tres variantes que se han aislado y que se diferencian de la forma normal de KLF6 por poseer solo 2, 1 o ningún dedo de Zn. Estas variantes alternativas no son funcionalmente activas comparadas con la normal, porque no pueden translocarse al núcleo, donde los factores de transcripción ejercen su función; sin embargo, todo lo contrario ocurre con la forma salvaje que se transloca normalmente al núcleo para regular el ciclo celular normal. Nuestros datos sugieren que este factor transcripcional KLF6 presenta mutaciones en los tumores malignos testiculares, tal como previamente se ha encontrado en los carcinomas de mama y colon y en procesos regenerativos de estructuras vasculares, regulando la proteína endotelial endoglina.^{21,114,176} Por todo ello, el factor transcripcional KLF-6 puede estar implicado en el desarrollo y progresión de los tumores malignos testiculares.

En definitiva, KLF6 es un gen supresor activo en varios tipos de tumores, incluidos los TGCTs., que participa en la regulación de mecanismos implicados en la carcinogénesis y progresión tumoral, ya que se expresa desde los estadios tempranos de la transformación celular. Este hecho también ha sido corroborado en el presente estudio, puesto que KLF6 lo hemos identificado en las células de CIS. KLF6 regula la proliferación y apoptosis de las células tumorales, siendo muy probablemente un oncogén supresor que, cuando se altera -lo que ocurre muy frecuentemente por mutaciones-, juega un papel central en la patogénesis del cáncer, ésto es, la pérdida de ambos alelos de este gen supresor muy probablemente contribuya a la transformación en células genética y fenotípicamente malignas.

Los datos obtenidos en el presente estudio acerca de nuevas moléculas candidatas en la regulación del CIS y los TCGTs. es de relevante importancia y está en consonancia con el las investigaciones que se están realizando en la actualidad sobre el diseño de una batería de genes candidatos oncogénicos en el testículo humano, lo que permitirá diferenciar molecularmente los seminomas de los TCGTs. no-seminomatosos, con un 89% de significación de genes expresados diferentemente. Estos datos moleculares pudieran ayudar a discriminar histológicamente estos dos importantes grupos clínicos y terapéuticos de los TCGTs.¹⁴⁹ Es más, puesto que los TCGTs. no-seminomatosos frecuentemente son mixtos y están constituidos por la combinación de dos o más patrones histológicos, los cuales

habitualmente pueden tener un significado en la evolución clínica, la expresión de diferentes marcadores moleculares pudieran en un futuro predecir incluso el tipo histológico de TCGTs. y de este modo establecer un tratamiento idóneo y específico para cada paciente. De hecho, usando análisis de predicción génica mediante microarrays se han identificado muy recientemente 146 transcritos que permiten clasificar histológicamente los tipos de TCGTs. no-seminomatosos con una seguridad del 93%.¹⁰⁹

La histogénesis de los TCGTs. ha sido motivo de diferentes teorías, sin embargo existe en la actualidad consenso en admitir que existen similitudes entre las células del CIS y las células madre embrionarias, lo que apoya la hipótesis del origen del CIS en gonocitos diferenciados durante el desarrollo embrionario; además esta hipótesis está corroborada por un modelo "experimental" natural en el hombre, como es el complejo síndrome de disgenesia testicular, el cual se desarrolla ya prenatalmente y se caracteriza por criptorquidia, malformaciones genitales, alteraciones de la espermatogénesis y TCGTs.⁹² Así mismo, las células del seminoma tienen características morfológicas que recuerdan a las células primordiales germinales (PGCs.) o gonocitos, y además estas células seminomatosas muestran duplicaciones del cromosoma 12p; por ello, es necesario investigar los genes que están implicados en esta alteración del cromosoma 12p y determinar el porqué esta alteración es predominante en los seminomas testiculares.⁶⁷ Además, el origen gonocitario de los TCGTs., incluido el del CIS, ha sido corroborado por la expresión de el marcador oncofetal denominado AP-2gamma, el cual está presente en los seminomas testiculares y extragonadales y también en los disgerminomas ováricos, siendo mínima su expresión en los carcinomas embrionarios y en los coriocarcinomas y estando ausente en teratomas, tumores del seno endodérmico y en el testículo del hombre adulto normal.¹⁴⁵ Sin duda, los genes de células madre ("stem cell genes") pueden jugar un papel directo en la progresión de diferentes tipos de tumores y ser, además, unos marcadores muy específicos de los procesos carcinogénicos.⁶⁷

La progresión del CIS en un TCGTs. microinfiltrante comporta una migración de las células tumorales en sentido inverso a cómo lo hicieron los gonocitos durante el normal desarrollo embrionario del testículo humano. En este sentido, se sabe que los gonocitos derivan de unas células germinales primordiales (PGCs.)⁵⁰ que se desarrollan en la alantoides y migran hacia la gónada primitiva embrionaria. En un primer momento, los

gonocitos aún permanecen entremezclados con el mesénquima del primitivo cordón espermático y del mesénquima de la futura albugínea testicular, pero después estos gonocitos se disponen en íntima vecindad de las células primitivas de los cordones sexuales. Aproximadamente durante la 5ª semana del desarrollo embrionario humano, las células de los cordones sexuales comienzan a sintetizar laminina y formar así una lámina basal discontinua y después continua.¹¹⁰ Ya durante el inicio del desarrollo fetal humano comienza a diferenciarse células mioides y a sintetizarse colágeno y matriz extracelular¹⁶⁶ y estos cambios se asocian a la transformación de las células indiferenciadas de los cordones en células de Sertoli fetales, constituyéndose así en el recién nacido un tubo seminífero, rodeado por una compleja pared peritubular, la cual se va a terminar de colagenizarse completamente, pero este proceso sólo concluye cuando se alcanza el desarrollo prepuberal.

La progresión del CIS en un tumor germinal microinvasivo determina la infiltración del intersticio intertubular por un número limitado de células malignas; este proceso representan, pues, el primer estadio del desarrollo de una neoplasia testicular agresiva. La realización de biopsias sistemáticas en hombres con alteraciones del descenso testicular han evidenciado la presencia de CIS y tumores germinales microinvasivos en el 1.8% de los casos.²⁰⁹

Recientemente se ha establecido un nuevo concepto en los TCGTs, denominado seminoma intertubular, definido por la presencia de células germinales malignas localizadas en el intersticio testicular y que no forman una verdadera masa modular tumoral macroscópicamente reconocible en el testículo. Dado que las células malignas de estos seminomas intertubulares pueden infiltrar en las tres dimensiones, pueden asimismo representar un importante volumen de células potencialmente agresivas con capacidad infiltre en los vasos linfáticos y sanguíneos intratesticulares antes de que se detecte una masa testicular en la exploración clínica.²⁵ Y esta posibilidad no es despreciable, ya que la presencia de seminoma intertubular es relativamente alta en los seminomas puros y este hallazgo se asocia significativamente a invasión de la rete testis, por ello la presencia de seminomas intertubulares tiene en la actualidad un importante valor pronóstico, no solo en la correcta valoración del tamaño del tumor testicular, sino también en la evolución de los seminomas con estadio clínico I;²⁵ con todo, la presencia de un patrón microinfiltrante de

TCGTs. no determina, por sí mismo, la predicción de la recaída en los pacientes con TGCTs. que se encuentran en estadio I.²⁰⁸

En relación con los mecanismos de microinfiltración de los TCGTs., el estudio de los niveles de mRNA de genes relacionados con invasión han demostrado la presencia de, al menos, dos anomalías génica fundamentales en la invasión: de una parte, los genes de metaloproteinas 9 de la matriz extracelular (MMP9) y activador del plasminógeno; de otra parte, genes de urokinasa (PLAU) que están disregulados cuando se comparan casos que contienen solo CIS con aquellos que tienen un TCGTs.²⁰⁹ Con este fenotipo invasivo de los TCGTs. se han relacionado otras moléculas, tales como las conexinas, diversas ciclinas y genes "homeobox", Las conexinas son proteínas constitutivas de las uniones estrechas ("gap junctions") y se consideran como agentes supresores tumorales. En los seminomas testiculares, se ha encontrado un acúmulo de conexinas, concretamente la Cx43, en el aparato de Golgi, siendo el resultado del propio proceso tumorigénico. Este hallazgo sugiere que la disrupción del tráfico de la conexina Cx43 puede, ella misma, participar en la progresión tumoral¹⁶⁸ En relación con la transformación y progresión de los TCGTs. también se ha mencionado la expresión aberrante de ciclinas de tipo A -que son un factor significativo en la tumorigénesis testicular-; en este sentido, la abundante expresión ectópica de ciclina A1 en TCGTs. no-seminomatosos y su ausencia en el CIS y en los seminomas puede relacionarse con la evolución clínica del paciente.¹¹⁶ Por último, el gen "homeobox" NKX3 es esencial en la función del testículo normal; sin embargo, en los TCGTs., la pérdida de su expresión se asocia intensamente con un claro fenotipo invasivo.¹⁸²

En la progresión del CIS y su transformación en un TCGT infiltrante intervienen, en principio, dos mecanismos patológicos: 1) alteración de las moléculas de adhesión celular (CAMs.) del epitelio seminífero y 2) alteración de la lámina basal y de la pared del tubo seminífero. En relación con las CAMs., las células de Sertoli sintetizan cadherina E y beta-catenina, que se relacionan con las uniones específicas Sertoli-Sertoli y con las uniones Sertoli-espermátides;²⁶ pero también las células de Sertoli sintetizan diferentes tipos de interleuquinas que, como desarrollaremos posteriormente, muy probablemente participen en mecanismos de progresión tumoral a través de la respuesta inmunológica desencadenada por los TCGTs..¹²¹

En el CIS, sin embargo, las células de Sertoli, tanto si son normales, como si son disgenéticas,¹⁵⁹ degeneran y progresivamente pierden la expresión de moléculas de adhesión (CAMs.). Entre estas CAMs., la cadherina E y beta-catenina han sido exploradas en el CIS y en diferentes tipos de TCGTs., no habiéndose encontrado diferencias entre los casos resistentes y sensibles al tratamiento quimioterápico, además la expresión de la cadherina E no se ha correlacionado con el grado de invasión vascular.⁹³ Independientemente de estos últimos datos acerca del significado clínico de las posibles alteraciones de las CAMs. en los TCGTs., el resultado final de la degeneración de la cadherina E y de la beta-catenina es un tubo seminífero de tamaño normal o aumentado, ocupado preferentemente o exclusivamente por células de CIS, formándose así el denominado seminoma intratubular. Estos tubos se distienden notoriamente, lo que desencadena una alteración de la lámina basal y de la pared tubular.

Es bien conocido que la lámina basal del tubo seminífero humano es una estructura íntimamente unida a las células de Sertoli por hemidesmosomas, pero además son las propias células de Sertoli las que sintetizan las tres moléculas principales que constituyen la lámina basal peritubular: laminina, colágeno IV y fibronectina.¹³⁶ En los primeros estadios del CIS, la lámina basal impide la infiltración de las células del CIS, pero en estadios más avanzados, cuando se distienden los tubos seminomatosos, la lámina basal se adelgaza, y, lo que es más importante, las células de Sertoli, ahora desplazadas hacia la luz, son incapaces de sintetizar de modo adecuado las moléculas constitutivas de la lámina basal. Se origina así una degeneración multifocal de la lámina basal, produciéndose soluciones de continuidad que facilitan la migración de los gonocitos neoplásicos. Ante esta invasión, degenera la matriz extracelular por posible incremento de metaloproteinasas,¹⁹³ y se destruyen las fibras elásticas y las células mioideas de la pared peritubular; a su vez, se produce una respuesta inmunológica local -debido a la disrupción de la barrera hemato-testicular- alrededor de los tubos con CIS microinfiltrante.

En relación con el desencadenamiento de esta respuesta inmunológica, investigaciones previas del laboratorio donde hemos realizado el presente estudio han demostrado que la respuesta de células inmunocompetentes en los diferentes tipos histológicos de TCGTs. es fundamentalmente de linfocitos T y macrófagos, siendo menor el número de linfocitos B y de células plasmáticas.^{34,196} En el presente trabajo, hemos precisado que alrededor de los

tubos con CIS, al igual que ocurre en los grandes nódulos de TCGTs., existe una mayor proporción de linfocitos CD 4 que de CD 8. Es probable que las células del CIS puedan sintetizar interleuquinas y otras linfoquinas, aún no bien precisadas, que favorezcan la migración de linfocitos hacia las áreas de microinfiltración tumoral; además, las linfoquinas sintetizadas podrían participar en los mecanismos de degeneración de la matriz de la pared peritubular y del intersticio testicular, lo que facilitaría también la progresión del CIS. Es en esta pared peritubular alterada, infiltrada por células de CIS y rodeada de lincoitos T, donde se inician los mecanismos de angiogénesis mediados por VEGF. En efecto, en el presente estudio de TCGTs. hemos encontrado una alta expresión de los tres receptores de VEGF en el citoplasma de las células tumorales, incluidas las células de CIS, pero también su expresión ha sido muy evidente en las células endoteliales aisladas y en los angiotubos y capilares neoformados,. Curiosamente, alrededor de los tubos seminíferos con seminoma intratubular, los angiotubos están frecuentemente rodeados por una corona de linfocitos T (CD4 y CD8 positivos) e, incluso, estos linfocitos T migran entre las células tumorales y a través de las células endoteliales neoformados. Estos datos sugieren, al igual que se ha publicado previamente en otros tumores,¹³⁹ una relación íntima entre las células inmunocompetentes y la actividad de síntesis de receptores de VEGF; esto es, entre los mecanismos de angiogénesis y de inmunología tumoral presentes en la pared de los tubos seminíferos con CIS y seminomas intratubulares. Por último, en relación con los vasos linfáticos en los TCGTs., también hemos identificado en las células de CIS un receptor VEGF denominado Flt-4, el cual se expresa en el endotelio linfático normal y en los linfáticos presentes en el interior de los nódulos infiltrantes de TCGTs..¹⁰²

En definitiva, la distribución heterogénea de los microvasos en los TCGTs, junto con la localización de la actividad de angiogénesis asociada al tejido de granulación, presente en la mayoría de las áreas de necrosis, permite concluir que la cuantificación de la microvascularización debe ser realizada por histólogos expertos y sólo en áreas seleccionadas aleatoriamente, pero dentro de nódulos tumorales activos, los cuales potencialmente tienen una alta capacidad infiltrante y metastatizante, y, por el contrario, estas cuantificaciones no deberán realizarse en las áreas de tejido necrótico y de granulación. De este modo, el método aleatorio de cuantificación de los microvasos usado en el presente estudio permitirá establecer una adecuada comparación entre el grado de angiogénesis de los TCGTs. y el grado de angiogénesis desarrollado en otros tumores

germinales no testiculares, como pueden ser los disgerminomas y carcinomas embrionarios del ovario y también los tumores germinales extragonadales del retroperitoneo, del mediastino o de la glándula pineal.

Los datos de la presente Tesis sugieren que la angiogénesis es un mecanismo que no está significativamente incrementado en los TCGTs., lo que puede explicar la alta incidencia de necrosis presente en estos tumores. Además, hemos encontrado sugestivas relaciones entre la respuesta de células inmunocompetentes y los procesos de angiogénesis en los TCGTs. La expresión de distintos receptores de VEGF en las células endoteliales y microvasos intratumorales y también en el citoplasma del CIS y de los distintos tipos de células neoplásicas presentes en los TCGTs. sugiere que las células tumorales están directamente implicadas en los procesos de regulación de la angiogénesis en los tumores testiculares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. La angiogénesis es significativamente mayor en el seminoma y en los tumores del seno endodérmico que en los carcinoma embrionarios testiculares; sin embargo, la densidad total de microvasos es significativamente menor en los tumores de células germinales testiculares (TCGTs.), cuando se compara con el testículo humano normal del grupo control. Estos datos se relacionan con la alta frecuencia de extensas áreas de necrosis presentes en los TCGTs..

SEGUNDA Existen relaciones entre la respuesta de células inmunocompetentes y los procesos de angiogénesis en los TCGTs.

TERCERA. La expresión de distintos receptores de VEGF en las células endoteliales y microvasos intratumorales y también en el citoplasma del CIS y de los distintos tipos histológicos de TCGTs. sugiere que las células tumorales están directamente implicadas en los procesos de angiogénesis.

CUARTA. La cuantificación de la microvascularización debe ser realizada exclusivamente en áreas seleccionadas aleatoriamente, pero dentro de nódulos tumorales activos y no en las áreas de tejido necrótico y de granulación.

QUINTA. En la progresión del cáncer testicular primariamente pudieran estar implicadas nuevas moléculas con posible capacidad oncogénicas expresadas en el CIS y en los TCGTs., entre estas moléculas se encuentran el protooncogén PCPH, el gen PTOV-1 y factor de transcripción y supresión tumoral Kruppel-like factor 6.

SEXTA. La progresión del CIS y su transformación en un TCGTs. microinfiltrante conlleva cambios histológicos de las células de Sertoli, con alteración de la expresión de moléculas de adhesión celular, y también determinadas alteraciones de la pared peritubular, con infiltración de células inmunocompetentes, predominantemente linfocitos CD4 y CD8 positivos.

RESUMEN

RESUMEN

En el presente estudio se investiga el posible aumento de la angiogénesis en los tumores de células germinales testiculares (TCGTs) especialmente en los seminomas, carcinomas embrionarios y tumores del seno endodérmico, evaluando la expresión del marcador de células endoteliales CD 34 y de alfa-actina, específica de músculo liso. El estudio morfométrico realizado en nuestro laboratorio demostró que la angiogénesis en los TCGTs es escasa en comparación con la microvascularización del testículo normal, siendo mayor la densidad de volumen (Dv) de los microvasos en los seminomas que en los TCGTs no seminomatosos. Se comprobó que el infiltrado de linfocitos es muy importante en los TCGTs. Los linfocitos T son más abundantes en los seminomas que en los TCGTs no-seminomatosos, siendo mayor el número de linfocitos CD4+. Los linfocitos T -CD4 y CD8 positivos se disponen próximos a los microvasos y también en estrecho contacto con las células tumorales, lo que sugiere un singular participación de las células inmunocompetentes en la regulación de la angiogénesis de los TCGTs.

Además, estos hallazgos se correlacionan con la evidente expresión de los receptores VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR y VEGFR-3/FLT-4, los cuales se identifican en todos los capilares del testículo normal y también en los vasos neoformados de los TCGTs. La presencia de estos distintos receptores del VEGF en las células tumorales de los TCGTs sugiere un papel autócrino angiogenético de VEGF en los tumores de testículo. Si bien en el presente trabajo se ha demostrado un evidente desarrollo de angiogénesis inducida directamente por los TCGTs., la relativamente baja Dv de los microvasos cuantificados en estas las neoplasias testiculares puede relacionarse con el desarrollo de hemorragia y necrosis, hallazgos muy frecuentes en los TCGTs. Se demuestra, así mismo, la expresión de nuevas moléculas (PCPH, PTOV-1, y KLF-6) en el CIS y en diferente tipos de TCGTs., las cuales pudieran estar implicadas en mecanismo diferenciación, proliferación y progresión del cáncer testicular.

Palabras Claves: tumores testiculares, angiogénesis, receptores de VEGF, CD 34, linfocitos, CIS.

SUMMARY

SUMMARY

In this study, the possible increase in angiogenesis in carcinoma in situ (CIS) and different testicular germ cell tumors (TGCTs) in particular in seminoma, embryonal carcinoma and yolk sac tumors, has been investigated. The expression of the endothelial cell marker CD34 and the smooth muscle cell marker α -actin has been studied to determine the development of blood vessels, and has been evaluated by semiautomatic morphometry. Morphometrical analysis has demonstrated that angiogenesis in TGCTs is scarce in comparison with normal testis vascularization, being the density of microvascularization higher in seminoma than in non-seminomatous tumors. In these tumors, the T lymphocytic infiltrate is very important, being more abundant in seminoma than in non-seminomatous tumors, and with higher CD4 than CD8 T lymphocyte numbers. CD4 and CD8 T lymphocytes are located in the vicinity of blood vessels, and also in close contact with the tumor cells, suggesting a role of T lymphocytes in the regulation of angiogenesis in TGCTs

This study demonstrates a marked angiogenesis induced by the TGCTs development, but with a low vessel density by morphometric quantification. Both observations can be related to the development of hemorrhage and necrosis, which are frequent findings in TGCTs.

In addition, high expression of the receptors for the angiogenic growth factor VEGF (VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR and VEGFR-3/FLT-4) has been detected in capillaries of both the normal testis vasculature and in TGCTs newly formed vessels. The presence of these receptors suggests an autocrine angiogenetic role for VEGF in TGCTs.

The present study also demonstrates the expression of new molecules (PCPH, PTOV-1, and KLF-6) in CIS and in different TGCTs, which can be involved in proliferation, differentiation and cancer progression processes in testicular germ cell tumors.

Key words: testicular tumors, CIS, angiogenesis, VEGF receptors, CD34, lymphocytes, PCPH, PTOV-1, KLF-6.

REFERENCIAS

1. **Aaronson SA.** Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146-1153.
2. **Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, Zantonski W, Storm H, Ekblom A, Tresi S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M.** Testicular cancer in nine northern European Countries. *Int J Cancer* 1994;59:3-38.
3. **Alam M, Ratner D.** Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001;344:975-983.
4. **Albers P, Orazi A, Ulbright TM, Miller GA, Haidar JH, Donohue JP, Foster RS.** Prognostic significance of immunohistochemical proliferation markers (Ki-67/MIB-1 and proliferation associated nuclear antigen), p53 protein accumulation, and neovascularization in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumours. *Mod Pathol* 1995;8:492-497.
5. **Avila MA, Velasco JA, Cho Ch, Lupu R, Wen D, Notario V.** Hyperactive autocrine loop mediated by a NDF-related factor in neoplastic hamster embryo fibroblasts expressing an activated *cph* oncogene. *Oncogene* 1995;10:963-971.
6. **Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG.** Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71:1368-1383.
7. **Bacus SS, Gudkov AV, Zelnick CR, Chin D, Stern R, Stancovski I, Peles E, Ben-Baruch N, Farbstein H, Lupu R.** New differentiation factor /heregulin induces expression of intercellular adhesion molecule 1: Implications for mammary tumors. *Cancer Res* 1993; 53:5251-5261.
8. **Balmain A, Brown K.** Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1988;51:147-182.
9. **Barbacid M.** *Ras* genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-782.
10. **Barrett JC, Hesterberg TW, Thomassen DG.** Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 1984; 36:53s-70s.
11. **Basset-Seguín N, Dereure O, Guillot B.** Genetic bases of cutaneous tumors. *Ann Dermatol Venereol* 1995;122:217-225.
12. **Bassukas ID, Vester G, Maurer-Schultze B.** Cell kinetic studies of endothelial cells in the adenocarcinoma EO 771 and the effect of cyclophosphamide. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1990;59:251-256.
13. **Beck SD, Foster RS, Bihrlé R, Cheng L, Donohue JP.** Does the histology of nodal metastasis predict systemic relapse after retroperitoneal lymph node dissection in pathological stage B1 germ cell tumors?. *J Urol* 2005;174:1287-1290.
14. **Beck SD, Foster RS, Bihrlé R, Cheng L, Ulbright TM, Donohue JP.** Impact of the number of positive lymph nodes on disease-free survival in patients with pathological stage B1 nonseminomatous germ cell tumor. *J Urol* 2005;174:143-145.
15. **Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ.** Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995;6:3-16.
16. **Bhardwa JM, Powles T, Berney D, Baithun S, Nargund VH, Oliver RT.** Assessing the size and stage of testicular germ cell tumours: 1984-2003. *BJU Int* 2005;96:819-821.
17. **Bishop JM.** Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-248.
18. **Blázquez MJ, Regadera J, Mariño J, Newman RE, Notario V.** Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia. *Mol Carcinog* 2002;35:186-195.
19. **Borek C, Ong A, Mason H.** Distinctive transforming genes in x-ray-transformed mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:794-798.
20. **Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML.** Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23:755-761.
21. **Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodríguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman PM, Ratzu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S, Bernabeu C.** Transcriptional activation of endoglin and

- transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 2002;100:4001-4010.
22. **Boyd JA, Barrett JC.** Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 1990;46:469-486.
 23. **Brash DE, Ziegler A, Honason AS.** Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;1:136-142.
 24. **Broach JR, Levie AJ.** Oncogenes and cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:1-6.
 25. **Browne TJ, Richie JP, Gilligan TD, Rubin MA.** Intertubular growth in pure seminomas: associations with poor prognostic parameters. *Hum Pathol* 2005;36:640-645.
 26. **Cameron DF, Griffin FC.** Ultrastructure of Sertoli-Germ Cell Interactions in the Normal and Pathologic Testis. In: Francisco Martínez-García and Javier Regadera (eds): Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Churchill Communications Europe España, Madrid, 1998. pp: 229-242.
 27. **Campbell SC.** Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997;158:1663-1674.
 28. **Cannon CE, Golmer TM, Coutts SB.** Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev* 1995;9:600-611.
 29. **Carmignani L, Morabito A, Gadda F, Bozzini G, Rocco F, Colpi GM.** Prognostic parameters in adult impalpable ultrasonographic lesions of the testicle. *J Urol* 2005;174:1035-1038.
 30. **Carnochan P, Briggs JC, Westbury G, Davies AJ.** The vascularity of cutaneous melanoma: a quantitative histological study of lesions 0.85-1.25 mm in thickness. *Br J Cancer* 1991;64:102-107.
 31. **Carrel S, Johnson JP.** Immunologic recognition of malignant melanoma by autologous T lymphocytes. *Curr Opin Oncol* 1993;5:383-389.
 32. **Carson DA, Ribeiro JA.** Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-1254.
 33. **Cartun RW, Pedersen CA.** An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin horseradish peroxidase conjugate. *J Histotechnol* 1989;12:273-279.
 34. **Casanova JF, Torres A, Martínez-García F, Hardisson D, Nistal M, Regadera J.** Statistical considerations on the methodology of immunocompetent cells quantification in tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:227-234.
 35. **Castedo M, Ferri KF, Blanco J, Roumier T, Larochette N, Barretina J, Amendola A, Nardacci R, Mètivier D, Este JA, Piacentini M, Kroemer G.** Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J Exp Med* 2001;194:1097-1110.
 36. **Castora FJ.** Western Blotting of proteins. *Clin Biotechnol* 1989;1:43-49.
 37. **Cheng L.** Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT4 immunohistochemistry. *Cancer* 2004; 101:2006-2010.
 38. **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.
 39. **Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J.** Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* 1980;192:762-771.
 40. **Clark WH, Elder DE, van Horn M.** The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986;7:443-450.
 41. **Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D.** Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-1545.
 42. **Cobo P, Martínez-García F, Regadera J.** Microvessels in the human cryptorchid testis. In: Martínez-García F, Regadera J

- (eds.): Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Churchill Communications Europe España, Madrid, 1998; 212-223.
43. **Codesal J, Paniagua R, Regadera J, Nistal M.** Cytophotometric quantification of DNA in spermatogenic cells. *Mol Androl* 1991;3:201-226.
 44. **Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J.** Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84: 1470-1478.
 45. **Cools M, van Aerde K, Kersemaekers AM, Boter M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Steyerberg EW, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5295-5303.
 46. **Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL.** Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997;57:5281-5285.
 47. **Curtin JC, Spinella MJ.** p53 in human embryonal carcinoma: identification of a transferable, transcriptional repression domain in the N-terminal region of p53. *Oncogene* 2005;24:1481-1490.
 48. **Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K.** Cellular architecture of lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990;262:253-261.
 49. **De Jong J, Stoop H, Dohle GR, Bangma CH, Kliffen M, van Esser JW, van den Bent M, Kros JM, Oosterhuis JW, Looijenga LH.** Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2005;206:242-249.
 50. **De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ.** Dissection of the c Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;16:10458-10463.
 51. **De Miguel MP, Mariño JM, González-Peramato P, Nistal M, Regadera J.** Epididymal growth and differentiation is altered in human cryptorchidism. *J Androl* 2001;22:212-225.
 52. **D'Errico M, Calcagnile AS, Corona R.** p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res* 1997;57:747-752.
 53. **De Vita V, Hellman S, Rosenberg A.** Cancer. Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia. Lippincott-Raven. 1997. p 130.
 54. **Dieckmann KP, Albers P, Classen J, De Wit M, Pichlmeier U, Rick O, Mullerleile U, Kuczyk M.** Late relapse of testicular germ cell neoplasms: a descriptive analysis of 122 cases. *J Urol* 2005;173:824-829.
 55. **Dieckmann K-P, Skakkebaek NE.** Carcinoma in situ of the testis: Review of biological and clinical features. *Int J Cancer* 1999;83:815-822.
 56. **Di Paolo JA.** Relative difficulties in transforming human and animal cells in vitro. *J Natl Cancer Ins* 1983;70:3-8.
 57. **Di Paolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J.** Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 1989;4:395-399.
 58. **Di Vizio D, Cito L, Boccia A, Chieffi P, Insabato L, Pettinato G, Motti ML, Schepis F, D'Amico W, Fabiani F, Tavernise B, Venuta S, Fusco A, Viglietto G.** Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene* 2005;24:1882-1894.
 59. **Düe W, Dieckmann KP, Loy V.** Immunohistological determination of proliferative activity in seminomas. *J Clin Pathol* 1988;41:304-307.
 60. **Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146: 1029-1039.
 61. **Eguchi Y, Srivanasan A, Tomaselli KJ, Shimizu S, Tsujimoto Y.** ATP-

- dependent steps in apoptotic signal transducción. *Cancer Res* 1999;59:2174-2181.
62. **Ergun S, Davidoff M, Holstein AF.** Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell Tissue Res* 1996;286:93-102.
 63. **Ergün S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK.** Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 1997;131:9-20.
 64. **Ergün S, Kilic N, Harneit S, Paust HJ, Ungefroren H, Mukhopadhyay A, Davidoff M, Holstein AF.** Microcirculation and the vascular control of the testis. In *The Fate of the Male Germ Cell*, Ivell G, Holstein AF (eds), Plenum Press, NY, 1997a; 163-180.
 65. **Ergün S, Stingl J, Holstein AF.** Segmental angioarchitecture of the testicular lobule in man. *Andrologia* 1994;26:143-150.
 66. **Ergun S, Stingl J, Holstein AF.** Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* 1994;26:235-262.
 67. **Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT.** Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005;104:2255-2265.
 68. **Ferrara N, Henzel WJ.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
 69. **Folkman J, Klagsbrun M.** Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
 70. **Folkman J, Shing Y.** Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-10834.
 71. **Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D.** Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
 72. **Fossa SD, Chen J, Schonfeld SJ, McGlynn KA, McMaster ML, Gail MH, Travis LB.** Risk of contralateral testicular cancer: a population-based study of 29,515 U.S. men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1056-1066.
 73. **Freedman LS, Midthune DN, Brown CC, Steele V, Kelloff GJ.** Statistical analysis of animal cancer chemoprevention experiments. *Biometrics* 1993; 49:259-268.
 74. **Freedman LS, Parkinson MC, Jones WG, Oliver RT, Peckman MJ, Read G, Newlands ES, Williams CJ.** Histopathology in the predication of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone. *Lancet* 1987;2:294-298.
 75. **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.
 76. **Galaz S, Espada J, Stockert JC, Pacheco M, Sanz-Rodriguez F, Arranz R, Bello S, Canete M, Villanueva A, Esteller M, Juarrnáz A.** Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. *J Cell Physiol* 2005;205:86-96.
 77. **Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ.** Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of non melanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1995;131:164-169.
 78. **García-Tamayo G, Hernández C.** Aplicación del anticuerpo CD34 en el diagnóstico diferencial de los tumores fusocelulares. *VITAE* 2002;11:1-32.
 79. **Garven TC, Thelmo WL, Victor J, Pertschuk L.** Verrucous carcinoma of the leg positive for human papillomavirus DNA 11 and 18. A case report. *Hum Pathol* 1991;22:1170-1172.
 80. **Gilmer TM, Annab LA, Barret JC.** Characterization of activated proto-oncogenes in chemically transformed Syrian hamster embryo cells. *Mol Carcinogen* 1988;1:180-188.
 81. **Graninger WB, Seto M, Boutain B.** Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion

- transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 1987;80:1512-1515.
82. **Greenhalgh DA, Wang X-J, Roop DR.** Multistage epidermal carcinogenesis in transgenic mice: Cooperativity and paradox. *J Invest Dermatol Sympos Proc* 1996;1:162-176.
 83. **Hameister H, Adolph S.** Oncogenes and the mammalian X chromosome. *Hum Genet* 1986;72:241-244.
 84. **Harris AL.** Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Rev Cancer* 2002;2:38-47.
 85. **Harris CC.** Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991;51:5023s-5044s.
 86. **Hattab EM, Tu PH, Wilson JD, Cheng L.** OCT4 immunohistochemistry is superior to placental alkaline phosphatase (PLAP) in the diagnosis of central nervous system germinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:368-371.
 87. **Henegariu O, Heerema NA, Thurston V, Jung SH, Pera M, Vance GH.** Characterization of gains, losses, and regional amplification in testicular germ cell tumor cell lines by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:14.
 88. **Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H.** Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987;56:461-474.
 89. **Ho WH, Armanini MP, Nuijens A, Phillips HS, Osheroff PL.** Sensory and motorneuron-derived factor: A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 1995;270:14523-14532.
 90. **Hockenberry DM.** Defining apoptosis. *Am J Dermatopathol* 1995;146:16-19.
 91. **Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Sonne SB, Graem N, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E.** Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:8521-8530.
 92. **Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Dugaard G, Skakkebaek NE.** Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Ann Oncol* 2005;16:863-868.
 93. **Honecker F, Kersemaekers AM, Molier M, Van Weeren PC, Stoop H, De Krijger RR, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis W, Bokemeyer C, Looijenga LH.** Involvement of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. *J Pathol* 2004;204:167-174.
 94. **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
 95. **Hunter T, Pines J.** Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitor come of age. *Cell* 1994;79:573-582.
 96. **Hutchinson F.** induction of tandem base change mutations. *Mutat Res* 1994;309:11-15.
 97. **Huyghe E, Matsuda T, Daudin M, Chevreau C, Bachaud JM, Plante P, Bujan L, Thonneau P.** Fertility after testicular cancer treatments: results of a large multicenter study. *Cancer* 2004;100:732-737.
 98. **Huyghe E, Soulie M, Escourrou G, Mieusset R, Plante P, Thonneau P.** Conservative management of small testicular tumors relative to carcinoma in situ prevalence. *J Urol* 2005;173:820-823.
 99. **Jacobsen GK, Talerman A.** Atlas of germ cell tumors. Munksgaard, Copenhagen, 1989.
 100. **Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N.** Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-253.
 101. **Jewett MA, Grabowski A, McKiernan J.** Management of recurrence and follow-up strategies for patients with nonseminoma testis cancer. *Urol Clin North Am* 2003;30:819-830.
 102. **Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Turley H, Valtola R, Bicknell R, Harris AL.** Angiogenesis and lymphangiogenesis in

- stage 1 germ cell tumours of the testis. *BJU Int* 2000;86:80-86.
103. **Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Baldrige LA, Cheng L.** OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:935-940.
104. **Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L.** OCT4: A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8544-8547.
105. **Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC.** KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* 2004;164:305-313.
106. **Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Li N, DiRenzo J, Spinella MJ.** A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene* 2005;24:6090-6100.
107. **Kernek KM, Ulbright TM, Zhang S, Billings SD, Cummings OW, Henley JD, Michael H, Brunelli M, Martignoni G, Foster RS, Eble JN, Cheng L.** Identical allelic losses in mature teratoma and other histologic components of malignant mixed germ cell tumors of the testis. *Am J Pathol* 2003;163:2477-2484.
108. **Kilic N, Fiedler W, Holstein AF, Ergün S.** Expression of VEGF and its receptors and capillary density in Leydig cell tumors of the human testis. In: *The Fate of the Male Germ Cell*. Ivell G, Holstein AF (eds), Plenum Press, NY, 1997; 181-182.
109. **Korkola JE, Houldsworth J, Dobrzynski D, Olshen AB, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS.** Gene expression-based classification of nonseminomatous male germ cell tumors. *Oncogene* 2005;24:5101-5107.
110. **Kuopio T, Paranko J, Pelliniemi LJ.** Basement membrane and epithelial features of fetal-type Leydig cells in rat and human testis. *Differentiation* 1989;40:198-206.
111. **Lahti JM, Xiang J, Heath LS.** PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995;15:1-11.
112. **Lairmore TC, Norton JA.** Advances in molecular genetics. *Am J Surg* 1997; 173:37-41.
113. **Levine AJ, Prerry ME, Chang A.** The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69: 409-416.
114. **Li D, Yea S, Dolios G, Martignetti JA, Narla G, Wang R, Wlsh MJ, Friedman SL.** Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation. *Cancer Res* 2005;65:9216-9225.
115. **Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, Sonobe H.** Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch* 1999;434:193-199.
116. **Liao C, Li SQ, Wang X, Muhrad S, Bjartell A, Wolgemuth DJ.** Elevated levels and distinct patterns of expression of A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in male germ cell tumors. *Int J Cancer* 2004;108:654-664.
117. **Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM.** Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34:997-1004.
118. **Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG.** Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-336.
119. **Loganzo F Jrk Dosik JS, Zhao Y.** Elevated expression of protein tyrosine kinase c-Yes, but not c-Sc, in human malignant melanoma. *Oncogene* 1993;8: 2637-2644.
120. **Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, de Gouveia Brazao CA, Weber RF, Kirkels WJ, van Dijk T, von Lindern M, Valk P, Lajos G, Olah E, Nesland JM, Fossa SD, Oosterhuis JW.** Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors.

- Cancer Res* 2003;63:7674-7678.
121. **Lui W-Y, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY.** Adherens junction dynamics in the testis and spermatogenesis. *J Androl* 2003;24:1-14.
 122. **Lutke Holzik MF, Storm K, Sijmons RH, D'hollander M, Arts EG, Verstraaten ML, Sleijfer DT, Hoekstra HJ.** Absence of constitutional Y chromosome AZF deletions in patients with testicular germ cell tumors. *Urology* 2005;65:196-201.
 123. **Marti HH, Risau W.** Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15809-15814.
 124. **Massegue J.** The transforming growth factor β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
 125. **Miao HQ, Soker S, Feiner L, Alonso JL, Raper JA, Klagsbrun M.** Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: Functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 1999;146:233-242.
 126. **Mickisch GH.** Prognostic parameters for the management of advanced testis tumors. *Curr Opin Urol* 2000;10:465-471.
 127. **Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB.** *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989;108:671-682.
 128. **Millauer B, Wizigmann SV, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A.** High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.
 129. **Miller MV, Herdson PB, Hitchcock GC.** Malignant melanoma of the uveal tract. A review of the Auckland experience. *Pathology* 1985;17:281-284.
 130. **Miskish GHJ.** Prognostic parameters for the management of advanced testis tumors. *Curr Opin Urol* 2000;10:465-471.
 131. **Montironi R, Magi Galluzzi C, Scarpelli M, Giannulis I, Diamanti L.** Occurrence of cell death (apoptosis) in prostatic intra-epithelial neoplasia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:351-357.
 132. **Mosharafa AA, Foster RS, Leibovich BC, Ulbright TM, Bihle R, Einhorn LH, Donohue JP.** Histology in mixed germ cell tumors. Is there a favorite pairing?. *J Urol* 2004;171:1471-1473.
 133. **Nacov E.** Tumour angiogenesis formation of vessels de novo at germ cell tumors. *Cancer* 1990;66:916-922.
 134. **Narla G, Di Feo A, Yao S, Banno A, Hod E, Reeves HL, Oiao, RF, Camacho-Vanegas O, Levine A, Kirschenbaum A, Chan AM, Firedman SL, Martignetti JA.** Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res* 2005;65:5761-5768.
 135. **Nistal M, González-Permató P, Regadera J.** Anatomía Patológica de las neoplasias testiculares. En: Resel Estévez L, Moreno Sierra J: "Tratado de Urología Oncológica". Tomo II. Ed. Grupo Saned. Madrid 2003. pp: 977-996.
 136. **Nistal, M., Paniagua, R.** Non-neoplastic diseases of the testis. Chap. 10. In: Urologic Surgical Pathology. Bostwick D.G y Eble, J.N. eds. Mosby-Year Book Inc. St. Louis. 1997, pp. 457-565.
 137. **Notario V, Castro R, Flessate DM, Doniger J, DiPaolo JA.** Frequent activation of non-ras transforming sequences in neoplastic Syrian hamster cells initiated with chemical carcinogens. *Oncogene* 1990;5:1425-1430.
 138. **Notario V, Di Paolo JA.** Molecular aspects of neoplasia of Syrian hamster cells transformed in vitro by chemical carcinogens. *Toxicol Lett* 1998;96-97:221-230.
 139. **Ohtani H, Nagura H.** Differing microvasculature in the two major types of gastric carcinoma: a conventional, structural and ultrastructural immuno localization study of von Willebrand factor. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417:29-35.
 140. **Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS,**

- Radomska HS, Gonzalez DA, Tenen DG, Akashi K. Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:6246-6251.
141. Olivarez D, Ulbright T, DeRiese W, Foster R, Reister T, Einhorn L, Sledge G. Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994; 54:2800-2802.
142. Oliver RT, Mason MD, Mead GM, von der Maase H, Rustin GJ, Joffe JK, de Wit R, Aass N, Graham JD, Coleman R, Kirk SJ, Stenning SP, MRC TE19 collaborators and the EORTC 30982 collaborators. Radiotherapy versus single-dose carboplatin in adjuvant treatment of stage I seminoma: a randomised trial. *Lancet* 2005;366:293-300.
143. Páez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario V. Identity between the PCPH proto-oncogene and de CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int J Oncol* 2001; 19:1249-1254.
144. Patel MI, Motzer RJ, Sheinfeld J. Management of recurrence and follow-up strategies for patients with seminoma and selected high-risk groups. *Urol Clin North Am* 2003;30:803-817.
145. Pauls K, Jager R, Weber S, Wardelmann E, Koch A, Buttner R, Schorle H. Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int J Cancer* 2005;115:470-477.
146. Pérez-Tamayo R. Introducción a la patología: mecanismos de la enfermedad. Ed.: Panamericana, Buenos Aires 1987.
147. Perkins W, Campbell I, Leigh I, Mackie R. Keratin expression in normal skin and epidermal neoplasms demonstrated by a panel of monoclonal antibodies. *J Cutan Pathol* 1984;19:449-452.
148. Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization *in vivo* and endothelial proliferation *in vitro* by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* 1984;51:635-642.
149. Port M, Schmelz HU, Stockinger M, Sparwasser C, Albers P, Pottek T, Abend M. Gene expression profiling in seminoma and nonseminoma. *J Clin Oncol* 2005;23:58-69.
150. Qu-Hong, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the albuminal plasma membrane and vesiculo-vascular organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 1995;43:381-389.
151. Rajpert- De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Barket J, Skakkebaek NE. The emerging phenotype of testicular carcinoma *in situ* germ cell. *APMIS* 2003;111:252-265.
152. Raman JD, Nobert CF, Goldstein M. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol* 2005;174:1819-1822.
153. Read G, Stenning SP, Cullen MH, Parkinson MC, Horwich A, Kaye SB, Cook PA. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. *J Clin Oncol* 1992;10:1762-1768.
154. Recio JA, Paez JG, Maskeri B, Loveland M, Velasco JA, Notario V. Both normal and transforming PCPH proteins have guanosine diphosphatase activity but only the oncoprotein cooperates with ras in activating extracellular signal-regulated kinase ERK1. *Cancer Res* 2000; 60: 1720-1728.
155. Recio JA, Páez JG, Sanders S, Karakami T, Notario V. Partial depletion of intracellular ATP mediates the stress-survival function of the pcpH oncoprotein. *Cancer Res* 2002;62:2690-2694.
156. Recio JA, Zambrano N, Peña L, Powers C, Siwarski D, Huppi K, Notario V. CDNA isolation, expression and chromosomal localization of the mouse PCPH proto-oncogene. *Mol Carcinog* 1999;26:130-136.
157. Recio JA, Zambrano N, Peña L, Reig JA, Rhoads A, Rouzaut A, Notario V. The human PCPH proto-oncogene:

- cDNA identification, primary structure, chromosomal mapping, and expression in normal and tumor cells. *Mol Carcinog* 2000;27:1455-1463.
158. **Regadera J, Blaquez MJ, Gonzalez-Peramato P, Nistal M, Miller JC, Tirado OM, Notario V.** PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. *Int J Oncol* (en prensa)
159. **Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suarez-Quian C.** Androgen Receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:413-421.
160. **Regadera J, Martinez-Garcia F, Paniagua R, Nistal M.** Androgen insensitivity syndrome. An immunohistochemical, ultrastructural, and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:225-234.
161. **Regadera J, Nistal M, Paniagua R.** Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:663-667.
162. **Reinhold HS, Van Den Berg-Blok A.** Factors influencing the neovascularization of experimental tumours. *Biorheology* 1984;21:493-501.
163. **Reuter VE.** Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* 2005;18(Suppl 2):S51-60.
164. **Rich T, Allen RL, Wyllie AH.** Defying death after DNA damage. *Nature* 2000;407:777-783.
165. **Roberts WG, Palade GE.** Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
166. **Robinson LL, Townsend J, Anderson RA.** The human fetal testis is a site of expression of neurotrophins and their receptors: regulation of the germ cell and peritubular cell population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3943-3951.
167. **Roger C, Lambard S, Bouskine A, Mograbi B, Chevallier D, Nebout M, Pointis G, Carreau S, Fenichel P.** Estrogen-induced growth inhibition of human seminoma cells expressing estrogen receptor beta and aromatase. *J Mol Endocrinol* 2005;35:191-199.
168. **Roger C, Mograbi B, Chevallier D, Michiels JF, Tanaka H, Segretain D, Pointis G, Fenichel P.** Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. *J Pathol* 2004; 202:241-246.
169. **Ronnen EA, Kondagunta GV, Bacik J, Marion S, Bajorin DF, Sheinfeld J, Bosl GJ, Motzer RJ.** Incidence of late-relapse germ cell tumor and outcome to salvage chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:6999-7004.
170. **Rouzaut A, Recio JA, Notario V.** Expression of the protein product of the PCPH proto-oncogene in human tumor cell lines. *Radiat Res* 2001;155:181-187.
171. **Ruiter DJ, Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM.** Monoclonal antibody-defined human endothelial antigens as vascular markers. *J Invest Dermatol* 1989;93(Suppl 2):25S-32S.
172. **Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, Von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H.** Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors *Am J Pathol* 1998;153:103-108.
173. **Sano M, Nakanishi Y, Yagasaki H, Honma T, Oinuma T, Obana Y, Suzuki A, Nemoto N.** Overexpression of anti-apoptotic Mcl-1 in testicular germ cell tumours. *Histopathology* 2005;46:532-539.
174. **Santamaria A, Castellanos E, Gomez V, Benedit P, Renau-Piqueras J, Morote J, Reventos J, Thomson TM, Paciucci R.** PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol Cell Biol* 2005;25:1900-1911.
175. **Santamaria A, Fernandez PL, Farre X, Benedit P, Reventos J, Morote J, Paciucci R, Thomson T.** PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm

- and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle. *Am J Pathol* 2003;162:897-905.
176. **Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C.** Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 2004;279:32858-32868.
177. **Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ.** Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by smooth vascular muscle cells during angiogenesis in tumours and in healing wounds. *Am J Pathol* 1990;136:1393-1405.
178. **Schor AM, Schor SL.** Tumour angiogenesis. *J Pathol* 1983;141:385-413.
179. **Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB.** In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implication for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:316-322.
180. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845.
181. **Sillman F, Boyce J, Fruchter R.** The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:154-159.
182. **Skotheim RI, Korkmaz KS, Klokk TI, Abeler VM, Korkmaz CG, Nesland JM, Fossa SD, Lothe RA, Saatcioglu F.** NKX3.1 expression is lost in testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 2003;163:2149-2154.
183. **Skotheim RL, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fossa SD, Duale N, Brunborg G, Kallioniemi O, Andrews PW, Lothe RA.** Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res* 2005;65:5588-5598.
184. **Solanas M, Escrich E, Rouzaut A, Costa I, Martinez A, Notario V.** Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylben (a) anthracene. *Mol Carcinog* 2002;155:181-187.
185. **Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, Tannapfel A.** Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 2005;113:329-335.
186. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
187. **Spierings DC, de Vries EG, Stel AJ, te Rietstap N, Vellenga E, de Jong S.** Low p21Waf1/Cip1 protein level sensitizes testicular germ cell tumor cells to Fas-mediated apoptosis. *Oncogene* 2004;23:4862-4872.
188. **Spruck CH III, González-Zulueta M, Shibata A.** p16 gene in uncultured tumors. *Nature* 1992;370:183-184.
189. **Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ.** Neo vascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:1205-1209.
190. **Stephenson AJ, Bosl GJ, Bajorin DF, Stasi J, Motzer RJ, Sheinfeld J.** Retroperitoneal lymph node dissection in patients with low stage testicular cancer with embryonal carcinoma predominance and/or lymphovascular invasion. *J Urol* 2005;174:557-560.
191. **Stephenson AJ, Bosl GJ, Motzer RJ, Kattan MW, Stasi J, Bajorin DF, Sheinfeld J.** Retroperitoneal lymph node dissection for nonseminomatous germ cell testicular cancer: impact of patient selection factors on outcome. *J Clin Oncol* 2005;23:2781-2788.
192. **Stevens A, Lowe J.** Histología humana. Ed. Harcourt Brace. 1998; 2ed. pp:118-119.
193. **Tienari J, Pertovaara L, Saksela O, Lehtonen E, Vartio T.** Increased expression of the matrix metalloproteinase 2 in differentiating Tera 2 human embryonal carcinoma cells. *Int J Cancer* 1994;56:219-223.
194. **Tirado OM, Mateo-Lozano S, Sanders**

- S, Dettin LE, Notario V. The PCPH oncoprotein antagonizes the proapoptotic role of the mammalian target of rapamycin in the response of normal fibroblasts to ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63:6290-6298.
195. Toksoz D Williams DA. Novel human oncogene 1bc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. *Oncogene* 1994;9:621-628.
196. Torres A, Casanova JF, Nistal M, Regadera J. Quantification of immuno competent cells in testicular germ cell tumours. *Histopathology* 1997;30:23-30.
197. Tronick SR, McBride WO, Popescu NC, Eva A. Chromosomal localization of DBL oncogene sequences. *Genomics* 1989;5:546-553.
198. Turley H, Scott PA, Watts VM, Bicknell R, Harris A, Gatter KC. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal anti body VEGF-1. *J Pathol* 1998;186:313-318.
199. Ulbright TM. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod Pathol* 2005;18 (Suppl 2):S61-79.
200. Ulbright TM, Young RH. Seminoma with tubular, microcystic, and related patterns: a study of 28 cases of unusual morphologic variants that often cause confusion with yolk sac tumor. *Am J Surg Pathol* 2005;29:500-505.
201. Velasco JA, Avila MA, Cansado J, Notario V. Cloning and sequencing of the cDNA for the *cph* oncogene from neoplastic hamster fibroblasts reveal partial homology with the *dbl* exchange factor. *Radiat Oncol Invest* 1996;3:262-267.
202. Velasco JA, Avila MA, Notario V. The product of the *cph* oncogene is a truncated, nucleotide-binding protein that enhances cellular survival to stress. *Oncogene* 1999;18:689-701.
203. Velasco JA, Castro R, Avila MA, Laborda J, Di Paolo JA, Cansado J, Notario V. *Cph*, a novel oncogene which cooperates with *H-ras* in the transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1994;9:2065-2069.
204. Velasco JA, Feijóo E, Avila MA, Notario V. Secretion of neurodifferentiation factor - like polypeptides by *cph*-transformed fibroblasts: Cloning and characterization of syrian hamster neureglulin cDNAs. *Mol. Carcinog* 1998;21:156-163.
205. Velasco JA, Zimonjic DB, Popescu NC, Cansado J, Di Paolo JA, Albor A, Notario V. Tissue-specific expression, evolutionary conservation and localization of the *cph* proto-oncogene on syrian hamster chromosome X. *Oncogene* 1996;12:2713-2717.
206. 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.
207. von Eyben FE. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;151:93-138.
208. von Eyben FE, Jacobsen GK, Rorth M, Von Der Maase H. Microinvasive germ cell tumour (MGCT) adjacent to testicular germ cell tumours. *Histopathology* 2004;44:547-554.
209. von Eyben FE, Jacobsen GK, Skotheim RI. Microinvasive germ cell tumor of the testis. *Virchows Arch* 2005;447:610-625.
210. Wakita H, Shirahama S, Furukawa F. Distinct P-cadherin expression in cultured normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *Micros Res Tech* 1998;43:218-223.
211. Weibel E. Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry. London: Academic Press, 1979;26-37,360.
212. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumour angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-409.213.
- 213 Weidner N, Semple JP, Welch WR,

- Folkman J.** Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
214. **Weinberg RA.** Oncogenes, anti oncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49:3713-3721.
215. **Wen D, Peles E, Cupples R.** New differentiation factor: A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992;69:559-572.
216. **West CM, Cooper RA, Lancaster JA, Wilks DP, Bromely M.** Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 2001;61:2907-2910.
217. **Williams GT, Smith CA.** Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell eath. *Cell* 1993;74:777-779.
218. **Wilson C, Yang J, Strefford JC, Summersgill B, Young BD, Shipley JI, Lu YJ.** Overexpression of genes on 16q associated with cisplatin resistance of testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:211-216.
219. **Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GFJM, Schlingemann RO.** VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol* 2001;195:490-497.
220. **Yamanishi DT, Buckmeier JA, Mayskens FL Jr.** Expression of c-jun, jun-B and c-fos protooncogenes in human primary melanocytes and metastatic melanomas. *J Invest Dermatol* 1991;97:349-353.
221. **Yu W, Liao QY, Hantas FM, Sanders BG, Line K.** Activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH₂-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinases is required for RRR-alfa-tocopheryl succinate - induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:6569-6576.
222. **Yuspa SH, Dlugosz A, Cheg C.** Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;103:90S-95S.
223. **Ziegler A, Honason AS, Leffell EDJ.** Suburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;372:773-776.
224. **Zuo L, Weger J, Yang Q.** Germline mutations in the p16^{INK4a} binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12:97-99.