



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO
DE CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR
EN CONEJO CHINCHILLA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA**

Paola Montelongo Solís

TUTOR PRINCIPAL:

**Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Comité Tutorial:

**Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dr. Oscar Gutiérrez Pérez
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

México, Distrito Federal, Diciembre 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de **Biología de la Reproducción** del **Instituto Nacional de Pediatría**. Teniendo como apoyo económico de recurso federal número 64/2010.

Se contó además con una beca del **CONACYT** para estudios de posgrado con clave de registro: 489083.

Se agradece la impresión de esta tesis, a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a través del programa de apoyo a los estudios de posgrado.

ASESORES DE TESIS

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Instituto Nacional de Pediatría

COMITÉ TUTORAL

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Oscar Gutiérrez Pérez

CEIEPP, FMVZ

MIEMBROS DEL JURADO

DR.MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

Instituto Nacional de Pediatría

DRA. GABRIELA CESARMAN MAUS

Instituto Nacional de Cancerología

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

Universidad Autónoma Metropolitana

DR. FRANCISCO JIMÉNEZ TREJO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por mis padres, Sr. **José Montelongo** y Sra. **Matilde Solis**, y por la vida, que me dio la gran bendición, de tener un par de padres más, el Sr. **Eloy Solis** y la Sra. **Guadalupe Ramos**, los amo.

A mi esposo, **Adrián**, quien siempre nos da todo a manos llenas; a mis nenas: **Andy, Camy y Sofí**, que son un curso intensivo de amor incondicional, los adoro.

También a mis hermanos **Fátima** y **José**, por darme lecciones de vida, los quiero mucho.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, nuestra gran alma *mater* y a su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, es un honor ser una más de tus frutos.

A la Directora de Investigación, **Dra. Dolores Correa Beltrán** y al Subdirector de Medicina Experimental, **M.C. Heriberto Caballero Ortega**, del **Instituto Nacional de Pediatría**, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Me gustaría reiterar mi gran sentimiento de gratitud hacia la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, Jefa del **Laboratorio de Biología de la Reproducción**, del Instituto Nacional de Pediatría, lugar donde siempre me he sentido como en mi casa. Para quien no encuentro palabras suficientes para externarle mi gran respeto y gratitud, pero sobre todo, admiración, ya que es un gran ser humano, una excelente investigadora, una invaluable amiga y además, tiene un característico tono sutil, entre saber exigirte con suavidad y firmeza. Lo reitero, sí existen las personas indispensables, usted es una de ellas.

Al **Técnico Pedro Medina Granados**, por su invaluable apoyo para la realización de las técnicas de laboratorio requeridas en esta tesis. Quien además de ser un ejemplo a seguir en trabajo y responsabilidad es un excelente ser humano, y siempre brinda su amistad; usted también está en la lista de personas indispensables en la realización de esta tesis. ¡Muchas gracias!

De igual forma, agradecer a todos los miembros del laboratorio, quienes siempre me tendieron una mano amiga: **Dra. Margarita Chávez, Dr. Julio Rojas y Dr. Francisco Jiménez**. A mis compañeros de laboratorio, también muchas gracias porque siempre recibí apoyo de ustedes: **Carlos Durand, Daniel Landeros, Lucero Cortes, Iris Gallegos y Edgar Cervantes**.

Especial agradecimiento a la **Dra. Margarita Chávez y al QFB Daniel Landeros**, por su apoyo en la realización de la técnica de PCR.

Me gustaría reconocer el gran apoyo que recibí de mi amiga, **Lucero Cortés**, quien siempre estuvo dispuesta en asistirme cuando tuve contratiempos.

Agradezco también al **Biólogo Rafael Reynoso Robles** y a la **M.C. Angélica González Maciel** del Laboratorio de **Microscopia Electrónica**, por las facilidades para el uso del equipo, con el cual obtuvimos hermosas imágenes.

A la **Dra. María de Lourdes Juárez**, quien es un ejemplo a seguir en fortaleza y carácter. Gracias por su tiempo dedicado en los tutorales y sus valiosas aportaciones que enriquecieron este proyecto.

Al **Dr. Oscar Gutiérrez**, quien siempre nos enriqueció con sus conocimientos; también gracias por su tiempo en los tutorales y atinados comentarios.

A todos los **miembros del jurado**, por ayudarme a mejorar el presente trabajo y enseñarme que ver los errores, te da la oportunidad de crecer.

A la **Familia Valle Ramos: Prof. Roberto y Profa. Mirta**, mis padrinos, quienes desde pequeña me inculcaron el amor al estudio. A sus hijos: **Roberto, Carlos Alberto y Guadalupe**.

A la **Familia Celestino González: Sr. Federico, Sra. Yolanda**, mis suegros y **Tomas, Hugo, Santiago, Dulce María, Yazmín y Agustín**, mis cuñados y cuñadas; quienes me han cobijado como una más de ellos y me han alentado con sus “porras”.

A la **Familia Celestino Argueta: Hugo**, mi compadre y su gran esposa, mi comadre **Margarita**. También siempre al pendiente de mi, ¡gracias! y a sus hermosos hijos e hijas: **Gabriela, Federico, Adriana, Roberto, Carmen Yolanda, Julieta y Renata**.

A la **Familia Sánchez Castillo: Rosa Alicia, Don Arturo y Beguidí**, quienes me ayudan a cuidar a las nenas, en los excesos de trabajo, ¡ustedes son mi familia!

A mi gran amiga, desde la preparatoria, **Itzayana Mejía**, como ejemplo a seguir en tenacidad y constancia ¡Gracias por tu amistad y consejos!

DEDICATORIA

Mamá Lupita, que siempre me has entregado tus cuidados, amor y cariño; a **Mamá Mati**, por enseñarme a sentir, a pensar y a ser libre. Las dos, me dieron alas para volar, hoy, soy quien soy, gracias a ustedes.

¡Las Adoro!

A mis hijas **Dulce Andrea, Camila y Sofía Eloísa**, como una muestra del gran amor que siento por ustedes y me gustaría que este logro sea útil en educarlas con el ejemplo.

¡Las amo nenas!

A mi esposo, **Adrián**, quiero que sepas que este logro no solo es mío, es de nuestro equipo, la gran familia que somos. ¡Te amo!

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER	14
1.1.1 Definición de Cáncer Testicular	14
1.1.2 Clasificación Histológica del Cáncer Testicular	15
1.1.3 Clasificación para Tumores De Células Germinales	16
1.2 MARCADORES TUMORALES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL TUMOR DE CÉLULAS GERMINALES TESTICULARES	19
1.3 PATOGENIA DEL CARCINOMA <i>IN SITU</i> TESTICULAR.	20
1.3.1 Etiología del Carcinoma in situ Testicular.	20
1.3.2 Transformación hacia la malignidad de los gonocitos a Carcinoma in situ Testicular	20
1.3.3 Histomorfología del Carcinoma in situ Testicular	21
1.3.4 Genética y Epigenética	21
1.4 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CARCINOMA <i>IN SITU</i> TESTICULAR	22
1.4.1 Criptorquidia	22
1.4.2 Factores genéticos	23
1.4.3 Factores ambientales	23
1.5 DISRUPTORES ENDOCRINOS	24
1.6 MODELOS DE ESTUDIO PARA TUMOR DE CÉLULAS GERMINALES TESTICULARES	26
1.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
1.6.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	27
1.6.3 <i>Pez cebra</i>	28
1.6.4 <i>Murinos (Mus musculus)</i>	28
1.6.5 <i>Rattus norvegicus (ratas macho)</i>	30
1.6.6 <i>Oryctolagus cuniculus (Conejos)</i>	30
2. JUSTIFICACION	31
3. OBJETIVO GENERAL	32
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
5. HIPOTESIS	32
6. MATERIAL Y METODOS	32
6.1 ANIMALES	32
6.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER EL TEJIDO TESTICULAR.	33

6.3	PROCESAMIENTO DEL TEJIDO TESTICULAR PARA SU ESTUDIO MORFOLÓGICO	34
6.3.1	<i>Cuantificación celular</i>	35
6.4	PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	35
6.5	PROCESAMIENTO PARA INMUNOHISTOQUÍMICAS	35
6.5.1	<i>Proliferación (ki-67)</i>	36
6.5.2	<i>POU5F1 y C-KIT</i>	36
6.6	POSITIVIDAD A POU5F1 Y C-KIT.	37
6.7	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR)	37
6.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
7.	RESULTADOS	39
7.1	ANATOMÍA TESTICULAR EN CONEJOS DE 60 DPP	39
7.2	ANATOMÍA TESTICULAR EN CONEJOS DE 90 DPP	39
7.3	ANATOMÍA TESTICULAR EN CONEJOS DE 180 DPP	40
7.4	DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA	43
7.4.1	<i>Conejos de 60 dpp</i>	43
7.4.2	<i>Conejos de 90 dpp</i>	44
7.4.3	<i>Conejos de 180 dpp</i>	45
7.5	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	52
7.5.1	<i>180 dpp</i>	52
7.6	INMUNOHISTOQUÍMICAS	53
7.6.1	<i>Proliferación ki-67 en conejos de 60 dpp</i>	53
7.6.2	<i>Proliferación ki-67 en conejos de 90 dpp</i>	53
7.6.3	<i>Proliferación / ki-67 en conejos de 180 dpp</i>	54
7.6.4	<i>POU5F1 en Conejos de 60 dpp</i>	57
7.6.5	<i>POU5F1 en Conejos de 90 dpp</i>	57
7.6.6	<i>POU5F1 en Conejos de 180 dpp</i>	57
7.6.7	<i>C-Kit en Conejos de 60 dpp</i>	61
7.6.8	<i>C-Kit en Conejos de 90 dpp</i>	61
7.6.9	<i>C-Kit en Conejos de 180 dpp</i>	61
7.7	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR)	64
8.	DISCUSIÓN	65
9.	CONCLUSIÓN	75
10.	ANEXO	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: SEMINOMA CLÁSICO. TOMADO DE HUIHUI & ULBRIGHT, 2012 (HEMATOXILINA Y EOSINA 400X).	17
FIGURA 2: HISTOLOGÍA TESTICULAR CON CIST.	21
FIGURA 3: ANATOMÍA TESTICULAR EN CONEJOS.	41
FIGURA 4: EPITELIO SEMINÍFERO DE CONEJOS DE GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL DE 60 DPP Y 90 DPP.	48
FIGURA 5: EPITELIO SEMINÍFERO DE CONEJOS DE GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL DE 180 DPP.	49
FIGURA 6: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	52
FIGURA 7: INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA KI-67.	56
FIGURA 8: INMUNOHISTOQUÍMICA PARA POU5F1 EN TEJIDO DE CONEJOS DE 60 DPP.	59
FIGURA 9: INMUNOHISTOQUÍMICA PARA POU5F1.	60
FIGURA 10: INMUNOHISTOQUÍMICA A C-KIT.	62
FIGURA 11: GEL DE PCR.	64
FIGURA 12: MECANISMOS PROPUESTOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CIST.	73
FIGURA 13: BLOQUEO DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS TESTÍCULO.	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1: RELACIÓN PESO TESTICULAR/ PESO CORPORAL (*P<0.05 VS CONTROL DE LA MISMA EDAD).	42
GRÁFICA 2: NÚMERO DE GONOCITOS Y/O ESPERMATOGONIAS POR CADA 10 000 μ^2 DE ÁREA DE CORDÓN Y/O TUBO SEMINÍFERO, PARA CADA EDAD.	47
GRÁFICA 3: ÁREA DE LOS CORDONES Y/O TUBOS EN MICRAS CUADRADAS (μ^2).	50
GRÁFICA 4: ÍNDICE DE MADURACIÓN EPITELIAL.	50
GRÁFICA 5: ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO.	51
GRÁFICA 6: INMUNOREACTIVIDAD A KI-67.	55
GRÁFICA 7: INMUNOREACTIVIDAD A POU5F1.	58
GRÁFICA 8: POSITIVIDAD A POU5F1 EN SUS DOS VARIANTES IDENTIFICADAS EN CONEJOS DE 60 DPP (*P<0.05 VS GRUPO CONTROL DE LA MISMA EDAD).	58
GRÁFICA 9: NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS A C-KIT, POR CADA 10000 μ^2 .	63

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: RELACIÓN PESO TESTICULAR / PESO CORPORAL.	42
TABLA 2: NÚMERO DE GONOCITOS Y/O ESPERMATOGONIAS POR CADA 10000 μ^2 .	46
TABLA 3: ÁREAS DE EPITELIO SEMINÍFERO, ÍNDICE DE MADURACIÓN EPITELIAL E HISTOPATOLÓGICO.	51
TABLA 4: INMUNOPositividad A POU5F1 NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICA.	59
TABLA 5: INMUNOREACTIVIDAD A KI-67, POU5F1 Y C-KIT.	63

RESUMEN

El Carcinoma *in situ* Testicular (CIS_t), es una lesión histológica que precede al tumor de células germinales testiculares (TGCT) y tiene como factor de riesgo a la criptorquidia. Se sugiere que los gonocitos son los responsables del desarrollo de esta patología. El mecanismo de progresión del CIS_t no ha podido ser descrito debido a que no existe un modelo animal que se apegue a la fisiopatología humana.

Objetivo. Desarrollar un modelo de Carcinoma *in situ* testicular en conejo chinchilla con administración de estradiol.

Material y métodos. Se utilizaron conejos de la raza chinchilla distribuidos en dos grupos: control y con administración de estradiol. Determinamos las alteraciones histológicas testiculares y por inmunohistoquímicas e identificamos proteínas (POU5F1 y c-Kit) empleadas como biomarcadores para el diagnóstico de CIS_t.

Resultados. En el grupo control se presentó descenso testicular y espermatogénesis completa. Las proteínas biomarcadoras fueron negativas. En los conejos con estradiol, los testículos no descendieron, los gonocitos no se diferenciaron a espermatogonias y se identificaron lesiones histológicas propias del CIS_t, con positividad a POU5F1 y c-Kit.

Conclusiones. El conejo es un modelo ideal para estudiar el desarrollo del CIS_t, en el cual se pueden observar las características histológicas y los marcadores propios de esta patología. Los gonocitos persistentes pueden ser los responsables del establecimiento y desarrollo del CIS_t y su progresión hacia el tumor de células germinales testiculares.

ABSTRAC

Testicular Carcinoma *in situ* (CISt), is a histological lesion that precedes *testicular germ cell tumors (TGCT)* with cryptorchid as the absolute risk factor (where cryptorchidism is predominantly the unique risk factor or where cryptorchid is the absolute risk factor). It was suggested that the gonocytes are responsible for the development of this pathology. Nevertheless, nobody has been able to describe the mechanism underlying the progression of CISt due to lack of an animal model with strictly physiological similitude to that of human beings.

Objective. To describe the development of CISt in Chinchilla rabbit by (with the) administration of estradiol.

Material and methods. 24 chinchilla rabbits were evenly distributed into two groups: control group and estradiol group. The determination of histological alterations and POU5F1 and c-kit proteins employed as biomarkers for the diagnosis of CISt were carried out.

Results. Testicular descent and complete spermatogenesis were observed in the control group. The protein biomarkers were negative. However, in the rabbits treated with estradiol, the testes remained undescended with the gonocytes undifferentiated to spermatogonias. There were histological lesions owing to CISt and positive to POU5F1 and c-kit proteins.

Conclusion. Chincilla rabbit is an ideal model to study CISt development in which the histological characteristics and biomarkers of the disease itself could be clearly observed. The persisting gonocytes could be responsible for the development of CISt.

Key word: Testicular Carcinoma *in situ*, POU5F1, c-Kit, rabbit, animal model.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Cáncer

El cuerpo de un animal lo podemos contemplar como una sociedad, cuyos miembros son células, que se reproducen por división celular y están organizadas en conjuntos de células que colaboran entre sí, denominados tejidos. En un cuerpo sano esta sociedad es muy particular, ya que el autosacrificio, más que la competencia, es la norma. Cualquier mutación que origine un comportamiento no altruista de miembros individuales de la cooperativa, arriesga el futuro de la totalidad del organismo. Por lo tanto, la mutación, la competencia y la selección natural actuando dentro de la población celular, en los organismos pluricelulares son los ingredientes básicos del cáncer: una enfermedad en la que las células mutadas empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, pero que finalmente destruyen toda la sociedad celular y mueren (Alberts et. al., 2010).

1.1.1 Definición de Cáncer Testicular

Desde el punto de vista celular, se denominan células cancerosas, a las células anormales que crecen y proliferan más de lo habitual, que producen un tumor o neoplasia (Alberts et. al., 2010).

El cáncer testicular surge en el epitelio seminífero, o en las células intersticiales del testículo (Practice Guidelines in Oncology. www.nccn.org). Puede originarse a partir de células germinales, células de Leydig o células de Sertoli.

El cáncer testicular puede tener como primeros signos y síntomas, aumento en el volumen escrotal, palpación de una masa endurecida e indolora, hidrocele y hernias; estos datos ayudan al diagnóstico (Tibor et. al., 2013).

Más del 90% de los tumores cancerosos de testículo son de células germinales; por esta razón también se utiliza el término tumor de células germinales testiculares (TGCT, por sus siglas en inglés) (McGlynn & Trabert, 2012).

La lesión precursora del TGCT se denomina, Carcinoma *in situ* (CIS_t) o neoplasia intratubular de células germinales (NICG). Esta lesión solo se puede identificar al microscopio. En esta etapa la neoplasia aún no es invasiva y generalmente no causa síntomas. La única manera de diagnosticar un CIS_t es mediante biopsia (American Joint Committee on Cancer. www.aicc.org).

En muchos países se considera al cáncer testicular como la neoplasia más común en adultos jóvenes, entre los 15 y 40 años de edad (Chia et. al., 2010). En contraste con datos estadísticos pediátricos, se reporta que en Estados Unidos de Norte América la incidencia anual es de 5.9/100,000 niños menores de 15 años de edad, con pico de incidencia en los primeros 3 años de vida; representando esto el 2% de los tumores pediátricos (Pohl et. al., 2004; Walsh et. al., 2008). En nuestro país, según el Globocan, la incidencia en rango de edad entre los 15 y 39 años es de 9.2/100,000 habitantes, superando incluso a las leucemias, las cuales representan 4.6/100,000 para este rango de edad.

Clasificar los tumores testiculares no ha sido fácil, esto se evidencia con los múltiples tipos de clasificaciones existentes. Se han realizado en base a criterios histopatológicos, de tipo celular etiológico y otros. A continuación se menciona la clasificación patológica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.1.2 Clasificación Histológica del Cáncer Testicular

La siguiente clasificación de tumores de células germinales testiculares malignos (cáncer de testículo) es la utilizada por la OMS (Eble et. al., 2004).

- A. Neoplasia intratubular de células germinales, no clasificada (NICG). O también llamada CIS_t.
- B. Tumor de células germinales puras (que presenta un solo tipo de célula) maligno:
 - 1. Seminoma.
 - 2. Carcinoma embrionario.
 - 3. Teratoma.

4. Coriocarcinoma.
 5. Tumor del saco vitelino.
- C. Tumor mixto de células germinales (que presenta más de un patrón histológico) maligno:
1. Carcinoma embrionario y teratoma, con seminoma o sin este.
 2. Carcinoma embrionario y tumor del saco vitelino, con seminoma o sin este.
 3. Carcinoma embrionario y seminoma.
 4. Tumor del saco vitelino y teratoma, con seminoma o sin este.
 5. Coriocarcinoma y cualquier otro elemento.
- D. Poliembrioma.

1.1.3 Clasificación para Tumores De Células Germinales

Hay dos tipos principales de tumores de células germinales testiculares (TGCT):

- Seminomas.
- No seminomas (o mixtos).

Muchos tumores testiculares contienen células no seminomatosas y células seminomatosas. Estos tumores con células germinales mixtas se tratan como no seminomatosos, debido a que crecen y se propagan como tales. Es decir, son considerados de mayor facilidad a la metástasis.

Para los clínicos, es importante distinguir entre estos dos tipos, porque tienen diferentes tratamientos y distintos pronósticos (Practice Guidelines in Oncology. www.nccn.org American Cancer Society).

1.1.3.1 Seminomas

Se trata de es un tumor blando, de textura regular, color gris rosado. Histológicamente es uniforme y se puede identifica a las células del carcinoma in situ (Kristensen et. al., 2008).

Tienden a crecer y a propagarse más lentamente que los no seminomas. Los dos subtipos principales de estos tumores son los seminomas clásicos (o típicos) y los seminomas espermatocíticos.

Seminoma clásico: Más del 95% de los seminomas son clásicos. Normalmente éstos se presentan en hombres entre las edades de 25 y 45 años.

El patrón microscópico del seminoma clásico (figura 1) se caracteriza por la existencia de lóbulos con una proliferación de células de aspecto homogéneo con citoplasma amplio y claro. El estroma tumoral presenta finos tractos conectivos que delimitan lóbulos. En dichos tractos se concentra un infiltrado de linfocitos T y células plasmáticas. Una característica frecuente en el seminoma, es la extensión de las células tumorales entre los túbulos seminíferos (Tickoo et. al., 2002; Huihui & Ulbright, 2012).

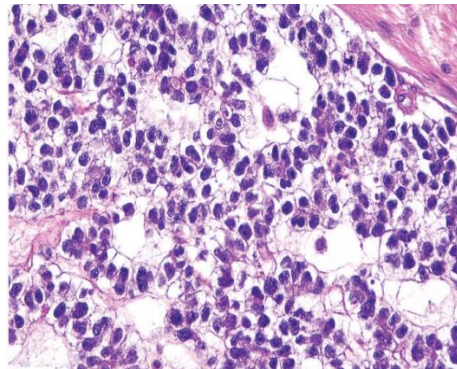


Figura 1: Seminoma clásico. Tomado de Huihui & Ulbright, 2012 (hematoxilina y eosina 400X).

Seminoma espermatocítico: Este tipo de seminoma es poco común y tiende a presentarse en los hombres de edad avanzada. Los tumores espermatocíticos tienden a crecer más lentamente y tienen menos probabilidad de propagarse a otras partes del cuerpo en comparación con los seminomas clásicos.

1.1.3.2 No seminomas

Estos tipos de tumores de células germinales usualmente se presentan en hombres que están en los últimos años de la adolescencia y a principios de los 30's.

Existen cuatro tipos principales de tumores no seminomas:

- Carcinoma embrionario.
- Carcinoma de saco vitelino.
- Coriocarcinoma.
- Teratoma.

La mayoría de los tumores son una mezcla de dos o más tipos diferentes (algunas veces también con un componente seminomatoso). Todos los tumores no seminomatosos se tratan de la misma manera.

Carcinoma embrionario: Es poco frecuente que se presente de forma pura (<3%), la mayoría de las veces se encuentra combinado con otras variedades histológicas (44% de los casos). Se trata de un tumor compuesto por células embrionarias pleomórficas con núcleo vesicular, nucléolo prominente y abundante citoplasma. Estas células son indiferenciadas y totipotenciales, con capacidad para diferenciarse en componentes de las tres capas embrionarias, o hacia derivados extraembrionarios, como trofoblasto o bien a un tumor de saco de Yolk (Mostofi & Sesterhenn, 1985).

Para el diagnóstico histopatológico, se deben realizar inmunohistoquímicas y su perfil inmunohistoquímico, se comporta de la siguiente forma. Positividad a AE1/AE3 y CD30. Negatividad a CD117 y D2-40.

Carcinoma del saco vitelino: Sus células suelen estar aplanadas con diferentes tamaños nucleares, desde núcleos grandes vesiculares con citoplasmas amplios hasta núcleos aplanados y excéntricos. Se Pueden distinguir diferentes patrones histológicos (Ulbright, 1993).

El estudio histológico puede evidenciar la presencia de cuerpos embrioides que corresponde a mesénquima vascular central rodeado de epitelio endodérmico (Ulbright et. al., 1986).

Su perfil inmunohistoquímico, para diagnóstico histopatológico es el siguiente: Positividad a AE1/AE3 y glypican-3. Negatividad a OCT3/4.

Coriocarcinoma: Microscópicamente su arquitectura suele recordar a la placenta, observándose espacios vasculares hemorrágicos alrededor de los cuales se disponen los elementos del citotrofoblasto, compuesto de células aisladas mononucleadas con atipias nucleares y citoplasma abundante con vacuolas. (Mostofi & Sesterhenn, 1985).

Perfil inmunohistoquímico: Negatividad a OCT3/4 y PLAP.

Teratoma: Los teratomas son tumores de las células germinales con áreas que, al observarse en un microscopio, se asemejan a cada una de las tres capas de un embrión en desarrollo (Ulbright & Srigley, 2001).

1.2 Marcadores Tumorales para el Diagnóstico del Tumor de Células Germinales Testiculares

Las células germinales de los tumores de testículo producen glicoproteínas de origen embrionario que ayudan al diagnóstico, diferenciación y seguimiento postquirúrgico; además de que determinan el riesgo de recaída de la enfermedad (Oosterhuis & Looijenga, 2005; Carver & Sheinfeld, 2008).

- **Alfafetoproteína (AFP):** Es un glicoproteína de alto peso molecular producida en hígado, saco vitelino e intestino fetales. Mientras que en el adulto sano sus niveles séricos se encuentran en niveles muy bajos (< 5-10 ng/ml), en los TGCT, principalmente en el carcinoma embrionario, se eleva en un 72%. Es importante resaltar que nunca se eleva en el seminoma clásico (Oosterhuis & Looijenga, 2005; Einhorn et. al., 2007).
- **Gonadotropina coriónica (HCG):** Esta glicoproteína es de bajo peso molecular, esta compuesta por las subunidades alfa y beta. Se produce normalmente en la placenta

durante el embarazo, siendo sus valores normales menores a 10-15 ng/ml. Está aumentada en el 5% al 10% de los seminomas y en el 100% de los coriocarcinomas (Oosterhuis & Looijenga, 2005; Einhorn et. al., 2007).

Lactato deshidrogenasa (LDH): Su elevación está en relación con el tamaño y la proliferación tumoral. Se eleva en el 60% de los TGCT no seminomatosos y en el 80% de los seminomatosos (Oosterhuis & Looijenga, 2005; Einhorn et. al., 2007).

1.3 Patogenia del Carcinoma *in situ* Testicular.

Hasta hoy en día, el establecimiento y mecanismo de desarrollo del CIST no ha podido ser descrito debido a que no existe un modelo animal que se apegue a la fisiopatología y a la condición clínica del humano (Garner et. al., 2008).

1.3.1 Etiología del Carcinoma *in situ* Testicular.

Algunas teorías señalan al gonocito como protagonista en el desarrollo del CIST al mantenerse indiferenciado y pluripotente.

Las células germinales primordiales una vez que migran y se establecen en la cresta genital se denominan gonocitos, los cuales maduraran a espermatogonias (Runyan et.al., 2006; Looijenga, 2009). Durante este proceso de maduración se presenta una regulación a la baja de marcadores embrionarios o proteínas de pluripotencialidad. Incluso se ha demostrado que se mantiene durante los primeros meses post parto para el caso de humanos (Vigueras et. al., artículo en revisión) y hasta los primeros 60 días post parto en conejos (datos de esta tesis).

1.3.2 Transformación hacia la malignidad de los gonocitos a Carcinoma *in situ* Testicular

Los tumores de células germinales testiculares (TGCT), comparten características con las células germinales primordiales/ gonocitos, se ha propuesto que todos los TGCT surgen de una lesión precursora el CIST o NICG.

Esta hipótesis se basa en múltiples estudios, donde se han examinado la lesión CIST, la presencia de células germinales fetales y neonatales, como los gonocitos y se ha identificado que comparten marcadores como: C-KIT, NANOG y POU5F1 (Jorgensen et.al., 1995; Rajpert-De Meyts et.al., 2004; Rajpert-De Meyts et.al., 2006; Rajpert-De Meyts et.al., 2007; Mitchell RT et. al., 2014; Viguera in press 2014).

1.3.3 Histomorfología del Carcinoma in situ Testicular

Se caracteriza por la presencia de células atípicas, las cuales se localizan adosadas a la membrana basal de los tubos seminíferos, que presentan engrosamiento, y en los cuales, generalmente está detenida la espermatogénesis. Las células atípicas, son grandes con citoplasma claro, abundante glicógeno y son PAS positivo. Su núcleo es grande y central con cromatina densa, nucléolo prominente. A nivel del epitelio seminífero en esta lesión también se identifica un desplazamiento de las células Sertoli hacia la zona central de los tubos y la presencia de abundantes mitosis (Huihui & Ulbright, 2012) (figura 2).

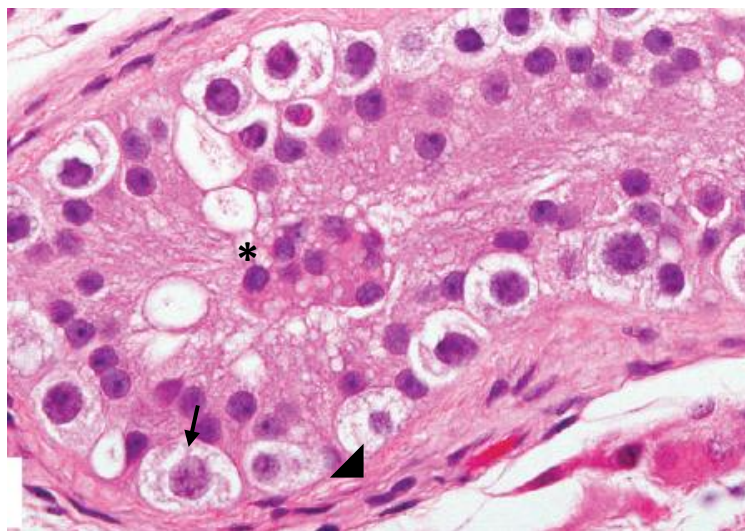


Figura 2: Histología testicular con CIST.

Se observan características propias de esta lesión: Presencia de células atípicas (flecha); engrosamiento de la membrana basal (cabeza de flecha), desplazamiento de las células de Sertoli hacia la zona central del cordón seminífero (asterisco) (Tomado de Huihui Ye et. al., 2011. Hematoxilina y eosina, 600X).

1.3.4 Genética y Epigenética

Respecto a su estado epigenético existen fuertes similitudes entre los TGCT, las células germinales primordiales (PCG) y los gonocitos (Okamoto & Kawakami 2007; Okamoto 2012;

Van Der Zwan et. al., 2013; Kristensen et. al., 2013). En el caso de los tumores seminomatosos se identifica hipometilación, al igual que en las PCG y la lesión CIST. En los carcinomas embrionarios se muestran niveles más altos de metilación (Smiraglia et. al., 2002; Wermann et. al., 2010); que para el caso de este tumor se refleja probablemente en un proceso de metilación de *novo*, durante la progresión tumoral, indicando una reversión a una célula madre embrionaria más hipermetilada.

También se ha propuesto que durante su progresión, los TGCT podrían tener pérdidas o ganancias cromosómicas heterogéneas que determinan un estado triploide. Se han identificado ganancias en el brazo corto del cromosoma 12. Esta aberración podría ser funcionalmente relevante en la patogénesis de estos tumores (Mostert et. al., 1998; Looijenga et. al., 2003; Almstrup et. al., 2005; Korkola et. al., 2006), esta hipótesis se ha fundamentado en el hecho de que se indujo a células madre pluripotentes con ganancia en el cromosoma 12, y esto podría estar demostrando una ventaja selectiva durante la reprogramación y el aumento de potencial tumorigénico (Draper et. al., 2004; Mayshar et. al., 2010)

1.4 Factores de Riesgo para el Desarrollo de Carcinoma *in situ* Testicular

1.4.1 Criptorquidia

Los pacientes con criptorquidia, presentan un riesgo de cáncer entre 35 y 48 veces mayor comparados con la población general (Leissner et. al., 1999; Abaci et. al., 2013). Un total del 10% de los cánceres testiculares se asocian con testículos no descendidos (Leissner et. al., 1999; Gapany et. al., 2008). El riesgo de generación maligna es mayor en los pacientes con testículos abdominales (Kaefer 2004). Aunque algunos autores han mencionado que el riesgo de malignidad no se reduce con la orquidopexia temprana (Mouriquand 2008); también se ha informado que el riesgo de malignidad se incrementa aún más en pacientes que no se someten a orquidopexia durante el período prepuberal (Walsh et. al., 2007). El riesgo de malignidad es 32 veces mayor en los pacientes sometidos a orquidopexia antes de que cumplan 11 años (Docimo et. al., 2000; Kaefer 2004).

1.4.2 Factores genéticos

Un aumento de riesgo hasta 76 veces en hombres gemelos (Kratz et. al., 2010) y de 25 veces en pacientes con tumor contralateral (Dieckmann & Pichlmeier 2004) muestra al componente genético como uno de los factores de riesgo en la patogénesis del TGCT. Se identificaron polimorfismos en el cromosoma Y (*gr/gr* microdelección) (Nathanson et. al., 2005; Linger et. al., 2007), en receptores de FSH (Ferlin et. al., 2008) y andrógenos (Vastermark et. al., 2011).

También se han identificado múltiples *locis* de varios genes implicados en diversas funciones, por ejemplo: las relacionadas con el metabolismo de hormonas esteroideas (Ferlin et. al., 2010; Kristiansen et. al., 2011), de los estrógenos (Starr et. al., 2005; Brokken et. al., 2012), de la regulación de gonadotropinas (Purdue et. al., 2008), señalización de cAMP (Horvath et. al., 2009), entre otras.

1.4.3 Factores ambientales

El abrupto aumento en la incidencia de los tumores de células germinales testiculares de los países occidentales, no puede ser explicado con factores genéticos, por lo tanto, llama la atención la importancia de los factores relacionados con el medio ambiente (Horwich et. al, 2006; Looijenga 2009). Esto está fuertemente apoyado en estudios con migrantes de primera generación que muestran aumento en la incidencia, después de la migración hacia países con una alta incidencia de TGCT (Levine et. al., 2013).

El denominador común propuesto en muchos factores de riesgo ambientales, es la exposición fetal o perinatal a disruptores endocrinos (estrógenos y/o antiandrógenos). Esta hipótesis se apoya con lo observado en los años 70's, en hijos de mujeres expuestas a dietilestilbestrol (DES) durante el embarazo (Niculescu 1985; Sharpe & Skakkebaek 1993); los cuales presentaron múltiples alteraciones en el desarrollo de genitales, infertilidad, entre otros.

Estos disruptores endocrinos presentes en nuestra vida diaria, por ejemplo, los alquilfenoles, que actúan como estrógenos, con los cuales se ha estudiado que *in vitro*, estimulan la proliferación de líneas celulares de seminomas (TCAM-2), posiblemente a través de la modificación de la maquinaria epigenética (Eui-Man et. al., 2010; Ajj et. al., 2013).

1.5 Disruptores Endocrinos

Skakkebaek et. al., (2001) sugieren que el aumento en la incidencia de los problemas en el tracto reproductor masculino que incluyen, el incremento en la incidencia del cáncer testicular, criptorquidia, hipospadias, así como disminución en el conteo y calidad espermática, son signos de una entidad con base fisiopatológica común a la que denominaron Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS). La propuesta de este grupo de investigadores es que en la etapa fetal, durante el desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de las concentraciones hormonales pueden dar lugar a lesiones que van a conducir a una disfunción orgánica y en última instancia, llegar a la enfermedad clínica. Sugieren que la etiología de este síndrome se da a partir de la exposición a disruptores endocrinos (sustancias con actividad estrogénica), en etapas críticas durante el desarrollo, la denominaron hipótesis del estrógeno (Sharpe & Skakkebaek 1993).

Las etapas durante el desarrollo, donde se presenta la diferenciación y proliferación de las células responsables de la fertilidad a nivel testicular, así como la maduración del eje hipotálamo – hipófisis – gonada son considerados susceptibles a distintas influencias ambientales, como la nutrición y exposición materna durante el embarazo y/o la lactancia. Como ya se mencionó, la creciente prevalencia en subfertilidad masculina asociada a baja calidad espermática y la alta incidencia del cáncer testicular; estas alteraciones se asocian a exposición prenatal y en general durante periodos críticos del desarrollo a estos compuestos denominados disruptores endocrinos.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido la siguiente definición para disruptor endocrino: sustancias exógenas que pueden actuar como agonistas o antagonistas

hormonales alterando la síntesis, almacenamiento y metabolismo hormonal (Crisp et. al., 1998; Johnson & Harvey, 2002), que tienen la capacidad de actuar en organismos intactos, así como en su descendencia (Anway & Skinner, 2006).

Los disruptores endocrinos pueden interferir en la función hormonal de las siguientes maneras (Crisp et. al., 1998; Johnson & Harvey, 2002; Endocrine disrupter research. European Comission, 2010 <http://ec.europa.eu/>):

- Imitando la acción de una hormona natural, y de esta manera poniendo en marcha reacciones químicas similares en el cuerpo.
- Bloqueando los receptores hormonales de las células e impidiendo la acción normal de las hormonas.
- Influyendo sobre la síntesis, el transporte, el metabolismo y la excreción de hormonas y, por lo tanto, alterando la concentración natural de estas.
- Pueden imitar (mimetizar) la actividad biológica de una hormona mediante la unión a un receptor celular, que conduce a una respuesta injustificada mediante el inicio de la respuesta normal de la célula a la hormona natural en el momento equivocado o en una medida excesiva (efecto agonista).
- Pueden unirse al receptor pero no activarla. En cambio, la presencia de la sustancia química en el receptor va a evitar la unión de la hormona natural (efecto antagonista).
- Pueden unirse a las proteínas de transporte en la sangre, alterando así las cantidades de hormonas naturales que están presentes en la circulación.
- Pueden interferir con los procesos metabólicos en el cuerpo, que afectan a la síntesis o tasas de descomposición de las hormonas naturales.

De forma paralela también se ha propuesto el término “programación durante el desarrollo” que define al proceso mediante el cual condiciones adversas durante las etapas tempranas de la vida, ya sea fetal o postnatal, incrementan la susceptibilidad a padecer enfermedades en la edad adulta (Barker 2004; Hales & Barker, 2001; Gluckman &

Hanson, 2004). Concepto fundamentado en estudios epidemiológicos retrospectivos en diversas poblaciones humanas, las cuales, relacionan el bajo peso al nacimiento con patologías como: la hipertensión (Godfrey et. al., 1993) enfermedades coronarias (Barker 2002), diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa (Hales & Barker, 2001) y obesidad (Ravelli et. al., 1979), entre otras. Con base en este tipo de investigaciones se propone que las principales enfermedades del adulto se originan en los estadios más tempranos de la vida. El crecimiento y desarrollo fetal, postnatal e infantil constituyen los periodos de mayor plasticidad celular y dependen en gran medida, además del componente genético, del ambiente intrauterino y neonatal en el que se desenvuelve el individuo (Hales & Barker, 2001; Gluckman & Hanson, 2004).

En consecuencia, las etapas fetal y postnatal son las de mayor riesgo en la programación de la salud y la enfermedad. La exposición materna a diferentes perturbaciones durante el embarazo y lactancia, tiene consecuencias adversas en el fenotipo de su descendencia (Hales & Barker, 2001; Gluckman & Hanson, 2004).

1.6 Modelos de Estudio para Tumor de Células Germinales Testiculares

Han transcurrido 14 años desde que Skakkebaek y sus colaboradores propusieron el término, Síndrome de Disgenesia Testicular y lo relacionaron con la “hipótesis del estrógeno”, no han sido vanos y seguramente, a la par del correr de estos años, gran cantidad de esfuerzo en investigación ha sido dedicada a la etiología del cáncer testicular por influencias endocrinas exógenas (disruptores endocrinos). Sin embargo, la realidad es que la comprensión respecto al papel que tienen los disruptores endocrinos en la etiología de los TGCT, es aun limitada debido a la escasez de un modelo animal que se apege a la condición clínica y fisiopatológica de esta condición (Jiang y Nadeau, 2001).

Una serie amplia y heterogénea de estudios se han reportado en relación con los posibles modelos animales para el CIST, que se producen de manera espontánea y/o inducida por manipulaciones de laboratorio. Los principales se describen a continuación:

1.6.1 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans es un modelo que provee información tanto del desarrollo normal, como del estudio del TGCT (Berry et. al., 1997; Subramaniam & Seydoux, 2003). Estos nematodos *knock outs* para la proteína PUF, la cual es crucial para completar la meiosis de las células de la línea germinal, generan des-diferenciación, dando lugar a los tumores compuestos por células germinales indiferenciadas. También en esta especie se ha estudiado a GLD-1 y la cual al no estar presente, se forma la ciclina E y esta provoca repetidos re-ingresos hacia la activación de la proliferación celular. Se ha identificado que se produce una transición de la línea germinal hacia linajes somáticos (Biedermann et. al., 2009), proceso conocido como reprogramación. En otras palabras, en esta especie se pueden presentar dos variantes de tumor de células germinales testiculares, el de similitud con la línea germinal y el teratoma, que es el resultado de la transición al linaje somático (Berry et. al., 1997; Subramaniam & Seydoux 2003; Biedermann et. al., 2009).

1.6.2 *Drosophila melanogaster*

Así como *C. elegans*, *D. melanogaster* también ha demostrado ser una fuente de información relevante relacionada con el desarrollo normal y aberrante, incluyendo el comportamiento de células germinales, formación gonadal (Jaglarz & Howard, 1994; Tran et. al., 2000; Decotto & Spradling, 2005) y TGCT (Gonczy et. al., 1997; Hime et. al., 2007). En este modelo se ha identificado a la ciclina E, relacionada con la regulación del ciclo celular, de las células germinales normales (Knoblich et. al., 1994). Se ha encontrado que los péptidos similares a la insulina, influenciados por la dieta, dirigen el ciclo celular, de la línea germinal, a la fase G2 bajo control de vías de señalización PI3K y FOX.

De la misma manera la transición relacionada con la fase G1 del ciclo celular, se ve influenciada por la dieta. En este modelo también se ha corroborado la importancia que tiene el nicho de las células germinales para que estas maduren apropiadamente; en otras palabras, un sutil desequilibrio entre inducción e inhibición de factores en el nicho de las células germinales, determina el destino de esta células (Srinivasan et. al., 2012).

En contraste, el tumor de células germinales en este animal, muestra similitudes histológicas al de la línea germinal y se activan ante vías de señalización similares, lo que sugiere que es una respuesta intrínseca de las células germinales, independiente del nicho. Además, PTEN, LKB1 y la AMPK se encuentran para regular la proliferación de las células germinales primordiales en esta especie (Narbonne & Roy 2006).

1.6.3 Pez cebra

Weidinger et. al., (2003) identificaron en peces cebra, la mutación *ter*, en el gen "*den end*"; 2 años después en el centro de investigación de cáncer, en la Universidad de Texas, Kirsten et. al., (2005) demostraron que este gen está implicado en el desarrollo testicular normal, pero que sus mutaciones incrementan la incidencia de cáncer testicular, en este modelo animal. Posteriormente Neumann et. al., (2011) utilizando este pez cebra y manipulación genética, demuestran que la inactivación de ALK6, el cual es un receptor para el BMP, activa la ruta Smad de las células germinales e identificaron tumores con características de células germinales pre-meioticas (Neumann et. al., 2011a; Neumann et. al., 2011b).

1.6.4 Murinos (*Mus musculus*)

1.6.4.1 Cepa 129

Los estudios iniciales sobre los tumores de células germinales en ratón se realizaron por Stevens, quien demostró que la cepa de ratón 129 tiene específicamente una alta tendencia a desarrollar teratomas, procedente de células germinales embrionarias (Stevens, 1970; Stevens & Varnum, 1974; Walt et. al., 1993).

De hecho, este es el modelo que siempre incluye la pérdida de características de las células germinales, y la ganancia del perfil de linaje somático como parte del proceso de la tumorigénesis. Estos experimentos iniciaron una gran serie de estudios muy interesantes, por ejemplo, la susceptibilidad específica de la cepa 129, para el desarrollo de tumores de

células germinales, lo asociaron genéticamente con Ter (Kedde et. al., 2007), y lo llamaron NOM (Dead End o *dnd*) (Youngren et. al., 2005). Curiosamente, *dnd* está implicado en la regulación de la generación de miRNAs maduros (Ketting, 2007). Más recientemente, una interacción entre *Dnd* y la unidad de unión al ARN del complejo ApoB lo demuestra (Nelson et. al., 2012). Esta es la regulación de los riesgos reales para el desarrollo de teratomas de manera transgeneracional. También, se ha reportado que el c-Kit y su ligando están involucrados en el desarrollo de estos tipos de teratomas en la cepa 129 (Heaney et. al., 2008).

La pérdida del ligando de c-Kit no tiene efecto sobre la formación de tumores, mientras que la pérdida de la variante unida a la membrana aumenta el riesgo. Esto es de importancia en el contexto de la función de esta vía en particular, en la migración, la proliferación y la supervivencia de las células germinales primordiales en el ratón (Runyan et. al., 2006; Wylie, 1999).

En este modelo también se ha demostrado que el IGF-1 es secretado por las células de Leydig y que es un determinante clave en la retención de la pluripotencialidad de la línea germinal, que se caracteriza por la expresión de Oct 3/4, Blimp-1 y Nanog (Huang et. al., 2009). Este sistema funciona a través de la vía PI3K.

En este modelo, el ratón 129, inicialmente los TGCT, se desarrollaron de forma espontánea (Stevens & Hummel, 1957; Stevens, 1967). También se muestra la diferenciación anormal de las células germinales y focos tumorales desde el día 15 embrionario (Stevens, 1962), los cuales se detectan visiblemente antes de la pubertad. Por tanto, se sugiere que las condiciones que conducen a la iniciación de estas lesiones difieren de la enfermedad humana que surge clínicamente con la pubertad. Además, la incidencia del tumor testicular en el ratón 129/mutación *ter*, no parece estar influenciado por la exposición a disruptores endocrinos. No obstante, esta cepa se ha utilizado para identificar factores genéticos que influyen en el desarrollo de tumores de células germinales (Stevens, 1967b; Pesce et. al., 1993).

1.6.4.2 Ratones CD-1

Estos roedores expuestos *in utero* a sustancias con actividad estrogénica, mostraron un aumento en la incidencia de tumores testiculares de células somáticas, así como la presencia de lesiones cancerosas en la *rete testis* (Newbold et. al., 1985) y en las células intersticiales (Newbold et. al., 1987).

La exposición *in utero* a etinil estradiol, en ratones macho, mostro un desarrollo testicular anormal (Yasuda et. al., 1985 y 1986) e hiperplasia de células intersticiales (Yasuda et. al., 1988).

1.6.5 *Rattus norvegicus* (ratas macho)

Algunas de las muchas cepas de roedores utilizadas tradicionalmente para estudios de fisiología reproductiva y toxicología desarrollan espontáneamente tumores de testículo, pero el origen y la fisiopatología de estos difieren de las formas principales de la enfermedad humana. Los tumores testiculares son comunes en ratas macho longevas de muchas cepas, aunque éstos son evidentes sólo en ratas seniles y surgen de células somáticas, particularmente intersticiales (Tennekes et. al., 2004).

1.6.6 *Oryctolagus cuniculus* (Conejos)

Conejos expuestos a sustancias con actividad estrogénica (Veeramachaneni & Vandewoude, 1999) y a dibutil ftalato (Higuchi et. al., 2003) mostraron reducción de la fertilidad y desarrollo testicular anormal, comparable con el síndrome de disgenesia testicular. También se identificó la presencia de células germinales atípicas en el epitelio seminífero.

2. JUSTIFICACION

El cáncer testicular tiene una incidencia en nuestro país de 9.2 casos por cada 100 000 habitantes; y el aumento de su incidencia, igual que en otros países industrializados, ha sido evidente (Liu et. al., 1999; Huyghe et. al., 2003; Bray et. al., 2006).

Dada la importancia de esta patología para nuestro país, recientemente se incluyó al cáncer testicular dentro de la cobertura del seguro popular.

El tumor de células germinales testiculares, tiene como lesión precursora al CIST (Rijlaarsdam & Looijenga, 2014). Sin embargo, no se ha avanzado en la descripción de su etología, ni en tratamientos preventivos, debido a que no se cuenta con un modelo animal que se apegue a la condición clínica, etiológica y fisiopatológica de esta enfermedad.

Como ya se mencionó, existen modelos animales como el de *C. elegans*, *Drosophila*, entre otros, sin embargo estos requieren de manipulación genética, que eleva su costo y no se apegan a la exposición a sustancias disruptoras medioambientales para el desarrollo de esta patología.

El estudio de los animales de laboratorio en la investigación biomédica, es un campo de interés para el médico veterinario, ya que permite aportar conocimiento en el ámbito de la salud humana.

El verdadero panorama en el ambiente de la investigación, es que no existen reales sustitutos del uso de animales de laboratorio. Los estudios con bacterias, cultivo de tejidos y diseños computacionales pueden proveer información útil, pero la complejidad de los organismos vivos requiere investigar y probar en animales que tengan fisiología similar con los humanos para alcanzar resultados confiables. (Navarro et. al., 2012).

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo de Carcinoma *in situ* Testicular (CIS_t) en el conejo chinchilla con administración de estradiol.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar en conejos de 60, 90 y 180 días post parto (dpp) con administración de estradiol:

- Las alteraciones histológicas testiculares propias del Carcinoma *in situ*.
- Las proteínas consideradas como biomarcadoras para el diagnósticos del Carcinoma *in situ* Testicular: Pou5f1 y c-KIT.
- Determinar inmunoreactividad al anticuerpo Ki-67.
- Describir el desarrollo de la patología a lo largo del tiempo.

5. HIPOTESIS

Al administrar estradiol (como un disruptor endócrino) a los conejos desde el día 7 al 60 post parto desarrollaran Carcinoma *in situ* Testicular, caracterizado por la expresión de proteínas específicas de esta patología.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Animales

El presente trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ de la UNAM. El manejo de los animales se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y siguiendo al pie de la letra los reglamentos internos de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INP y de la FMVZ.

Se emplearon 18 conejos macho (*Oryctolagus cuniculus*) raza chinchilla; se mantuvieron en un ciclo luz-obscuridad de 16 h: 8h y se alojaron con la madre hasta el destete, en cajas de acero inoxidable (90 cm x 60 cm x 40 cm), posterior a esta edad se colocaron en cajas individuales con alimento especial para conejos (Purina® rabbit chow) y agua a libre acceso. Se realizó la siguiente distribución en dos grupos:

Grupo control, formado por 9 animales, a los cuales se les practicó eutanasia a 3 conejos, para cada edad de 60, 90 y 180 días post parto (dpp), respectivamente.

Grupo experimental, también formado por 9 conejos, a los que se administró cada tercer día 0.023 mg de 17β estradiol disuelto en aceite de maíz como vehículo. Se inició a los 7dpp y hasta el día 60 post parto (pp); de igual forma se eutanasiaron, 3 conejos a los 60, 90 y 180 dpp.

La eutanasia fue practicada con una sobre dosis de pentobarbital sódico (i.p. 180 mg/kg; Pfizer).

Al momento de practicar la eutanasia se pesó a los animales y se obtuvieron quirúrgicamente los testículos, los cuales fueron pesados y se determinó la relación de peso testicular, respecto al corporal.

6.2 Procedimiento para obtener el tejido testicular.

El procedimiento utilizado para la extracción de los testículos, fue la técnica quirúrgica de castración. Iniciando con inducción de la anestesia (ip ketamina 45 mg/kg), previa sedación (ip xilacina 10 mg/kg).

Continuamos con antisepsia de la región abdominal e inguinal y se realizaron cortes en la piel escrotal (ambos lados) paralelos al pene, teniendo cuidado de no afectar túnica vaginal. Se desprendió el testículo del escroto conservando íntegra la túnica vaginal, que está firmemente adherida al tejido subcutáneo. Se hizo una disección cuidadosa y delicada. Al final del escroto la túnica vaginal está fuertemente unida por el ligamento de la cola del epidídimo, el cual debimos desgarrar para poder exteriorizar el testículo.

Una vez que el testículo se extrajo del escroto, se realizó tracción caudal, para exponer las fascias que lo recubren, de tal manera que quedó perfectamente visible la parte más estrecha del cordón, con la finalidad de retirar el testículo. Colocamos en el cordón tres ligaduras y pinza de hemostasis. Finalmente suturamos la piel con intradérmicas de nudos ocultos (Quesenberry et. al., 2004).

Ambos testículos de cada individuo se lavaron y fraccionaron en tres partes. La primera parte, se designó para su procesamiento e inclusión en resina epóxica, la segunda para inclusión en parafina y a su vez ser utilizadas para inmunohistoquímica y finalmente la tercera porción se canalizo a ultracongelación (-70 °C) para realización de PCR.

Una vez obtenidos los testículos se realizó el sacrificio humanitario.

6.3 Procesamiento del tejido testicular para su estudio morfológico

Se tomó la porción correspondiente de tejido testicular de cada conejo que se había dispuesto para inclusión en resina epóxica; inicialmente se fijó en Karnovsky modificado por 24 horas. Posteriormente se hicieron lavados con buffer de Cacodilatos de sodio al 0.1 M, durante 2 horas. Para la postfijación del tejido se colocaron en Tetróxido de Osmio al 1% (Zelterquist), durante 1 hora. La deshidratación de la muestra consistió en pases sucesivos de alcoholes a partir de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% hasta llegar a alcohol absoluto, durante 10 a 15 minutos en cada uno. Para iniciar el proceso de inclusión en la resina, a las muestras se les realizaron dos lavados con óxido de propileno, de 20 minutos cada lavado; y se continuó con diluciones de la resina epón, en el óxido de propileno, hasta llegar a la inclusión de las muestras en la resina pura e incubarlas en estufa a 60 °C. Posteriormente se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor, cortados con un ultramicrotomo Leica modelo Ultracut-UCT y se tiñeron con azul de toluidina al 5% (SIGMA, México), montados en un portaobjetos.

El análisis histomorfométrico se realizó utilizando un microscopio óptico OLIMPUS BX 51. Por cada animal se observaron de 30 a 40 secciones transversales de tubos seminíferos.

Las áreas de los cordones y/o tubos seminíferos se obtuvieron con un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 5.1, USA).

6.3.1 Cuantificación celular

A cada corte transversal se midió el área ya sea cordón o tubo seminífero y se cuantificó para cada grupo el número de gonocitos y/o espermatozonias y se realizaron gráficas donde se reportaron número de tipos celulares, según la edad correspondiente, por cada $10\,000\mu^2$.

Se determinó el grado de maduración del epitelio seminífero (Índice de Johnsen) y el índice histopatológico (Viguera et. al., 2011) (ver anexo).

6.4 Procesamiento para Microscopia Electrónica

En los conejos de 180 dpp se realizaron secciones ultrafinas de 60 a 90 nm, se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y nitrato de plomo. Fueron observados en un microscopio electrónico JEM – 1011 (JEOL, Osaka, Japón).

6.5 Procesamiento para Inmunohistoquímicas

Se tomó la porción de tejido testicular correspondiente para inclusión en parafina; y se fijó en paraformaldehído al 4% (SIGMA, México), durante 18 horas. Se hicieron lavados de PBS y se colocaron las muestras en el histoquinet, con la finalidad de incluirlas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de $5\mu\text{m}$ que se montaron en laminillas cubiertas con adhesivo.

Una vez montadas se desparafinaron en estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Continuando con dos lavados de xilol, de 5 minutos cada uno, después pasos sucesivos en OH/Xilol, OH100%, OH96%, OH70% y agua destilada por 5 minutos en cada lavado.

Se realizó el desenmascaramiento de los epítopes colocando las muestras en citrato de sodio al 0.01 M a pH 6 durante 15 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena se

bloqueó con H₂O₂ al 1% en metanol durante 30 minutos. Se continuó con lavados en agua destilada. Las laminillas fueron incubadas en solución de Twin 20 al 0.1%.

Existieron variantes en la técnica de la inmunohistoquímica, según el anticuerpo primario, y a continuación se citan:

6.5.1 Proliferación (ki-67)

Para este anticuerpo el bloqueo se realizó con albumina sérica bovina al 1% (Amersham Biosciences, Buckingham, UK) en PBS durante 2 horas; posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5, (Dako) (24 horas); Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa solo en fases activas del ciclo celular. Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (biotinilado) durante 2 horas. Las laminillas fueron lavadas en PBS y reveladas con diaminobencidina (Dako, USA) durante 3 minutos haciendo evidente los sitios de unión al anticuerpo. Por último, los tejidos fueron contrastados con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Esta técnica se realizó, tanto para el testículo derecho como izquierdo. Se midieron las áreas completas de los tubos seminíferos y se cuantificó número de células positivas. Los resultados se reportaron en número de células positivas por cada 10 000µ².

6.5.2 POU5F1 y C-KIT

Para estos anticuerpos, posterior al desenmascaramiento con citrato de sodio, se incubaron con proteinasa K; se les realizaron dos baños, el primero, con ácido clorhídrico (HCl) 2N y el segundo, con borato de sodio 0.1 M pH 8.5. El bloqueo se realizó con suero de burro 5% (Santa Cruz Biotechnology, USA) y albumina de suero bovino 5% (Amersham Biosciences, Buckingham, UK). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario Monoclonal Mouse OCT 3/4 (POU5F1) (Santa Cruz, USA) 24 horas o el C-KIT.

Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (biotinilado) durante 2 horas. Las laminillas fueron lavadas en PBS y reveladas con diaminobencidina (Dako, USA) durante 3 minutos haciendo evidente los sitios de unión al anticuerpo. Por último fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

6.6 Positividad a POU5F1 y C-KIT.

Esta técnica se realizó, tanto para el testículo derecho como izquierdo. Se midieron las áreas completas de los tubos seminíferos y se cuantificó número de células positivas. Los resultados se reportaron en número de células positivas por cada $10\,000\mu^2$.

6.7 Determinación de la expresión génica (RT –PCR)

El proceso de RT-PCR se realizó en cuatro pasos secuenciados: 1) Se hizo extracción del RNA total; 2) Se realizó cuantificación del RNA total; 3) Llevamos a cabo la purificación del RNA total y para finalizar realizamos el RT-PCR propiamente dicho.

Para la extracción se tomaron 250 μ l de muestra de tejido testicular agregando 500 μ l de TRIZOL (TRI REAGENT®), se homogenizó y se agregaron 250 μ l adicionales de TRIZOL, para obtener una concentración final de 1:3; incubamos por 20 minutos en hielo (10° a 15° C). Después, separamos la muestra agregando 200 μ l de cloroformo por cada 750 μ l de Trizol, usamos el vortex por 10 segundos. Una vez que la muestra se separó en dos fases, la almacenamos por 15 min a temperatura entre 10° y 15° C. Posteriormente centrifugamos a 14000 rpm por 30 min a 4° C. El sobrenadante lo transferimos a un eppendorf y agregamos 500 μ l de isopropanol. Almacenamos durante 12 horas a -20° C para permitir la precipitación del RNA.

Al día siguiente centrifugamos a 14000 rpm durante 30 min, se desechó el sobrenadante. El pellet que obtuvimos, se lavó con 100 μ l de alcohol al 80% libre de RNAsa. Centrifugamos por 15 min a 4° C, para retirar el alcohol sobrenadante y el pellet lo

dejamos secar a temperatura ambiente por 20 min y lo re-suspendimos en agua libre de RNAsa.

La cuantificación del RNA la efectuamos a partir de una alícuota de 1µl de RNA total, en un espectrofotómetro NanoDrop. Realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 1% (80 volts x 40 min) para comprobar la integridad del RNA.

La purificación del RNA total la llevamos a cabo 2 días antes del RT-PCR, para eliminar DNA y proteínas contaminantes; utilizamos *desoxiribonuclease I amplification grade kit* (Invitrogen™) mas RNasa por 15 min a temperatura ambiente. La RNasa fue inactivada con EDTA 25 mM incubando por 10 min a 65°C.

Para el RT-PCR empleamos el kit *one step* de QIAGEN y seguimos el protocolo sugerido por el fabricante para lograr la síntesis, desnaturalización, alineación y extensión total del cDNA amplificado.

Para la amplificación por PCR de punto final se utilizaron *primers* específicos, que fueron diseñados con ayuda del programa *Essay by design de applied biosystems*, para los genes en estudio. Tomamos como gen de referencia a la beta actina.

La cuantificación que realizamos es semicuantitativa y se realiza comparando cada uno de los amplificados de los genes en estudio con el amplificado del gen de referencia mediante densitometría.

6.8 Análisis estadístico

Se compararon las medias: números de células con positividad a la expresión de las proteínas de células pluripotentes (POU5F1 y C-Kit); áreas de los cordones y/o tubos seminíferos; número de gonocitos y/o espermatogonias por cada 10 000µ² de área; índice de maduración epitelial e histopatológico; relación peso testicular/peso corporal. Entre los grupos experimental y control; se realizó la prueba de t de *student* para las edades de 60, 90 y 180 dpp considerando una p<0.05. Los resultados se expresaron como $\bar{X} \pm ES$.

7. RESULTADOS

7.1 Anatomía Testicular en Conejos de 60 dpp

La relación peso testicular - peso corporal de los conejos del grupo control fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que para los del grupo experimental (gráfica 1 y tabla 1).

En los conejos del grupo control se observó una anatomía testicular, que corresponde a lo reportado para la especie, a esta edad (figura 3-A); testículos escrotados, pene en tamaño y desenvainado apropiados.

Respecto a la relación testículo – peso corporal en los conejos del grupo experimental, se comportó con un marcado decremento en relación a los del grupo control de esta misma edad (gráfica 1 y tabla 1).

En todos los conejos del grupo experimental contrario a lo observado en los conejos del grupo control, no se observó el descenso testicular (figura 3-B). Al incidir en cavidad abdominal localizamos los testículos en la parte media de esta.

7.2 Anatomía Testicular en Conejos de 90 dpp

La relación peso testicular - peso corporal de los conejos del grupo control, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que para los del grupo experimental (gráfica 1 y tabla 1).

En los conejos del grupo control se observó una anatomía testicular, que corresponde a lo reportado para la especie a esta edad (figura 3-C); testículos escrotados, pene en tamaño y desenvainado apropiados.

Respecto a la relación testículo – peso corporal de los conejos del grupo experimental, también se observó un marcado decremento con respecto a los del grupo control de esta edad; debido al bajo peso testicular de este grupo (gráfica 1 y tabla 1). Respecto al peso

corporal del grupo experimental, no tuvo variantes significativas respecto al grupo control de esta edad.

En los conejos del grupo experimental, contrario a lo observado en los conejos del grupo control, no se observó el descenso testicular (figura 3-D). Los testículos estuvieron localizados inguinales una vez que incidimos la cavidad.

7.3 Anatomía Testicular en Conejos de 180 dpp

La relación peso testicular - peso corporal en los conejos del grupo control fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que para el grupo experimental (gráfica 1 y tabla 1).

En los conejos del grupo control se observó una anatomía testicular, que correspondió a lo reportado para la especie a esta edad (figura 3-E); testículos escrotados, pene en tamaño y desenvainado apropiados.

Respecto a la relación testículo – peso corporal en los conejos del grupo experimental, se mantuvo este marcado decremento respecto a los del grupo control de esta misma edad (gráfica 1 y tabla 1); dato seguramente influenciado por el bajo peso testicular de este grupo.

Respecto al peso corporal en este grupo experimental, no tuvo variantes significativas respecto al grupo control de esta misma edad.

En los conejos del grupo experimental, contrario a lo observado en los conejos del grupo control, no se observó el descenso testicular (figura 3-F); es decir, todos los conejos desarrollaron criptorquidia inguinal bilateral.

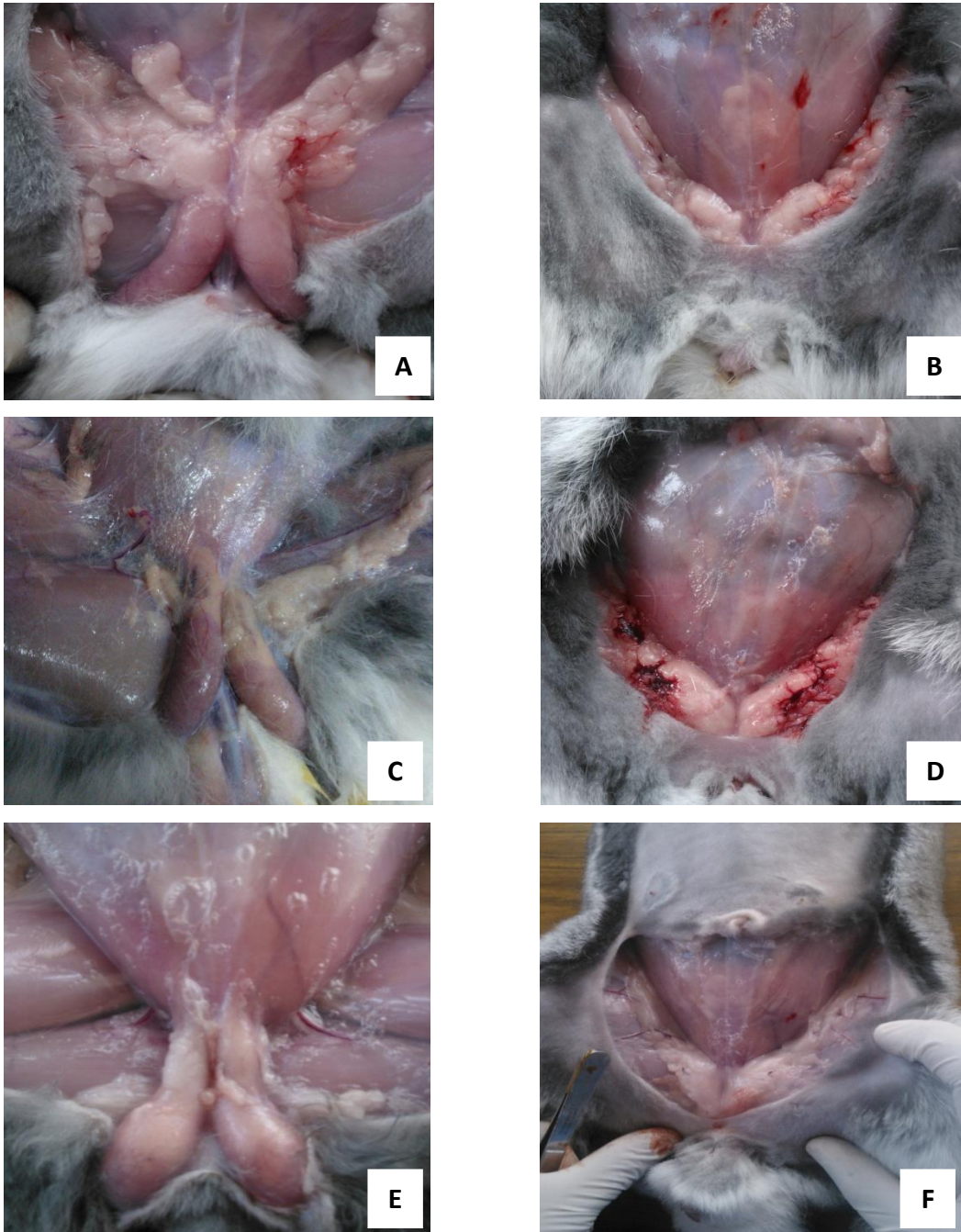


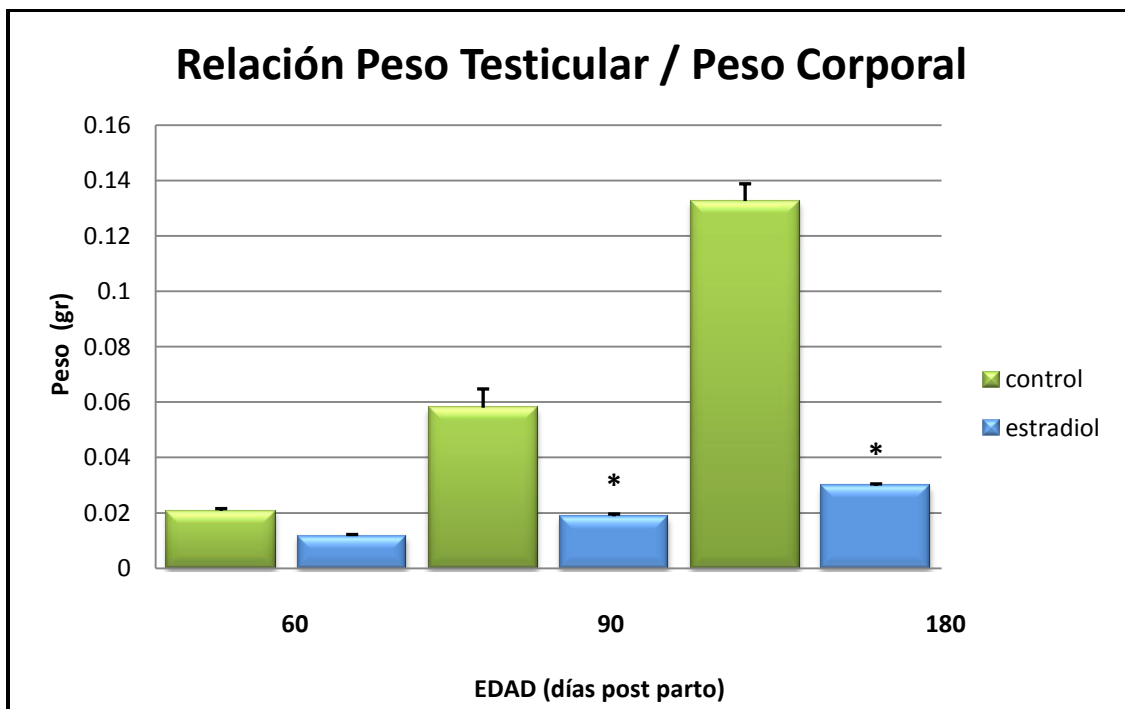
Figura 3: Anatomía testicular en Conejos.

A-C-E) Conejos del grupo control de 60, 90 y 180 dpp, respectivamente, se aprecian los testículos en posición y tamaño adecuados. B-D-F) Conejos del grupo experimental de 60, 90 y 180 dpp respectivamente, en todas las edades se presentó criptorquidia bilateral.

RELACION PESO TESTICULAR / PESO CORPORAL							
CONEJOS GRUPO CONTROL				CONEJOS GRUPO EXPERIMENTAL			
Edad (dpp)	Peso corporal (grs)	Peso testicular (grs)	Relación P. test/ P. corp ± ES	Edad Eutanasia (dpp)	Peso corporal (grs)	Peso Testicular (grs)	Relación P. test/ P. corp ± ES
60	1667	0.3470	0.0207 ± 0.0007	60	1580	0.1850	0.0116 ± 0.0005
90	2660	1.5433	0.0576 ± 0.0068	90	2640	0.4960	0.0187* ± 0.0008
180	3290	4.3643	0.1326 ± 0.0059	180	3105	0.9357	0.0299* ± 0.0008

Tabla 1: Relación Peso Testicular / Peso Corporal.

Se muestran datos de conejos de grupo control y experimental, de peso corporal y testicular; así como la relación peso testicular/ peso corporal ± ES (*p<0.05 VS control de la misma edad).



Gráfica 1: Relación Peso Testicular/ Peso Corporal (*p<0.05 VS control de la misma edad).

7.4 Descripción Histológica

7.4.1 Conejos de 60 dpp

En el grupo de los conejos control, se observaron espermatogonias de reciente diferenciación; aunque, existió convivencia alternada entre estas células y gonocitos en proceso de diferenciación (figura 4-A). Los resultados en los conteos de número de gonocitos y/o espermatogonias por cada 10000 μ^2 mostraron que este grupo control, a esta edad, es significativamente mayor ($p < 0.05$) el número de espermatogonias respecto al número de gonocitos (gráfica 2 y tabla 2).

Las áreas de los cordones, el índice de maduración epitelial y el índice histopatológico se muestran en las gráficas 3, 4 y 5 y tabla 3.

En los conejos del grupo experimental fue evidente la presencia de abundantes gonocitos con sus características morfológicas típicas con retardo en el desarrollo, ya que se aprecian pocas espermatogonias en proceso de diferenciación. Los gonocitos se observaron emitiendo proyecciones citoplasmáticas y los núcleos de las células de Sertoli en organización hacia la lámina basal (figura 4 B y C). A esta edad se mostró menor cantidad de espermatogonias diferenciadas y mayor número significativo de gonocitos ($p < 0.05$ comparado con el grupo control) (gráfica 2 y tabla 2).

Las áreas de los cordones (gráfica 3 y tabla 3), fueron significativamente menores ($p < 0.05$), respecto a los controles. En cortes transversales, al evaluar maduración epitelial (gráfica 4 y tabla 3) se observó que conejos del grupo experimental se comportaron igual a los controles. Sin embargo al evaluar índice histopatológico (gráfica 5 y tabla 3), observamos que este es significativamente mayor ($p < 0.05$), con respecto a los controles.

7.4.2 Conejos de 90 dpp

En los conejos del grupo control la citoarquitectura testicular esta adecuadamente establecida, casi concluyéndose en un tubo seminífero, con la luz característica de esta estructura. Respecto a la espermatogénesis, se observó que está en proceso de concluirse, pudimos identificar, espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redonda y elongadas; no se observaron espermatozoides (figura 4-D). En los conteos del número de gonocitos y/o espermatogonias (gráfica 2 y tabla 2), es importante enfatizar desde esta edad la ausencia de los gonocitos, para el caso de los conejos del grupo control.

Se identificaron alteraciones histológicas, que ya han sido previamente reportadas en epitelios seminíferos de conejos clínicamente sanos como, descamación y vacuolización celular.

Las áreas de los tubos seminíferos, el índice de maduración epitelial y el índice histopatológico se presentan en la tabla 3 y gráficas 3, 4 y 5.

En los conejos del grupo experimental, se observó la presencia de gonocitos, que se mantuvieron como células persistentes y sanas, pues no se aprecian características morfológicas de apoptosis. Tampoco se observó luz tubular, es decir, aún son cordones testiculares. Se apreció excesiva vacuolización en la parte central de los cordones. Los núcleos de las células de Sertoli, no mostraron una distribución ordenada, ya que algunas se ubicaron hacia la periferia del cordón y otras en la parte central de estos (figura 4 E y F). Los conteos de gonocitos y/o espermatogonias se muestran en la gráfica 2 y tabla 2. Podemos identificar que respecto a los conejos de 60 dpp del grupo experimental, se vio un decremento en el número de estas células. Aunque también se aprecia la diferenciación de algunas espermatogonias, pero en menor proporción respecto a los del grupo control.

El área del epitelio seminífero y el índice de maduración epitelial, resultaron significativamente menores ($p < 0.05$) en este grupo de conejos. Respecto al índice

histopatológico, fue claro el incremento significativo ($p < 0.05$), respecto a los controles (tabla 3 y gráficas 3, 4 y 5).

7.4.3 Conejos de 180 dpp

Para el grupo control se observó citoarquitectura testicular con espermatogénesis francamente establecida. Se apreciaron todas las etapas de las células germinales desde espermatogonias, espermatocitos, espermatidas redondas y hasta elongadas. No se observaron gonocitos (figura 5-A) y el número de espermatogonias fue similar al de los conejos controles de 90 dpp (gráfica 2 y tabla 2); sin embargo las espermatogonias a esta edad, se distribuyeron en mayor cantidad de área, pues los tubos seminíferos aumentaron en tamaño de los 90 dpp a los 180 dpp.

Identificamos alteraciones en el epitelio seminífero de los conejos del grupo control, a esta edad, como vacuolización y descamación celular.

El área del epitelio seminífero, así como el índice de maduración epitelial, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$), respecto a los del grupo experimental. El índice histopatológico, resultó ser significativamente menor ($p < 0.05$), a esta edad en controles, respecto a los del grupo experimental (tabla 3 y gráficas 3, 4 y 5).

En el grupo experimental no se observó un epitelio seminífero en producción; se identificaron características morfológicas que la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Elbe et al, 2004) establece para la clasificación del CIST, como son: presencia de células atípicas, grandes y que se tiñen pálidas; con núcleos grandes, irregulares e hiperromáticos; presencia de uno o más nucléolos irregulares; abundantes mitosis; células ubicadas a nivel basal principalmente; lamina basal plegada o engrosada y ausencia de espermatogénesis (figura 5 B, C y D).

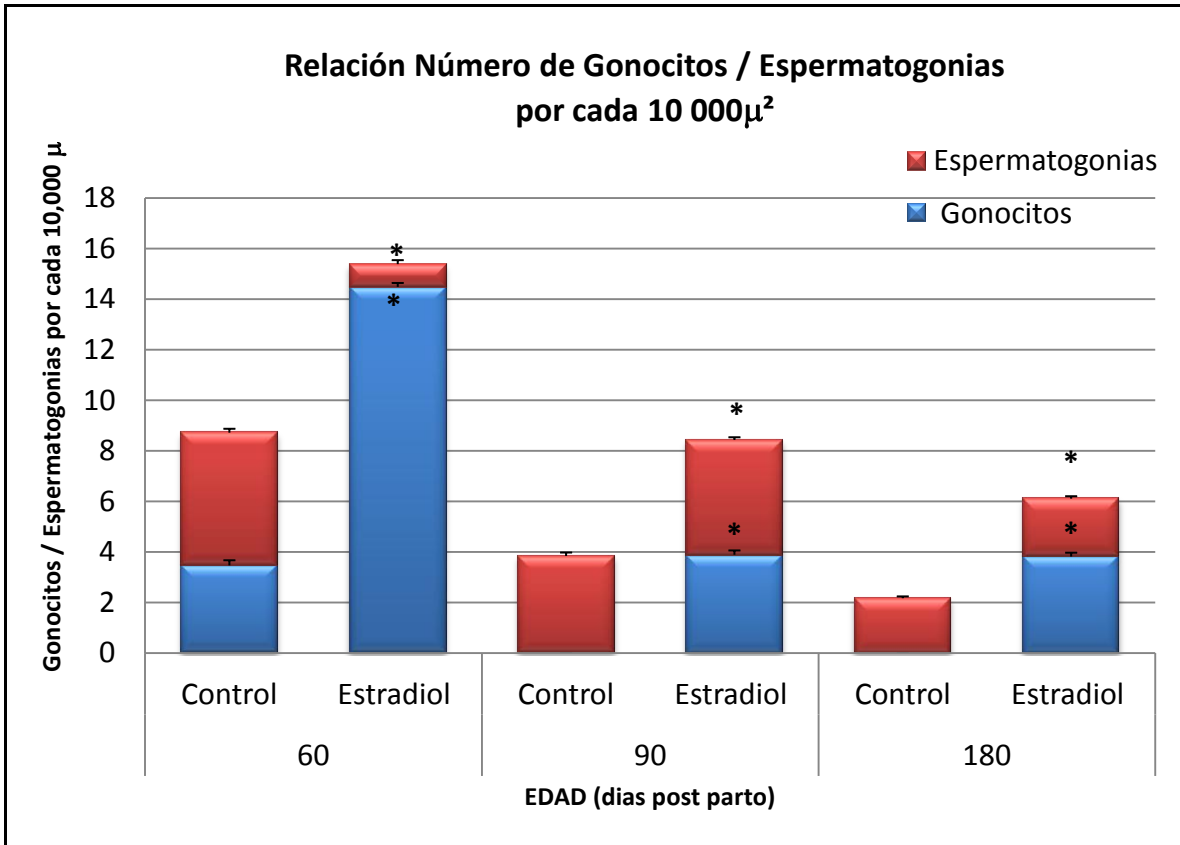
El conteo de gonocitos y/o espermatogonias es contundente, respecto a la permanencia de los gonocitos, ya que en estos conejos, el número de gonocitos se mantuvo constante, respecto al de los conejos de 90 dpp del grupo experimental. Gráficamente observamos, una disminución en el número de espermatogonias, respecto a los conejos del grupo experimental de 90 dpp (tabla 2 y gráfica 2).

El área del epitelio seminíferos e índice de maduración epitelial fueron significativamente menores ($p < 0.05$), respecto a los controles a esta edad. El índice histopatológico fue significativamente mayor ($p < 0.05$) (tabla 3 y gráfica 3, 4 y 5).

EDAD (dpp)	GONOCITOS/ 10000 μ^2		ESPERMATOGONIAS/ 10000 μ^2	
	CONTROL	EXPERIMENTAL	CONTROL	EXPERIMENTAL
60	3.50 \pm 0.20	14.49* \pm 0.52	5.30 \pm 0.15	0.90* \pm 0.16
90	0 \pm 0	3.895* \pm 0.172	5.02 \pm 0.12	3.85* \pm 0.014
180	0 \pm 0	4.23* \pm 0.191	2.31 \pm 0.095	2.17* \pm 0.072

Tabla 2: Número de Gonocitos y/o Espermatogonias por cada 10000 μ^2

Número de gonocitos y/o espermatogonias por cada 10000 μ^2 , en conejos de 60, 90 y 180 dpp del grupo control y experimental (* $p < 0.05$ Vs Grupo control de la misma edad).



Gráfica 2: Número de Gonocitos y/o Espermatogonias por cada 10 000 μ^2 de área de cordón y/o tubo seminífero, para cada edad.

(*p<0.05 Vs Grupo control de la misma edad).

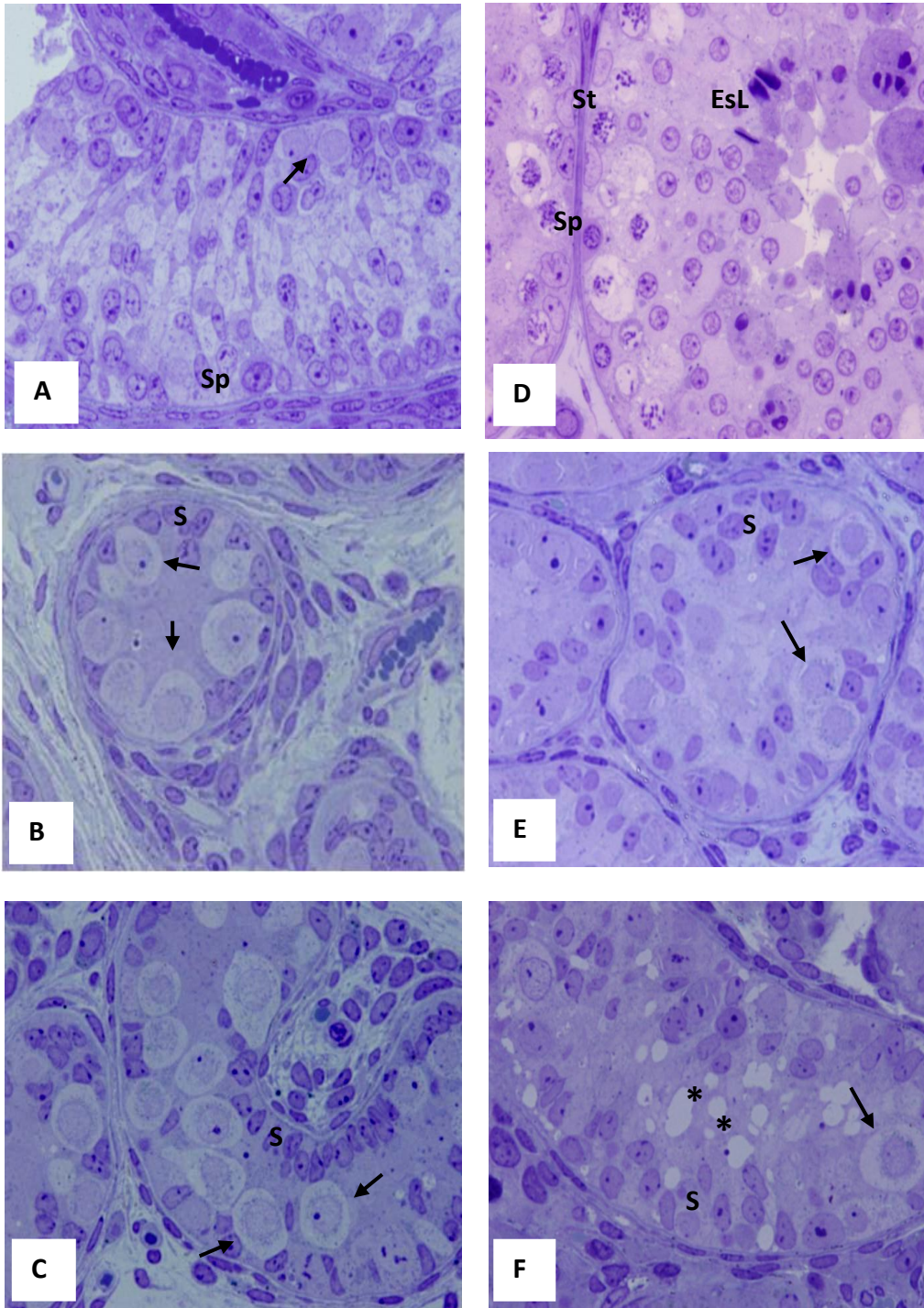


Figura 4: Epitelio Seminífero de Conejos de Grupo Control y Experimental de 60 dpp y 90 dpp.

A) Epitelio seminífero de grupo control de 60dpp, en donde se observan, espermatogonias de reciente diferenciación y todavía la presencia de algunos gonocitos (flecha). B y C) epitelio seminífero del grupo experimental de 60 dpp, donde se aprecia abundante presencia de gonocitos (flechas) y células de Sertoli (S) localizadas hacia la membrana basal. D) Epitelio seminífero del grupo control de 90 dpp. Son evidentes las espermatogonias a nivel basal, espermatocitos y espermatidas elongadas 100X. E y F) Epitelio seminífero de conejos del grupo experimental, de 90 dpp, se aprecia un retraso en la maduración del epitelio y los gonocitos (flechas) y células de Sertoli que perdieron orden respecto a los conejos de 60 dpp del grupo control, además excesiva vacuolización (asteriscos) en parte central del cordón. Sp = espermatogonias; S= células de Sertoli; St = espermatocitos; EsL = espermatidas elongadas. Azul de Toluidina, 60X.

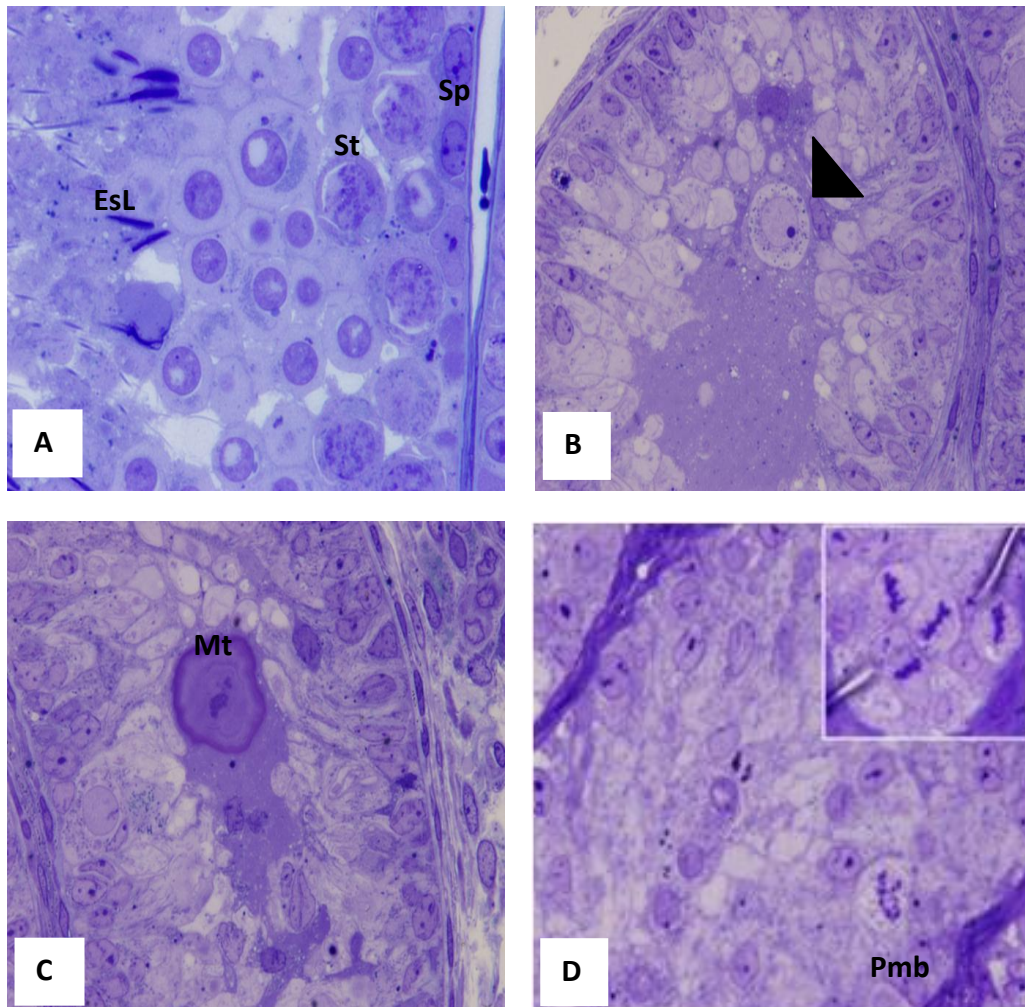
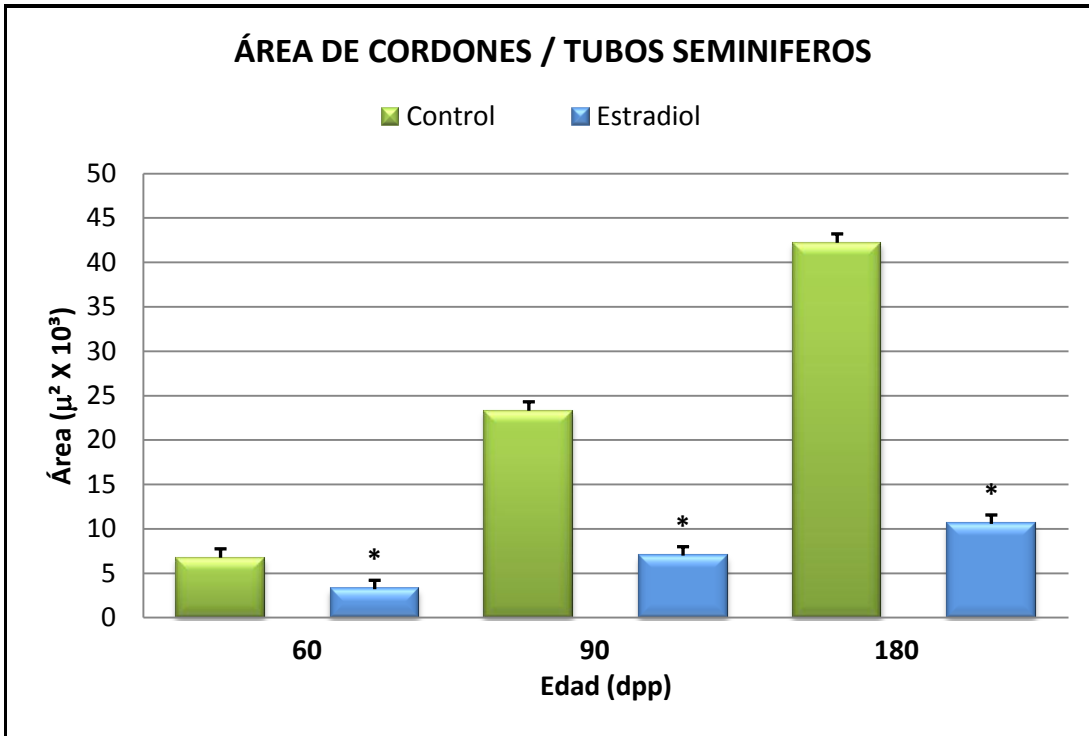
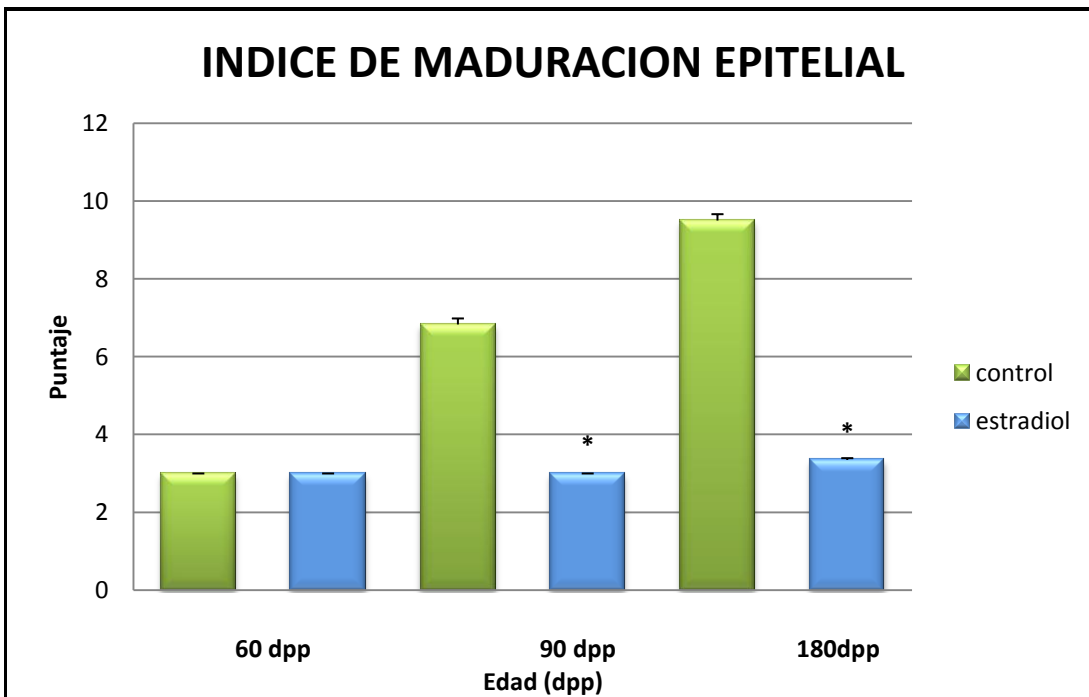


Figura 5: Epitelio Seminífero de Conejos de Grupo Control y Experimental de 180 dpp.

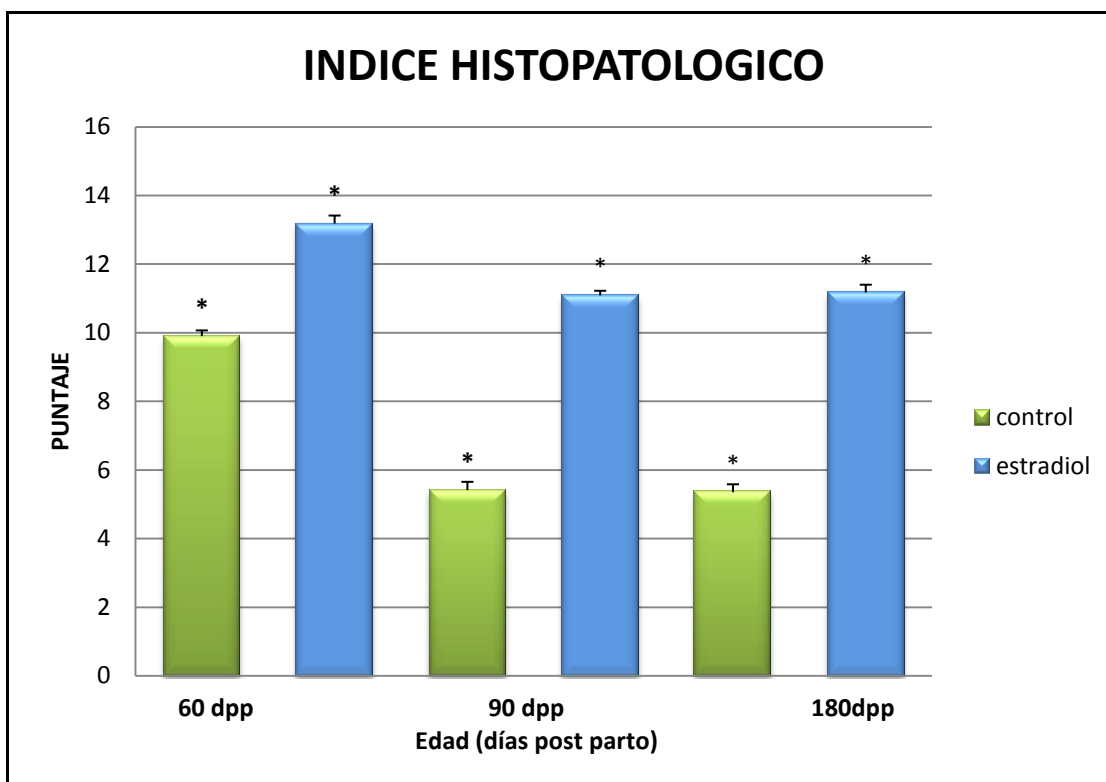
A) Epitelio seminífero del grupo control de 180 dpp, su citoarquitectura es apropiada, en la cual se observan espermatogonias, espermatocitos y espermatidas elongadas 100X. B-C-D) Epitelio seminífero de conejos del grupo experimental de 180 dpp; se identifica la presencia de células atípicas (cabeza de flecha) y lesiones que establece la OMS, para el diagnóstico de CIST: microlitiasis, plegamiento y engrosamiento de la membrana basal, así como abundantes mitosis (inserto superior izquierdo 100X, figura D). Sp = espermatogonias; St = espermatocitos; EsL = espermatidas elongadas; Mt = microlitiasis; Pmb = Engrosamiento y plegamiento de la membrana basal. 60X Azul de Toluidina.



Gráfica 3: Área de los Cordones y/o Tubos en micras cuadradas (μ^2)
 Muestra el área de los cordones y/o tubos en micras cuadradas (μ^2), medidos en cortes transversales de conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 (* $p < 0.05$ Vs grupo control de la misma edad).



Gráfica 4: Índice de Maduración Epitelial
 Muestra Índice de maduración epitelial en conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 dpp. (* $p < 0.05$ Vs grupo control de la misma edad).



Gráfica 5: Índice Histopatológico

Muestra Índice Histopatológico en conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 dpp (*p<0.05 Vs grupo control de la misma edad).

EDAD dpp	AREA EPITELIO SEMINIFERO (μ^2)		INDICE DE MADURACION		INDICE HISTOPATOLOGICO	
	CONTROL	ESTRADIOL	CONTROL	ESTRADIOL	CONTROL	ESTRADIOL
60	6746 ± 113	3205* ± 75	3 ± 0	3 ± 0	9.29 ± 0.29	12.38* ± 0.39
90	23301 ± 514	6997* ± 135	6.83 ± 0.15	2.962 * ± 0.019	6.85 ± 0.36	10.41* ± 0.30
180	42209 ± 675	10527 * ± 224	9.5 ± 0.16	3.358* ± 0.044	5.38 ± 0.24	11.10* ± 0.24

Tabla 3: Áreas de Epitelio Seminífero, Índice de Maduración Epitelial e Histopatológico.

Muestra áreas de epitelio seminífero, índice de maduración epitelial e índice histopatológico de conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 dpp. Los resultados son expresados en media ± E.S. (*p<0.05 Vs grupo control de la misma edad).

7.5 Microscopia Electrónica

7.5.1 180 dpp

En congruencia con lo observado, en cortes semifinos, de los conejos control a los 180 dpp; a nivel de microscopia electrónica se identificó la citoarquitectura característica de un epitelio seminífero activo, con las diferentes etapas de las células germinales (figura 6-A).

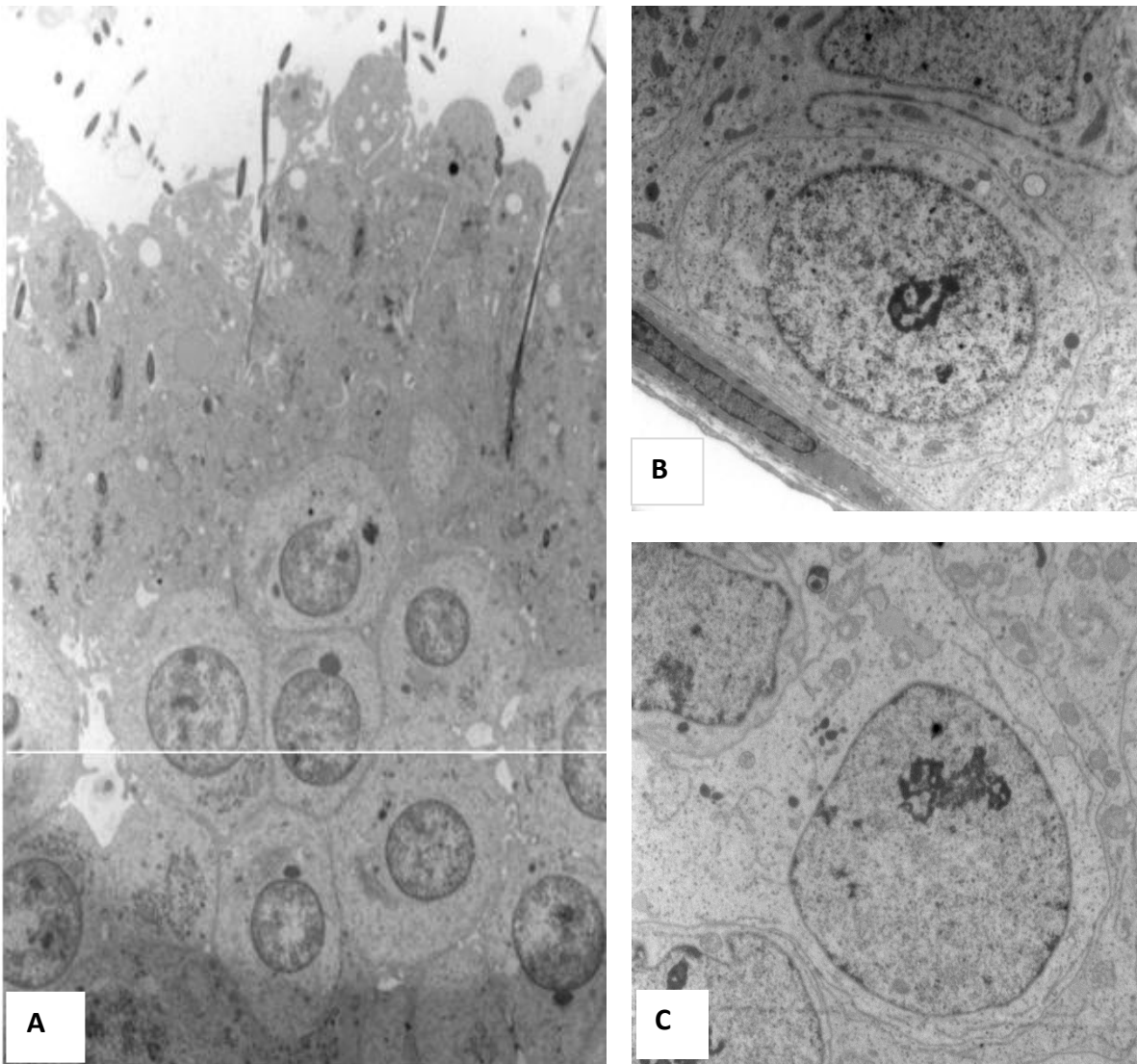


Figura 6: Microscopia Electrónica

- A) Epitelio seminífero de conejo control 180 dpp (3000x); B) Espermatogonia de conejo control de 180 dpp (10000x); C) Gonocito persistente en conejos de 180 dpp, del grupo experimental (8000x).

También fue evidente que las espermatogonias de estos conejos control poseen características propias de estas células, localizadas hacia la membrana basal, de forma ovalada, núcleo esférico, su citoplasma homogéneo y pálido; la cromatina distribuida en gránulos alrededor del núcleo (figura 6-B).

Es importante enfatizar que en los conejos de 180 dpp administrados con estradiol, no se identificaron las características propias de un epitelio seminífero maduro y fue evidente que la presencia de las células atípicas a esta edad corresponden a gonocitos no diferenciados (figura 6-C).

7.6 Inmunohistoquímicas

7.6.1 Proliferación ki-67 en conejos de 60 dpp

En los conejos del grupo control se observó un bajo índice de proliferación (figura 7-A, gráfica 6 y tabla 5).

En los conejos del grupo experimental se encontró un índice de proliferación significativamente mayor ($p < 0.05$), respecto a los controles (figura 7-B, gráfica 6 y tabla 5).

Esta inmunoreactividad se presentó en las células germinales y también se logró identificar en las células de Sertoli, tanto en el grupo control, como en el grupo experimental.

7.6.2 Proliferación ki-67 en conejos de 90 dpp

En los conejos del grupo control fue evidente la presencia de abundante actividad proliferativa de las células germinales (espermatogonias y espermatocitos). Ya no se detectó inmunoreactividad en las células de Sertoli (figura 7-C). En este grupo de conejos control se detectó un índice de proliferación sin diferencia significativa con respecto al grupo experimental ($p < 0.05$) (gráfica 6 y tabla 5).

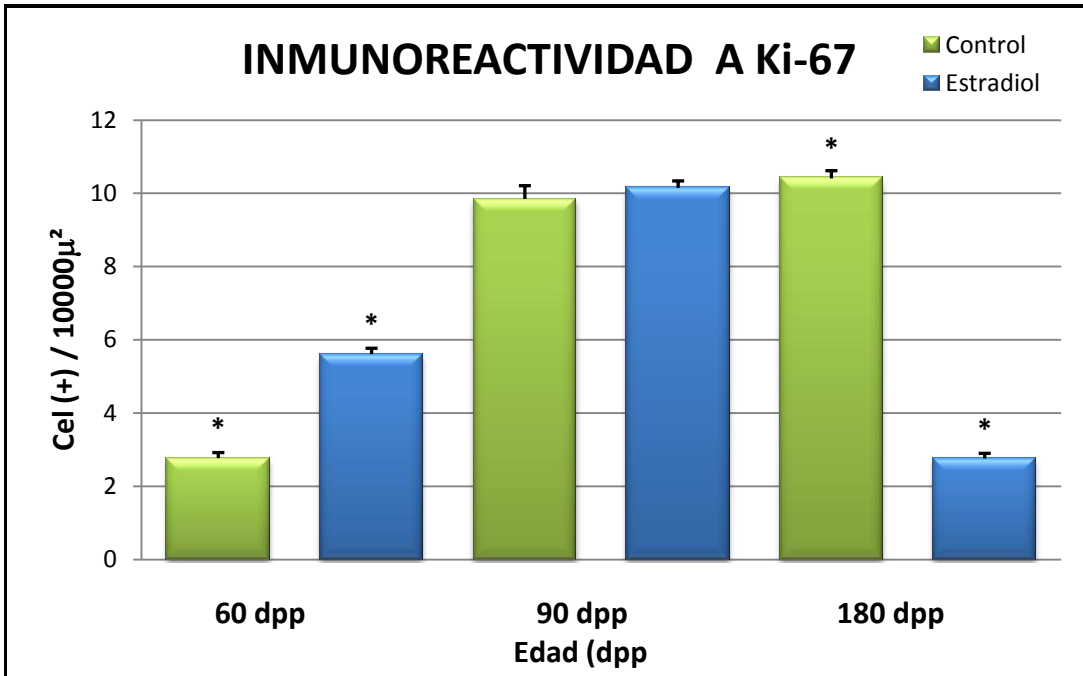
En los conejos del grupo experimental, aun se logró identificar positividad a Ki-67 en las células de Sertoli (figura 7-D).

7.6.3 Proliferación / ki-67 en conejos de 180 dpp

En el grupo control fue abundante y clara la presencia de actividad proliferativa, característica de un epitelio seminífero de animales en etapa reproductiva (figura 7-E).

Las células en proliferación se localizaron hacia la base de los tubos seminíferos y en la parte media del epitelio que correspondió a espermatogonias y espermatocitos respectivamente (figura 7-E, gráfica 6 y tabla 5).

En los conejos del grupo experimental, se identificó un índice de proliferación significativamente menor ($p < 0.05$), respecto a los del grupo control. Sin embargo, en estos conejos del grupo experimental, en comparación a los del grupo control, de esta misma edad, no se logró apreciar un epitelio seminífero maduro, se mantuvieron sin luz y la presencia de células en proliferación fue desordenada y no respetaron estratos; incluso se identificaron células en proliferación en la parte central de los cordones (figura 7-F). Lo que permitió asumir que esta actividad proliferativa correspondió a células atípicas, pues en cortes semifinos se pudo identificar de igual forma, que éstas no tienen un orden aparente, en su distribución dentro del epitelio seminífero.



Gráfica 6: Inmunoreactividad a Ki-67

Representa la inmunoreactividad a Ki-67 (Índice de Proliferación) (*p<0.05 Vs grupo control de la misma edad).

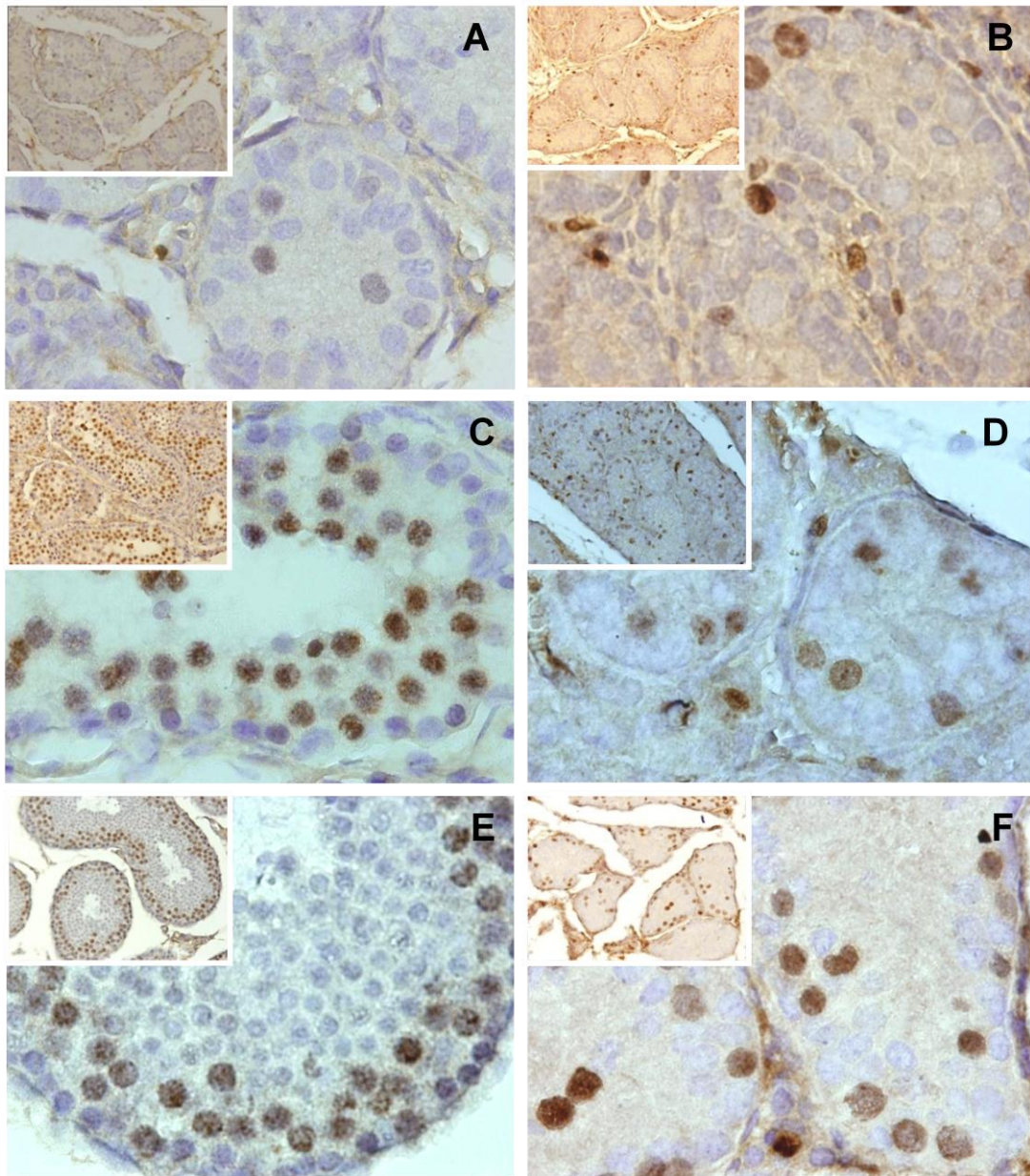


Figura 7: Inmunohistoquímicas para Ki-67

Inmunohistoquímicas para Ki-67 en tejido de conejos del grupo control: A) 60 dpp, C) 90 dpp y E) 180 dpp y conejos del grupo experimental, B) 60 dpp, D) 90 dpp y F) 180 dpp. 60X e inserto 20X.

7.6.4 POU5F1 en Conejos de 60 dpp

Los conejos del grupo control y experimental, mostraron inmunoreactividad a POU5F1 (figura). Esto coincidió con nuestras observaciones a nivel histomorfológico, por la convivencia alternada que existe entre espermatogonias y gonocitos, para el caso de los conejos control. Es evidente que la positividad a POU5F1 para el caso de los animales control, a esta edad fue de significativamente menor ($p < 0.05$) (figura 11) que para los conejos del grupo experimental.

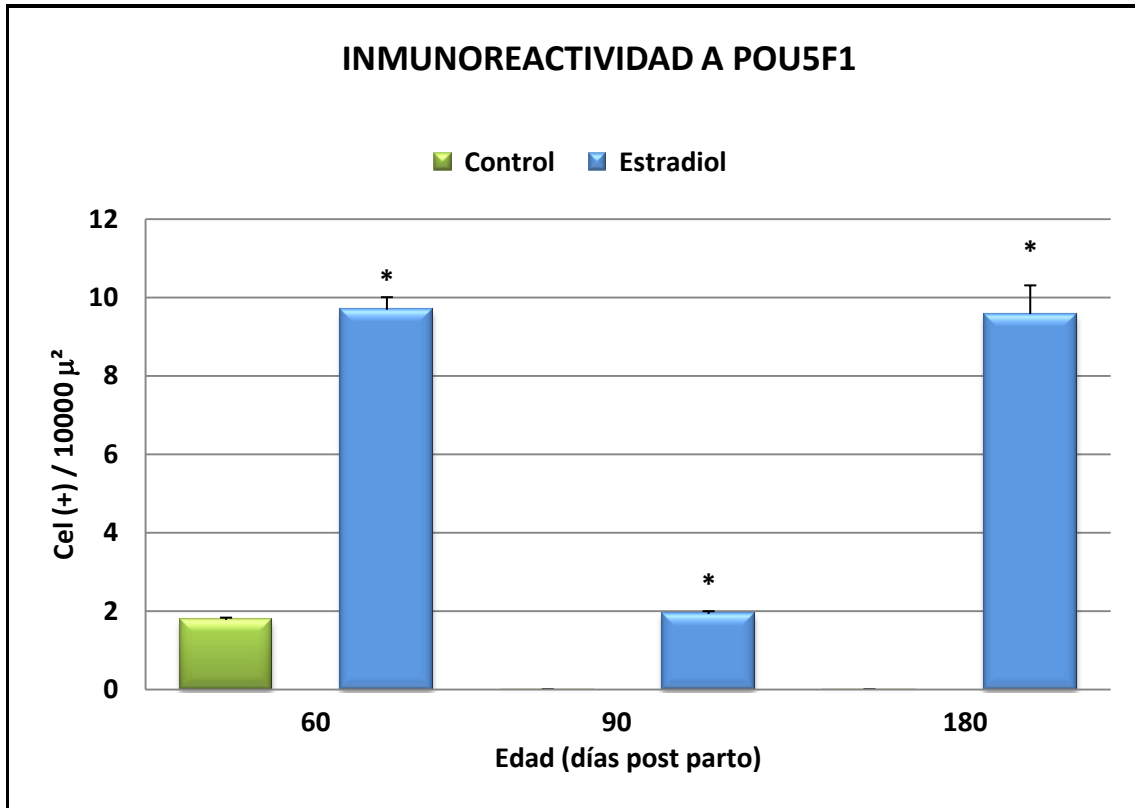
En los conejos del grupo experimental, a esta edad, se identificó inmunoreactividad tanto de tipo nuclear como citoplasmática (figura 12, 13-G). Solo para esta edad se realizó grafico comparativo entre ambos tipos, ya que esta disposición se identificó únicamente a esta edad (figura 12).

7.6.5 POU5F1 en Conejos de 90 dpp

Se observó en los conejos del grupo control (figura 11, 13-C), ausencia total de inmunoreactividad a POU5F1. Sin embargo, en los conejos del grupo experimental es evidente que se mantiene la positividad al anticuerpo (figura 11, 13-D).

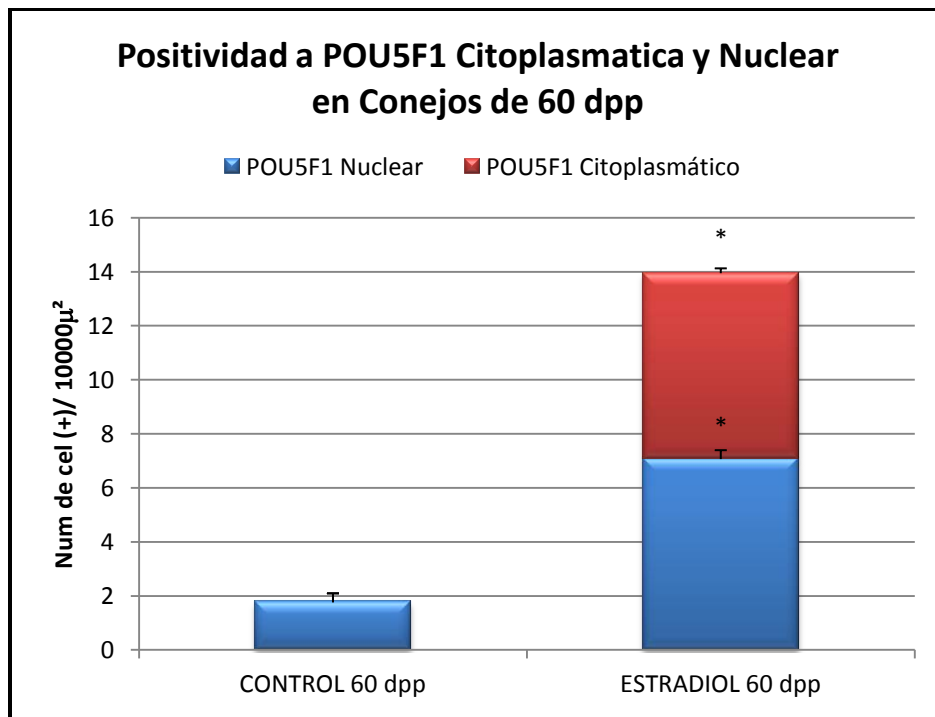
7.6.6 POU5F1 en Conejos de 180 dpp

En los conejos control, existió ausencia total de inmunoreactividad a POU5F1 (figura 11, 13-E); y en tejido de conejos del grupo experimental (figura 11, 13-F), ocurrió lo contrario, ya que existió inmunoreactividad a POU5F1 (figura 11).



Gráfica 7: Inmunoreactividad a POU5F1

Representa inmunoreactividad a POU5F1. En conejos del grupo control y experimental (* $p < 0.05$ Vs grupo control de la misma edad).



Gráfica 8: Positividad a POU5F1 en sus dos variantes identificadas en conejos de 60 dpp (* $p < 0.05$ Vs grupo control de la misma edad).

CONEJOS 60 dpp	POU5F1 Nuclear	POU5F1 Citoplasmático
	Núm. células (+) / 10000 μ^2	
CONTROL	1.77	0
ESTRADIOL	7.07*	6.88*

Tabla 4: Inmunopositividad a POU5F1 Nuclear y Citoplasmática.

Inmunopositividad a POU5F1 nuclear y citoplasmática en conejos de 60 dpp del grupo control y experimental (* $p < 0.05$ Vs grupo control de la misma edad).

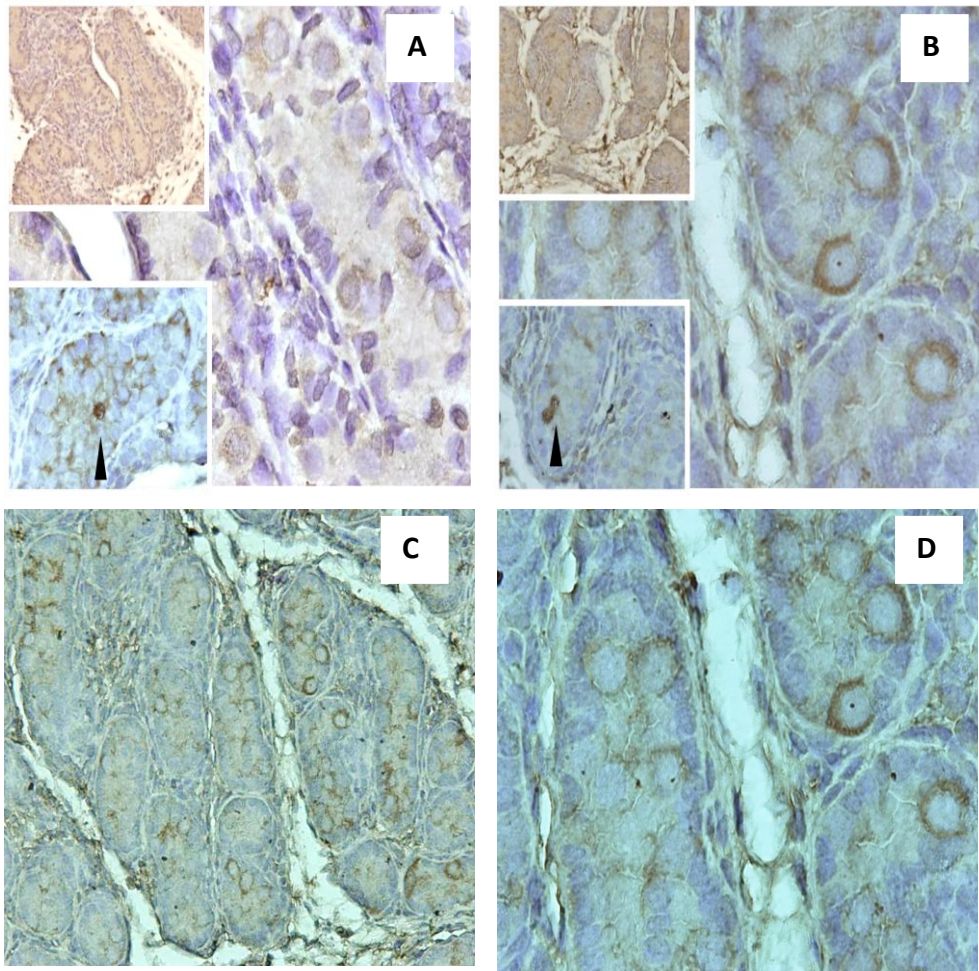


Figura 8: Inmunohistoquímica para POU5F1 en Tejido de Conejos de 60 dpp

A) Grupo control, B) Grupo experimental con inmunopositividad nuclear. 20X e inserto 60X. C) Grupo experimental con inmunopositividad citoplasmática. 20X. D) Grupo experimental con inmunopositividad citoplasmática 60X.

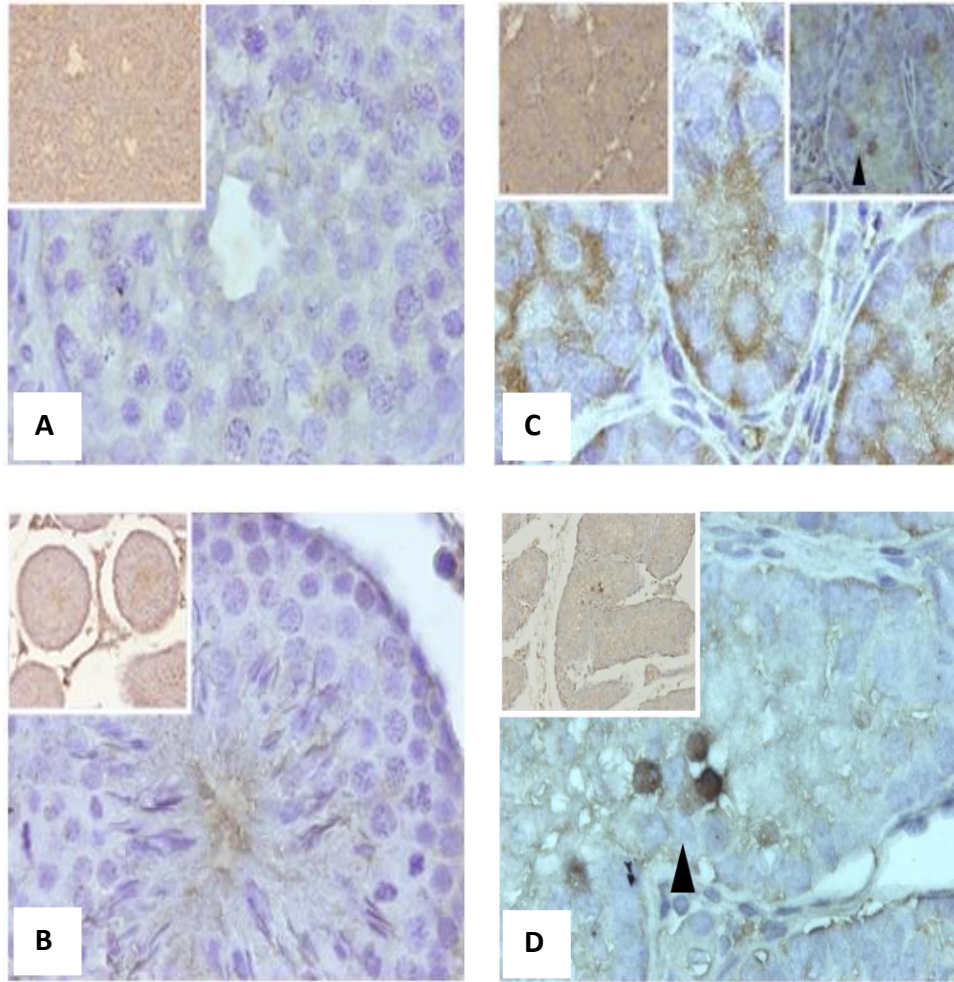


Figura 9: Inmunohistoquímica para POU5F1

Inmunohistoquímica para POU5F1 en tejido de conejos del grupo control, A) 90 dpp y B) 180 dpp. Grupo experimental, C) 90 dpp y D) 180 dpp. 20X e inserto 60X.

7.6.7 C-Kit en Conejos de 60 dpp

En los conejos del grupo control de 60 dpp, se observó una diferencia en la inmunoreactividad, que se presentó en las células germinales, en relación a los del grupo experimental, la cual fue significativamente mayor para este último grupo mencionado.

7.6.8 C-Kit en Conejos de 90 dpp

A los 90 dpp se reguló a la baja para los conejos del grupo control y se mantuvo en los conejos del grupo experimental; aunque respecto a los conejos de 60 dpp del grupo experimental, se observó un decremento.

7.6.9 C-Kit en Conejos de 180 dpp

A los 180 dpp en los conejos del grupo control no existió positividad a C-Kit. Sin embargo en los conejos del grupo experimental esta inmunoreactividad fue constante desde el día 60 pp y hasta esta edad a los 180 dpp; es importante enfatizar que entre el día 90 pp y 180pp, se observó un incremento en el número de células positivas a C-kit. Ya que el epitelio seminífero de estos conejos del grupo experimental no tiene una distribución en estratos, ni luz tubular, esta positividad se observa incluso en la parte central de los cordones.

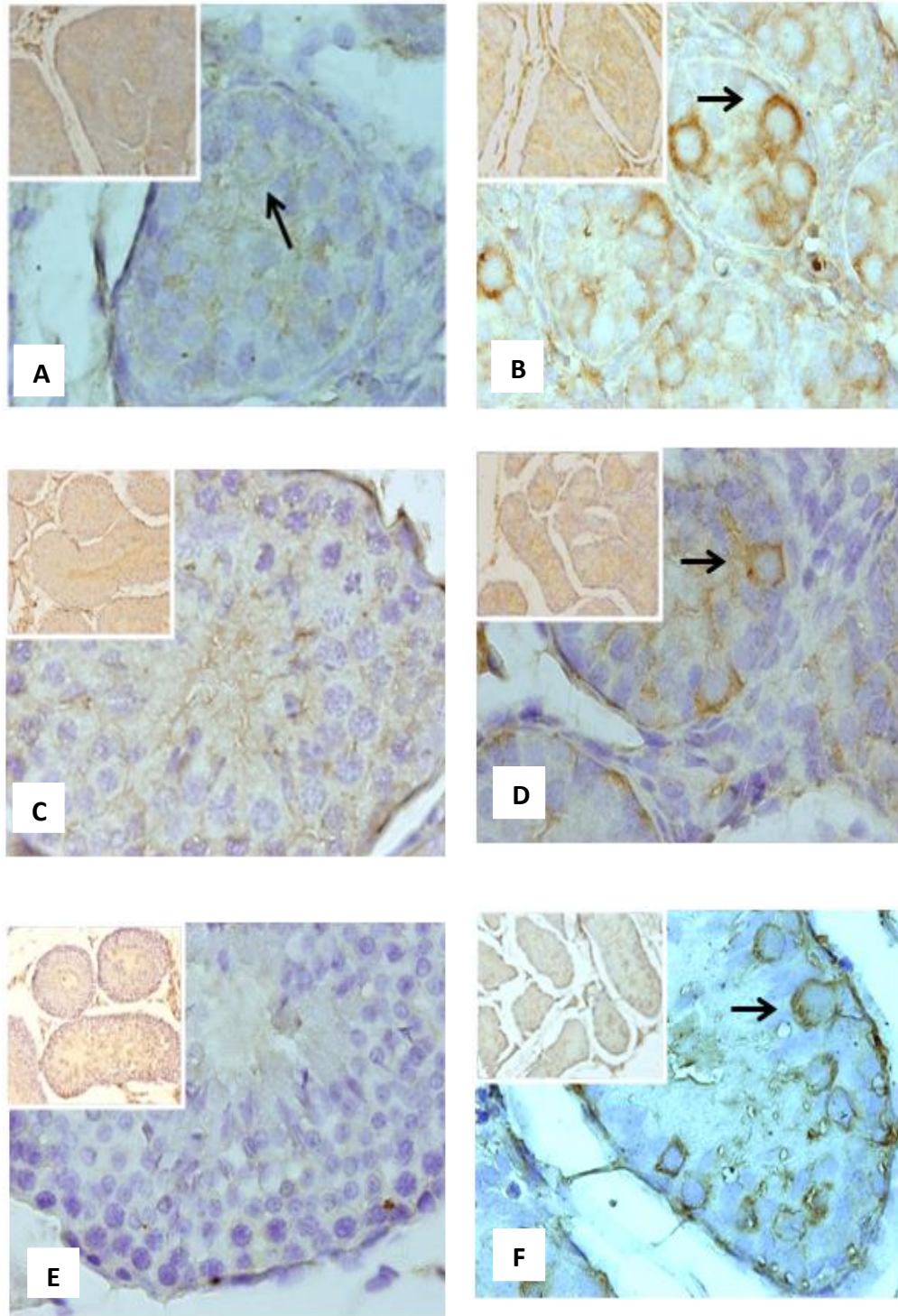
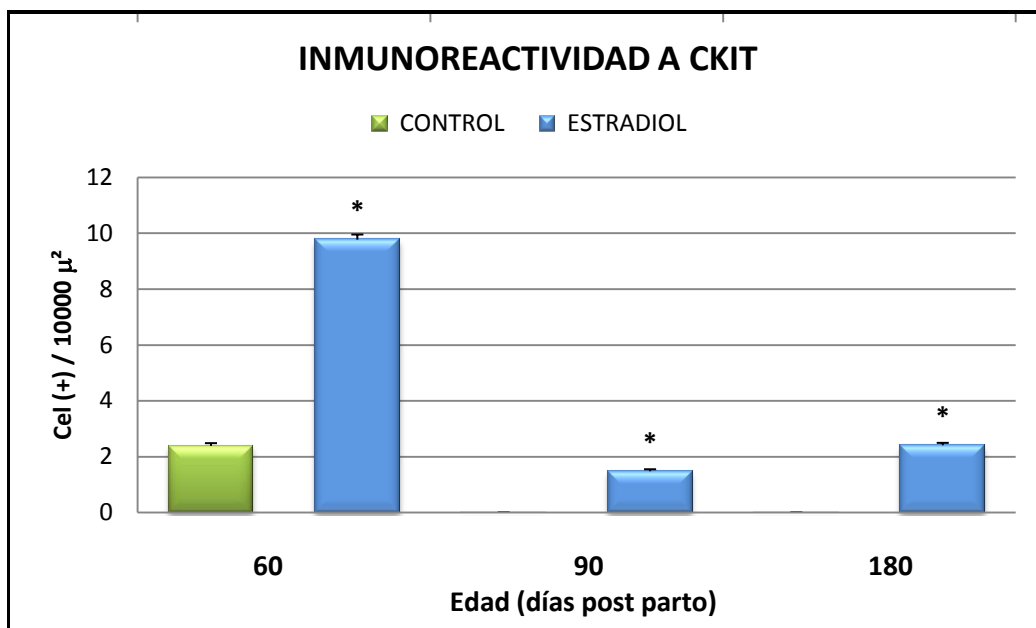


Figura 10: Inmunohistoquímica a C-Kit

Inmunohistoquímica a C-Kit (FLECHA). A, C y E) Conejos control de 60,90 y 180 dpp, respectivamente. B, D y F) Conejos del grupo experimental de 60, 90 y 180 dpp, respectivamente.20X.



Gráfica 9: Número de Células Positivas a C-KIT, por cada 10000 μ²

Muestra número de células positivas a C-KIT, por cada 10000 μ², en conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 dpp (*p<0.05 Vs grupo control de la misma edad).

EDAD dpp	Ki-67 Núm. células (+) /10000μ²		POU5F1 Núm. células(+)/10000μ²		C-KIT Núm. células (+) /10000μ²	
	CONTROL	ESTRADIOL	CONTROL	ESTRADIOL	CONTROL	ESTRADIOL
60	2.77 ± 0.15	5.61* ± 0.16	1.78 ± 0.057	9.69* ± 0.32	2.18 ± 0.096	9.77* ± 0.18
90	9.85 ± 0.36	10.15 ± 0.19	0 ± 0	1.931* ± 0.0714	0 ± 0	1.48* ± 0.0720
180	10.41 ± 0.21	2.76* ± 0.14	0 ± 0	9.5843* ± 0.73	0 ± 0	2.41* ± 0.0872

Tabla 5: Inmunoreactividad a ki-67, POU5F1 y C-KIT

Contiene información global de inmunoreactividad a Ki-67, POU5F1 y C-KIT, (en número de células positivas, por cada 10000 μ²) de conejos del grupo control y experimental de 60, 90 y 180 dpp (*p<0.05 Vs grupo control de la misma edad).

7.7 Determinación de la Expresión Génica (RT-PCR)

Se confirmaron los resultados de la inmunohistoquímica por RT-PCR. Respecto a POU5F1, el gel muestra (figura 11), que para el caso de los conejos control de 90 dpp y 180 dpp, no hubo expresión de este transcrito; lo cual coincide con las inmunohistoquímicas para estas edades.

Es muy evidente la expresión del transcrito POU5F1, para el caso de los conejos administrados con estradiol tanto a los 90 dpp como a los 180 dpp.

Para el caso de C-KIT, en los controles no se observó expresión; sin embargo en los conejos administrados solo en algunos fue posible identificar la presencia del transcrito.

La beta actina al ser un gen constitutivo, se pudo observar en todos los conejos de nuestro estudio.

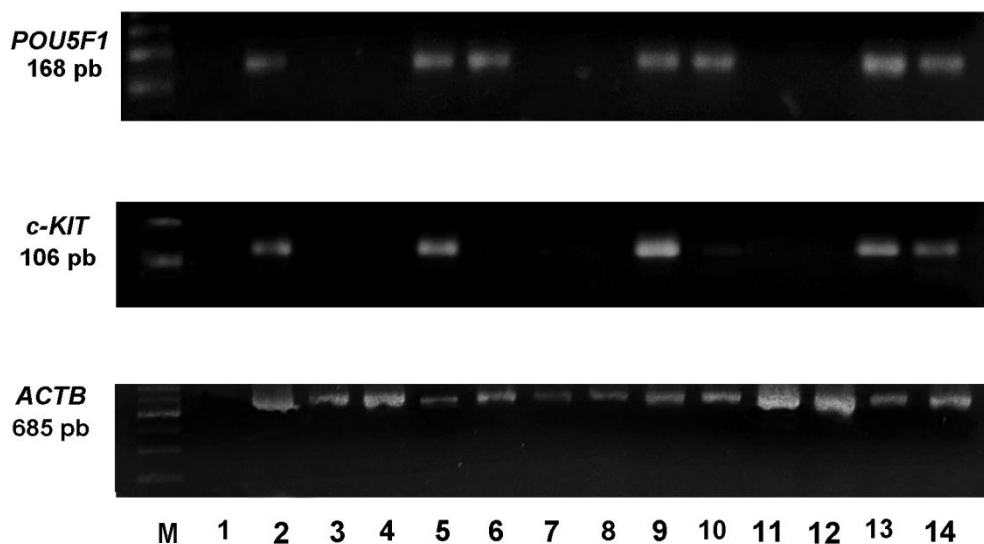


Figura 11: GEL de PCR

Expresión de las proteínas POU5F1 y c-Kit en tejido testicular de conejos control y estradiol de diferentes edades. Línea 1 Control negativo de la técnica. Línea 2, control positivo de un paciente con CIST. Líneas 3 y 4 grupo control 60 dpp. Línea 5 y 6 grupo estradiol de 60 dpp. Líneas 7 y 8 grupo control 90 dpp. Línea 9 y 10 grupo estradiol de 90 dpp. Líneas 11 y 12 grupo control 180 dpp. Línea 13 y 14 grupo estradiol de 180 dpp.

8. DISCUSIÓN

La etiología del cáncer testicular no se conoce, probablemente debido a la falta de un modelo animal que se apege a la condición clínica humana (Garner et.al., 2008).

Existen modelos en roedores que han sido utilizados tradicionalmente para estudios de fisiología reproductiva y toxicología. Por ejemplo, el tumor testicular en ratas macho longevas, tumor testicular murino, el ratón 129 mutación ter, etc. (Tennekes et. al., 2004; Yasuda et. al., 1988; Takabayashi et. al., 2001; Youngren et. al., 2005). Sin embargo, el origen y la fisiopatología de estos modelos difieren de la presentación en el humano (Garner et.al., 2008).

El conejo es considerado un excelente modelo de estudio del tracto reproductor masculino, incluso el *National Institute of Health* de Estados Unidos considera a esta especie, “el modelo más valioso para el estudio de los efectos de productos químicos (o bioquímicos) en el sistema reproductor masculino”.

Por tanto, decidimos tomar como modelo animal al conejo e iniciar nuestra búsqueda hacia el desarrollo de un modelo para el CIST.

Cabe mencionar que en los lagomorfos, el descenso testicular se presenta en días posteriores al nacimiento (aproximadamente a los 50 días post parto, para el caso de los conejos Chinchilla) (Vigueras et. al., 2013); esto nos permite tener una ventana de tiempo en el período neonatal para que el estradiol funcione como disruptor endocrino. Apegando así, nuestro modelo a lo que ocurre en el ser humano durante el último tercio de la gestación, cuando se lleva a cabo el descenso testicular y momento en el cual las alteraciones en el microambiente gonadal son altamente sensible a hormonas y factores parácrinos (Rajpert et.el., 2006).

Se menciona que en el humano, el origen del síndrome de disgenesia testicular, básicamente tiene tres características: 1) Surge a partir de células germinales, 2) se

presenta en la etapa reproductiva del adulto joven (adolescencia o posterior a esta) y 3) se propone que pueden desarrollarse a partir de la exposición a disruptores endocrinos (Garner et. al., 2008).

Encontramos que en conejos del grupo experimental, el epitelio seminífero presento células atípicas y desarrollo de las alteraciones características del CIST, las cuales ya han sido previamente establecidas por la OMS (Eble et. al., 2004). Previamente Veramachaneni et. al., (2006) describieron la presencia de células atípicas en epitelio seminífero de conejos expuestos a octilfenol.

También identificamos a nivel de microscopia electrónica, a las células atípicas de conejos del grupo experimental de 180 dpp, como gonocitos persistentes. Estas células fueron positivas a POU5F1, considerado el biomarcador diagnóstico por excelencia. (Looijenga et. al., 2003).

En este trabajo se demuestra que la administración de estradiol genera la persistencia de gonocitos con expresión de proteínas de pluripotencialidad como POU5F1 y C-Kit característico del CIST.

La exposición a estradiol en los conejos empleados para el presente trabajo, asemeja la exposición a disruptores endocrinos, tal y como lo mencionan Skakkebaek et. al., (2001). Estos autores sugieren que varias condiciones anormales del tracto reproductor masculino, en donde se incluyen: baja cuenta espermática, incremento en la frecuencia de hipospadias y criptorquida, así como el aumento en la incidencia del cáncer testicular, son síntomas de una entidad con etiología común y la denominaron Síndrome de Disgenesia Testicular. Estos investigadores proponen que variaciones sutiles en concentraciones hormonales durante la etapa gestacional o perinatal pueden dar lugar a una disfunción orgánica o bien a la enfermedad clínica *per se*. La hipótesis patogénica de este síndrome

incluye como principal causa, la exposición a compuestos con actividad estrogénica, señalados como disruptores endocrinos.

En este modelo, el disruptor endocrino, fue empleado durante un periodo que coincide con el último tercio de la gestación en el humano. Lo que generó que los gonocitos se mantuvieran sin diferenciarse a espermatogonias y con persistencia en la expresión de la proteína POU5F1, a lo largo del desarrollo. También se presentó criptorquidia bilateral en los conejos del grupo experimental, así como disminución en el tamaño del pene y de los testículos; signos que coinciden con el síndrome de disgenesia testicular.

En conejos de 60 dpp, el estradiol detono proliferación en los gonocitos. Sumado a esto, podríamos explicar que el estradiol “daña” de forma permanente al gonocito, participando en la persistencia de estas células, pues en conejos de 90 dpp, aunque ya se había retirado el esteroide, los gonocitos estuvieron presentes. Proponemos que la persistencia de estas células pluripotentes en los animales del grupo experimental, probablemente se debe a que el estradiol tiene como blanco a los gonocitos (O’Donnel et. al, 2001) y se activan, en éstos, mecanismos antiapoptóticos (Vigueras et. al., 2006), ya que en el desarrollo testicular normal se observa que todo gonocito que no haya migrado y tocado lamina basal experimenta un mecanismo de apoptosis (Culty 2009), para evitar la malignización de estas células con características de pluripotencialidad (Hoei-Hansen et. el., 2003; Looijenga et. al., 2003; Su S et. al., 2014).

El estradiol puede ejercer su efecto sobre receptores de membrana, que a través de segundos mensajeros acoplados a proteínas G activen proteínas inhibitoras de la apoptosis (Alberts et. al., 2010).

En 2010 Eui-Man et. al., adicionaron estradiol a cultivos de células madre embrionarias e identificaron que estas células mantienen la expresión de POU5F1. Concluyen que la

exposición a xenoestrógenos puede jugar un papel como potenciador en la expresión de POU5F1 y que por lo tanto esto retiene a las células en estado indiferenciado.

Coincidimos en lo reportado con este grupo de investigadores, ya que en los conejos del grupo experimental, se mantuvo la expresión de POU5F1, en los gonocitos.

Esta proteína se identificó en conejos del grupo control, la cual se regula a la baja. Contrario a lo que ocurrió en los conejos del grupo experimental, en donde esta proteína de pluripotencialidad mantiene su expresión a lo largo del desarrollo.

Actualmente el marcador más útil en el diagnóstico de TGCT, es el POU5F1, factor de transcripción nuclear que interacciona con otros factores nucleares como NANOG, SOX2, SALL4, etc.; (Guang et. al., 2002; Anneren 2008; Hammachi et. al., 2012) interruptores implicados en la regulación de la pluripotencialidad o diferenciación celular (Looijenga et. al., 2003).

El POU5F1 está claramente implicado, desde el punto de vista de la biología molecular, en el mantenimiento de la totipotencialidad de las células madre y células germinales primordiales. Se expresa tempranamente en la embriogénesis y presenta un papel esencial en la diferenciación del blastocito. En el embrión, tras la gastrulación, su expresión se halla limitada a las células germinales primordiales, hasta su transformación a espermatogonias durante el segundo trimestre del embarazo (Cantz et. al., 2008).

Se han reportado dos tipos de inmunoreactividad a POU5F1, la nuclear que está asociado como factor de pluripotencialidad y es la que predominó en los conejos del grupo experimental. Aunque también se presentó la inmunoreactividad citoplasmática, es menos estudiada, pero se sabe que está implicada en procesos de diferenciación celular (Nakagawa et. al., 2012; Alexander et. al., 2014) y la pudimos identificar solo en conejos de 60 dpp, del grupo experimental. Podríamos sugerir que en los conejos del grupo

experimental de 60 dpp, se activaron mecanismos de protección, donde el organismo intentó diferenciar estas células a través de la expresión de POU5F1 citoplasmático, el cual se sabe está implicado en la diferenciación, más que en la pluripotencialidad.

Vigueras et. al., (2012, manuscrito enviado a publicación) realizaron monitoreo en la expresión de POU5F1, en testículos de niños clínicamente sanos (controles), en los cuales solo se identificó positividad hasta los 4 meses; sin embargo en niños con criptorquidia se identificó positividad de esta proteína hasta los 15 años de edad; y este comportamiento lo observamos en este modelo de conejo.

El comportamiento de la inmunoreactividad a POU5F1, permite proponer que los gonocitos se mantienen pluripotente desde etapas tempranas de desarrollo y no se regula a la baja esta proteína como debería ocurrir en condiciones fisiológicas normales, por lo tanto la presencia de POU5F1, está alterando el funcionamiento normal del testículo, y lo predispone al desarrollo del CIST.

La inmunoreactividad a POU5F1, persistente a lo largo del desarrollo, en tejido testicular de conejos del grupo experimental, se apega a lo que ocurre en los niños con criptorquidia, donde la positividad a POU5F1 se mantiene, desde etapas neonatales y hasta la pubertad. Corroborando como factores de riesgo para el desarrollo del CIST, tanto la criptorquidia como la exposición a compuestos con actividad estrogénica (disruptores endocrinos).

El comportamiento de la inmunoreactividad a C-kit fue similar al de POU5F1, tanto en conejos del grupo control, como en experimentales. A los 60 dpp en controles, aun es normal la expresión de este ligando, pues se sabe que es esencial para la migración de los gonocitos que aún están presentes a esta edad. En condiciones fisiológicas normales se regula a la baja, como se observó en los controles; sin embargo este ligando mantuvo su expresión en todas las edades de los conejos experimentales.

El C-Kit forma parte de los receptores tirosín quinasa, que constituyen una de las mayores familias de proto-oncogenes. Con la presencia del ligando de C-Kit, el factor de células stem (SCF), se produce la dimerización, lo cual, a nivel intracelular provoca cascadas de señalización, que involucran enzimas del fosfatidil inositol (PI3K-AKT-mTOR) y que desencadenan, la supervivencia de la célula (Liu et. al., 2007).

Se ha reportado que la mutación en estos receptores (la dimerización del C-Kit), puede provocar alteraciones en su configuración y esto da lugar a su activación permanente y que además la célula no responda a señales externas (Sakuma et. al., 2003; Looijenga et. al., 2003).

A manera de enfatizar la importancia de haber identificado en el tejido testicular de nuestros conejos experimentales, la expresión de C-Kit, cabe mencionar que múltiples estudios inmunohistoquímicos en tejido testicular en humano, con diagnóstico de CIST, mostraron abundante positividad a C-Kit y que esta también se expresa en seminomas (Rajpert-De Meyts et. al., 1996; Bokemeyer et. al., 1996; Nakai et. al., 2005).

Por lo tanto, podríamos asegurar que la similitud en la expresión de estas proteínas inmunodiagnósticas para el CIST en humanos, se apega a nuestro modelo en conejo, en el cual también se identificó esta inmunopositividad.

Ki-67 (MKI67) es una proteína nuclear que se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M fases), pero está ausente en las células en reposo (G0). Se usa como marcador celular para la proliferación (Scholzen et. al., 2000).

La inmunoreactividad a ki-67, en los conejos de 60 y 90 dpp del grupo experimental, es superior; probablemente debido al efecto del estradiol como mitógeno; esto nos permite contrastar con la actividad proliferativa que ocurre en estas mismas edades pero en conejos del grupo control, la cual sabemos se debe a procesos propios del arranque y

establecimiento de la actividad mitótica y/o meiótica del epitelio seminífero. Es decir, se justifica esta actividad proliferativa, pues se sabe que un conejo en edad reproductiva produce diariamente, por cada gramo de peso testicular 25 millones de espermatozoides (Franca et. al., 2005).

A los 180 dpp, es probable que el organismo establezca algún mecanismo de protección, ya que observamos una disminución drástica de la inmunopositividad a Ki-67, presente en las células atípicas. Contrario a lo que se observa en conejos de 180 dpp controles donde la actividad proliferativa que se evidencia es la adecuada para un epitelio seminífero en franca producción.

En estudios experimentales con el Ki-67 se ha reportado que su inmunotinción muestra una reactividad nuclear en varias líneas de células humanas en división celular activa (células corticales del timo, células germinales del centro de folículos corticales, células de la región del cuello de la mucosa gástrica, espermatogonias indiferenciadas) y por el contrario, tiene una inmunoreactividad disminuida, en células bien diferenciadas (linfocitos, monocitos, hepatocitos, células renales, células parietales de la mucosa gástrica y células cerebrales). La expresión del antígeno se reactiva en linfocitos tras ser estimulados con un mitógeno y disminuye en líneas de células HL-60 inducidas a diferenciarse a macrófagos maduros. (Gerdes et. al., 1984; Gerdes et. al., 1984).

Este comportamiento de Ki-67 muestra que se puede utilizar como una alternativa en la identificación de células indiferenciadas, pero solo específicamente para el caso de células atípicas.

En conejos del grupo experimental de 90 dpp, observamos inmunoreactividad a Ki-67 en las células de Sertoli, lo cual se contrapone a lo establecido para esta edad en el conejo, ya que en este periodo se establece la barrera hematotesticular y las células de Sertoli ya

debieron haber detenido su proliferación (Yan Cheng and Mruk 2012; Viguera et. al., 2013).

Por tanto, proponemos que el mecanismo de establecimiento del CIST se desarrolló por la administración del estradiol que probablemente actuó a través de diferentes vías que a continuación se hipotetizan (figura 12 y 13): (1) que el gonocito al recibir el estradiol quedo “dañado” (O’Donnell et. al., 2001) y aunque la célula de Sertoli envíe factores de diferenciación, el gonocito no responde y se mantiene expresando sus proteínas de pluripotencialidad; (2) que el estradiol “dañe” a las células de Sertoli, por lo tanto ésta célula no envía los factores que requiere el gonocito para diferenciarse (Kristensen et. al., 2008); o bien (3) (O’Donnell et. al., 2001) que el estradiol altere los mecanismos intrínsecos de apoptosis, ya sea que la célula de Sertoli no envíe señales pro-apoptóticas para que el gonocito que mantiene la pluripotencialidad se dirija a la apoptosis o bien, que el propio gonocito no active su apoptosis, ya que este mecanismo ocurre fisiológicamente en los gonocitos que no se diferencian. Probablemente, la acción del estradiol que bloquea el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, que al inhibir la secreción de andrógenos necesarios para concluir el descenso testicular (Foresta et. al., 2008), se desarrolla criptorquidia que se conoce como un factor de riesgo para el desarrollo del CIST. Aunque Veeramachaneni et. al., 2006 indujeron criptorquidia quirúrgica en conejos, estos investigadores no observaron la presencia de células atípicas; como en el caso de los conejos del grupo experimental, de esta tesis, a la misma edad.

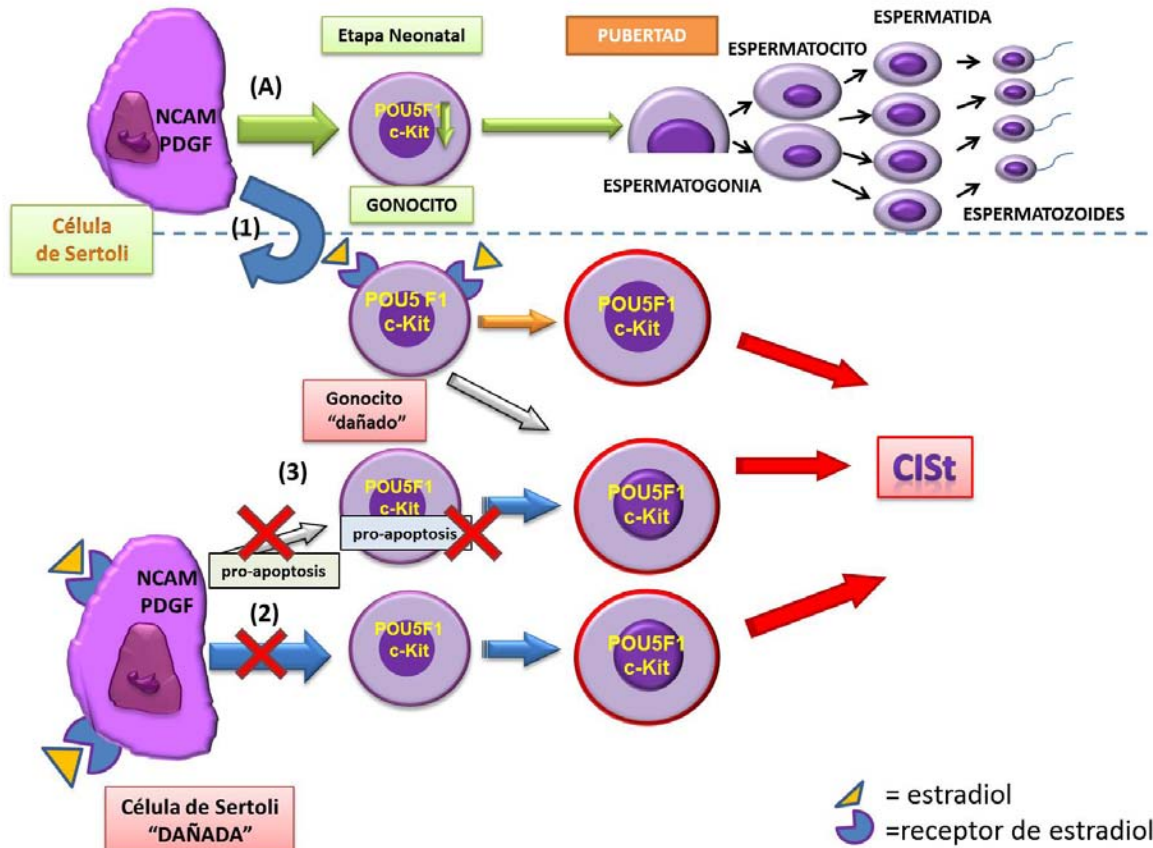


Figura 12: Mecanismos propuestos para el establecimiento del CISt

(A) Observamos a la Célula de Sertoli, en su mecanismo fisiológico normal, quien es la responsable de enviar factores de diferenciación al gonocito, NCAM, PDGF, entre otros, para que éste a su vez, regule a la baja sus proteínas de pluripotencialidad como POU5F1 y C-Kit y se diferencie a espermatogonia y esta célula, en etapa prepuberal inicie actividades propias del arranque y establecimiento de la espermatogénesis hasta llegar a la producción de espermatozoides. Proponemos los siguientes mecanismos de alteración en las vías habituales de comportamiento de estas células: (1) que el gonocito al recibir el estradiol quedo "dañado" y aunque la célula de Sertoli envíe factores de diferenciación, el gonocito no responde y se mantiene expresando sus proteínas de pluripotencialidad; (2) que el estradiol "dañe" a las células de Sertoli, por lo tanto ésta célula no envía los factores que requiere el gonocito para diferenciarse; o bien (3) que el estradiol altere los mecanismos intrínsecos de apoptosis, ya sea que la célula de Sertoli no envíe señales pro-apoptóticas para que el gonocito que mantiene la pluripotencialidad se dirija a la apoptosis o bien, que el propio gonocito no active su apoptosis, ya que este mecanismo ocurre fisiológicamente en los gonocitos que no se diferencian.

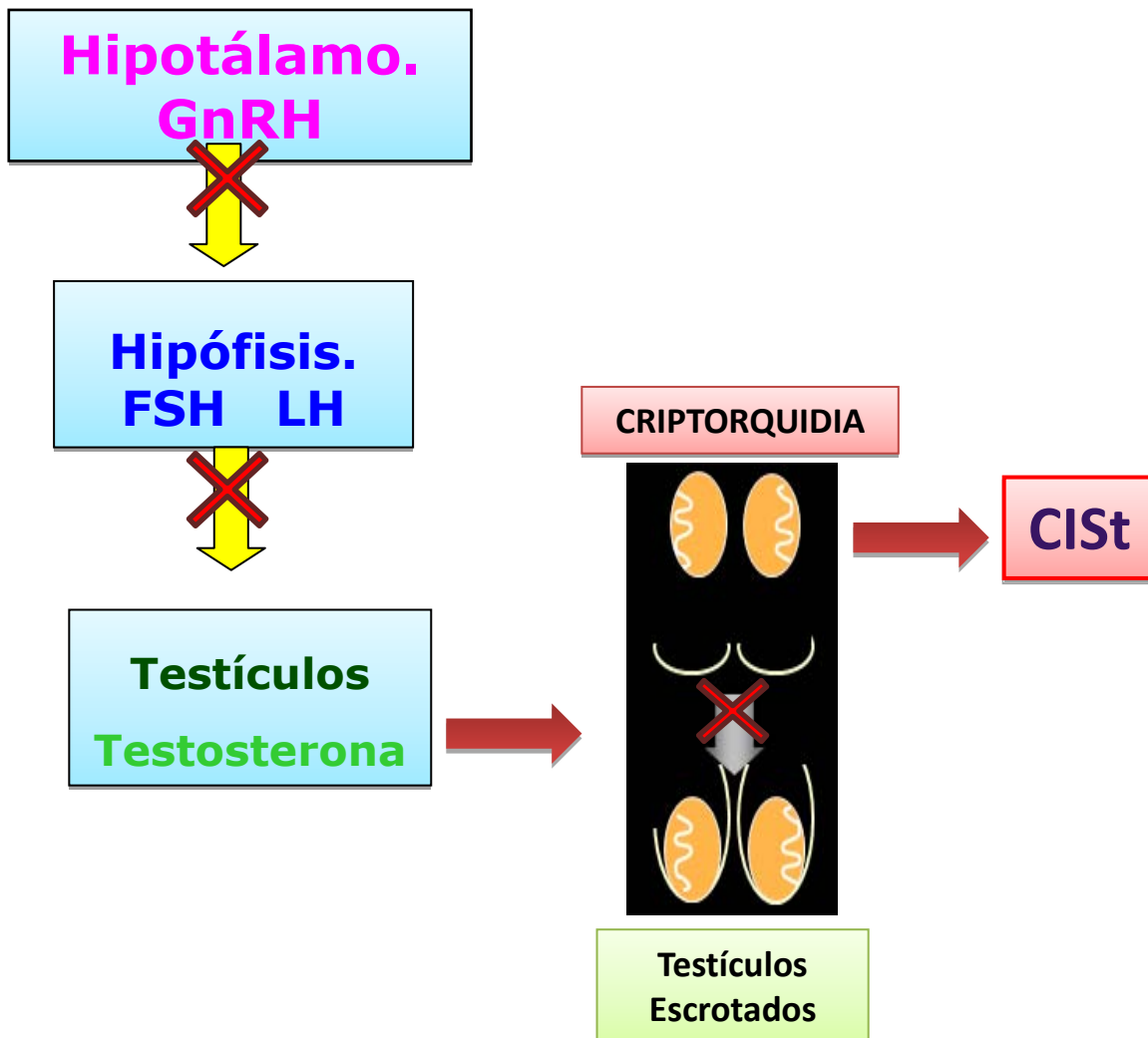


Figura 13: Bloqueo del Eje Hipotálamo Hipófisis Testículo.

Probablemente el estradiol bloquea a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, desde inhibición de la GnRH, o falta de LH; cualquiera de estas impacta a nivel de la secreción de testosterona la cual es necesaria para concluir la última fase del descenso testicular.

9. CONCLUSIÓN

Este modelo de conejo desarrollo el CIST o NICGNC con las características histológicas y la presencia de marcadores específicos propios de esta patología. Demostramos que una población de gonocitos persistió morfológicamente, sin diferenciarse a espermatogonias conservando su pluripotencialidad.

Por tanto, el conejo es un excelente modelo que puede ser empleado para estudiar los mecanismos etiológicos y fisiopatológicos del CIST y en un futuro buscar biomarcadores diagnósticos tempranos no invasivos y alternativas de tratamiento preventivo que reduzcan el riesgo de la enfermedad.

10. ANEXO

Indice Histopatológico

Alteraciones Histológicas	PUNTAJE
a) Plegamiento de lámina Basal	1
b) Descamación celular	1
c) Vacuolización epitelial	2
d) Cincisio celular	2
e) Picnosis	2
f) Tubos sin espermatidas	3
g) Tubos sin espermatocitos	4
h) Tubos sin espermatogonias	5
i) Ausencia de todo tipo celular	6

Indice de Maduración Epitelial

PUNTAJE	Alteración
10	Espermatogenesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogenesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo).
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermatidas maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermatidas sin algún signo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermatidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatozoides presentes.
4	Pocos espermatocitos presentes (5 por tubo).
3	Presencia únicamente de espermatogonias.
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
1	No hay células en el tubo seminífero.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abacı A, Çatlı G, Anık A, Böber E. Epidemiology, Classification and Management of Undescended Testes: Does Medication Have Value in its Treatment? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013; 5(2): 65-72.
- Ajj H, Chesnel A, Pinel S, Plenat F, Flament S, Dumond H. An Alkylphenol Mix Promotes Seminoma Derived Cell Proliferation through an ERalpha36-Mediated Mechanism. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61758.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. *Biología Molecular de la Célula*. 5ta ed. Editorial Omega. Barcelona, España, 2010.
- Alexander R, Cheng L, Grignon D, Idrees M. Hum Pathol. Cytoplasmic OCT4 staining is a sensitive marker of neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol* 2014; 45(1):27-32.
- Almstrup K, Ottesen A, Sonne S, Hoei-Hansen C, Leffers H, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek N. Genomic and gene expression signature of the pre-invasive testicular carcinoma in situ. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1):159–65.
- American Joint Committee on Cancer. Testis. En: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010:469-473.
- Annerén C. Tyrosine kinase signalling in embryonic stem cells. *Clin Science* 2008; 115 (2): 43-55.
- Anway M, Cupp A, Uzumcu M, Skinner M. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* 2005; 308 (5727), 1466-1469.
- Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13 (9): 364-8.
- Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004; 23 (6 suppl): 588S-595S.
- Berry LW, Westlund B, Schedl T. Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development* 1997; 124 (4): 925-936.
- Biedermann B, Wright J, Senften M, Kalchhauser I, Sarathy G, Lee MH, Ciosk R. Translational repression of cyclin E prevents precocious mitosis and embryonic gene activation during *C. elegans* meiosis. *Dev Cell* 2009; 17 (3): 355-64.
- Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, Jonasson J, Pietsch T, Jonas U, Schmoll HJ. Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122(5):301-6.
- Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Moller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: Continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int. J. Cancer* 2006; 118 (12): 3099–3111.
- Brokken LJ, Lundberg-Giwerzman Y, Rajpert De-Meyts E, Eberhard J, Stahl O, Cohn-Cedermark G, Daugaard G, Arver S, Giwerzman A. Association of polymorphisms in genes encoding hormone receptors ESR1, ESR2 and LHCGR with the risk and

clinical features of testicular germ cell cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351(2):279–85.

- Cantz T, Key G, Bleidi M, Gentile L, Wook Han, Brenne A, Scholer HR. Absence Of Oct4 Expression In Somatic Tumor Cell Lines. *Stem Cells* 2008; 26 (3): 692– 697.
- Carver BS, Sheinfeld J. Germ Cell Tumors of the Testis. *Ann Surg Oncol* 2008; 12(11): 871-880.
- Culty M. Gonocytes, The Forgotten Cells of the Germ Cell Lineage. *Birth Defects Research* 2009; 87 (1): 1 – 26.
- Cheng YC, Mruk DD. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev* 2012; 64 (1): 16–64.
- Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB, McGlynn KA. International trends in the incidence of testicular cancer, 1973 – 2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19 (5): 1151–1159.
- Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect* 1998; 106 Suppl 1:11-56.
- Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol* 2004; 22(1): 2–14.
- Decotto E, Spradling AC. The Drosophila ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Dev Cell* 2005; 9 (4): 501-510.
- Dénes FT, Duarte RJ, Cristófani LM, Lopes RI. Pediatric genitourinary oncology. *Front Pediatr* 2013; 1:48.
- Docimo SG, Silver RI, Cromie W. The undescended testicle: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2000; 62(9): 2037-2044.
- Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 53-4.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* IARC Press: Lyon 2004
- Einhorn LH, Williams SD, Chamness A, Brames MJ, Perkins SM, Abonour R. High-dose chemotherapy and stem-cell rescue for metastatic germ-cell tumors. *N Engl J Med* 2007; 357(4): 340-8.
- Endocrine disrupter research. European Commission, 2010 <http://ec.europa.eu/>
- Ferlin A, Pengo M, Selice R, Salmaso L, Garolla A, Foresta C. Analysis of single nucleotide polymorphisms of FSH receptor gene suggests association with testicular cancer susceptibility. *Endocr Relat Cancer* 2008; Jun;15(2):429-37.
- Ferlin A, Ganz F, Pengo M, Selice R, Frigo AC, Foresta C. Association of testicular germ cell tumor with polymorphisms in estrogen receptor and steroid metabolism genes. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(1):17-25.
- Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. 2008 Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev* 2008; 29(5): 560-80.

- França LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005 Jan 15; 63(2):300-18.
- Garner M, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D, Wade M. Testicular cancer and hormonally active agents. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008; 11(3-4):260-75.
- Gapany C, Frey P, Cachat F, Gudinchet F, Jichlinski P, Meyrat BJ, Ramseyer P, Theintz G, Burnand B. Management of cryptorchidism in children: guidelines. *Swiss Med Wkly* 2008; 138(33-34):492-8.
- Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 1984a; 2(4):365-71.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation - associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4): 1710-5.
- Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305(5691):1733-6.
- Godfrey KM, Barker DJ, Peace J, Cloke J, Osmond C. Relation of fingerprints and shape of the palm to fetal growth and adult blood pressure. *BMJ* 1993; 307(6901): 405–409.
- Gonczy P, Matunis E, Dinardo S. Bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 1997; 124(21): 4361-71.
- Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; 60: 5-20.
- Hammachi F, Morrison GM, Sharov A, Livigni A, Narayan S, Papapetrou EP, O'Malley, Kaji K, Minoru Ko, Ptashne M, Brickma JM. Transcriptional Activation by Oct4 Is Sufficient for the Maintenance and Induction of Pluripotency. *Cell Rep* 2012; 1(2):99-109.
- Heaney JD, Lam MY, Michelson MV, Nadeau JH. Loss of the transmembrane but not the soluble kit ligand isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice. *Cancer Res* 2008; 68(13):5193-7.
- Higuchi TT, Palmer JS, Gray LE Jr, Veeramachaneni DN. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 2003; 72(2):301-13.
- Hime GR, Loveland KL, Abud HE. *Drosophila* spermatogenesis: insights into testicular cancer. *Int J Androl* 2007; 30(4):265-74.
- Hoei-Hansen CE, Holm M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer. *J Pathol* 2003; 200(3):370-4.
- Horvath A, Korde L, Greene MH, Libe R, Osorio P, Faucz FR, Raffin-Sanson ML, Tsang KM, Drori-Herishanu L, Patronas Y, Remmers EF, Nikita ME, Moran J, Greene J, Nesterova M, Merino M, Bertherat J, Stratakis CA. Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2009; 69(13):5301-6.

- Horwich A, Shipley J, Huddart R. Testicular germ-cell cancer. *Lancet* 2006; 367 (9512): 754-65.
- Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, Wu TJ, Wu YC, Hung YC, Chang CC, Ling TY. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 2009; 23(7):2076-87.
- Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 2003; 170(1): 5-11.
- International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- Jaglarz MK, Howard KR. Primordial germ cell migration in *Drosophila melanogaster* is controlled by somatic tissue. *Development* 1994; 120(1): 83-9.
- Jiang LI, Nadeau JH. 129/Sv mice - A model system for studying germ cell biology and testicular cancer. *Mamm Genome* 2001; 12(2): 89-94.
- Johnson I, Harvey P. European Commission. Study On The Scientific Evaluation Of 12 Substances In The Context Of Endocrine Disrupter Priority List Of Actions. Report No: UC 6052. November 2002
- Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Müller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995; 72(2): 223-31.
- Jung EM, Choi KC, Yu FH, Jeung EB. Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on mouse embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(6):1538-45.
- Kaefer M. Diagnosis and treatment of the undescended testicle. In Pescovitz OH, Eugster EA (eds). *Pediatric Endocrinology: Mechanisms, Manifestations and Management*. Philadelphia, Lipincottt Williams &Wilkins, 2004.
- Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Ørom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 2007; 131(7): 1273-86.
- Ketting RF. A dead end for microRNAs. *Cell* 2007; 131(7): 1226-7.
- Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1-2): 111-8.
- Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 1994; 77(1):107-20.
- Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 2006; 66(2):820-7.
- Kratz CP, Mai PL, Greene MH. Familial testicular germ cell tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(3): 503–13.

- Kristiansen W, Haugen TB, Witczak O, Andersen JM, Fossa SD, Aschim EL. CYP1A1, CYP3A5 and CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int J Androl* 2011; 34(1): 77-83.
- Kristensen DG, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *Int J Dev Biol* 2013; 57(2-4): 309-17.
- Kristensen DM, Sonne SB, Ottosen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1-2): 111-8.
- Linger R, Dudakia D, Huddart R, Easton D, Bishop DT, Stratton MR, Rapley EA. A physical analysis of the Y chromosome shows no additional deletions, other than Gr/Gr, associated with testicular germ cell tumour. *Br J Cancer* 2007; 96(2): 357-61.
- Leissner J, Filipas D, Wolf HK, Fisch M. The undescended testis: considerations and impact on fertility. *BJU Int* 1999; 83(8): 885-91; quiz 891-2.
- Levine H, Afek A, Shamiss A, Derazne E, Tzur D, Zavdy O, Barchana M, Kark JD. Risk of germ cell testicular cancer according to origin: a migrant cohort study in 1,100,000 Israeli men. *Int J Cancer* 2013; 132(8): 1878-85.
- Liu H, Chen X, Focia PJ, He X. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 2007; 26(3): 891-901.
- Liu S, Wen SW, Mao Y, Mery L, Rouleau J. Birth cohort effects underlying the increasing testicular cancer incidence in Canada. *Can J Public Health* 1999; 90(3): 176-80.
- Looijenga LH. Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. *J Pathol* 2009; 218(2):146–62.
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 2003; 63(9):2244-50.
- 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(22):7674-8.
- Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, Schoenmakers EF, Rodriguez S, Jafer O, Clark J, van Kessel AG, Shipley J, van Gurp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* 2003; 111(1):161-73.
- Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, Benvenisty N. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 521-31.
- McGlynn KA, Trabert B. Adolescent and adult risk factors for testicular cancer. *Nat Rev Urol* 2012; 9(6): 339-349.

- Mitchell RT, E Camacho-Moll M, Macdonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M4, Sharpe RM2, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffebuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH. Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod Pathol* 2014; 27(9): 1255-66.
- Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* 1998; 16(20): 2617-27.
- Mostofi FK, Sesterhenn IA. Pathology of germ cell tumors of testis. *Prog Clin Biol Res* 1985; 203:1-34.
- Mouriquand PD. Undescended testes in children: the paediatric urologist's point of view. *Eur J Endocrinol* 2008; 159 (Suppl 1): S83-6.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Testicular Cancer. Version 1, 2013. Accessed at www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/testicular.pdf
- Narbonne P, Roy R. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 2006; 133(4):611-9.
- Nakai Y, Nonomura N, Oka D, Shiba M, Arai Y, Nakayama M, Inoue H, Nishimura K, Aozasa K, Mizutani Y, Miki T, Okuyama A. KIT (c-kit oncogene product) pathway is constitutively activated in human testicular germ cell tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(1):289-96.
- Nakagawa E, Zhang L, Kim EJ, Shin JO, Cho SW, Ohshima H, Jung HS. The novel function of Oct3/4 in mouse tooth development. *Histochem Cell Biol* 2012; 137(3): 367-76.
- Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaïti-Pellié C, Heidenreich A, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Oosterhuis JW, Gillis AJ, Looijenga LH, Guilford P, Fossa SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Rudd M, Huddart R, Crockford GP, Forman D, Oliver DT, Einhorn L, Weber BL, Kramer J, McMaster M, Greene MH, Pike M, Cortessis V, Chen C, Schwartz SM, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rapley EA. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet* 2005; 77(6): 1034-43.
- Nelson VR, Heaney JD, Tesar PJ, Davidson NO, Nadeau JH. Transgenerational epigenetic effects of the Apobec1 cytidine deaminase deficiency on testicular germ cell tumor susceptibility and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(41): E2766 - 73.
- Neumann JC, Chandler GL, Damoulis VA, Fustino NJ, Lillard K, Looijenga L, Margraf L, Rakheja D, Amatruda JF. Mutation in the type IB bone morphogenetic protein receptor Alk6b impairs germ-cell differentiation and causes germ-cell tumors in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(32):13153-8.

- Neumann JC, Lillard K, Damoulis V, Amatruda JF. Zebrafish models of germ cell tumor. *Methods Cell Biol.* 2011b; 105: 3-24.
- Navarro H, Ramírez O, Villagrán V. *Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales.* Ed. Samsara. Mexico, D.F. 2012.
- Newbold RR, Bullock BC, McLachlan JA. Lesions of the rete testis in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res* 1985; 45(10): 5145-50.
- Newbold RR, Bullock BC, McLachlan JA. Testicular tumors in mice exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Urol* 1987; 138(6): 1446-50.
- Niculescu AM. Effects of in utero exposure to DES on male progeny. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1985; 14(6): 468-70.
- Okamoto K, Kawakami T. Epigenetic profile of testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 2007; 30(4): 385-92.
- Okamoto K. Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol* 2012; 19(6):504-11.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22(3): 289-318.
- Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(3): 210-22.
- Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; 12(5-6):321-9.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 1993; 118(4): 1089-94.
- Purdue MP, Graubard BI, Chanock SJ, Rubertone MV, Erickson RL, McGlynn KA. Genetic variation in the inhibin pathway and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2008; 68(8): 3043-8.
- Pohl HG, Shukla AR, Metcalf PD, Cilento BG, Retik AB, Bagli DJ, Huff DS, Rushton HG. Prepubertal testis tumors: actual prevalence rate of histological types. *J Urol* 2004; 172(6Pt 1):2370-2.
- Quesenberry KE, Carpenter JW, Bennett RA, Mullen HS. *Soft tissue surgery; Ferrets, rabbits and rodents: clinical medicine and surgery.* 2^a ed. St. Louis: Saunders; 2004: 274-284.
- Rijlaarsdam MA, Looijenga LH. An oncofetal and developmental perspective on testicular germ cell cancer. *Semin Cancer Biol* 2014; S1044-579X(14)00091-1.
- Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jørgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE. Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod* 2004; 19(6): 1338-44.
- Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12(3):303–23.
- Rajpert-de Meyts E, Hoei-Hansen CE. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1120: 168-80.

- Rajpert-De Meyts E, Kvist M, Skakkebaek NE. Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 1996; 428(3): 133-9.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976; 295 (7): 349-53.
- Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 2006; 133(24): 4861-9.
- Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci* 2003; 94(6):486-91.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993; 341(8857):1392-5.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [review]. *J Cell Physiol* 2000; 182 (3): 311-22.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16 (5): 972- 8.
- Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomäki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene* 2002; 21(24): 3909-16.
- Starr JR, Chen C, Doody DR, Hsu L, Ricks S, Weiss NS, Schwartz SM. Risk of testicular germ cell cancer in relation to variation in maternal and offspring cytochrome p450 genes involved in catechol estrogen metabolism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(9): 2183-90.
- Subramaniam K, Seydoux G. Dedifferentiation of primary spermatocytes into germ cell tumors in *C. elegans* lacking the pumilio-like protein PUF-8. *Curr Biol* 2003;13(2):134-9.
- Srinivasan S, Mahowald AP, Fuller MT. The receptor tyrosine phosphatase Lar regulates adhesion between *Drosophila* male germline stem cells and the niche. *Development* 2012; 139(8): 1381-90.
- Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970; 21(3): 364-82.
- Stevens LC, Varnum DS. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Dev Biol* 1974; 37(2):369-80.
- Stevens LC, Hummel KP. A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18(5):719-47.
- Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst* 1967;38:549-552.
- Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* 1967; 38(4): 549-52.
- Stevens LC. Testicular teratomas in fetal mice. *J Natl Cancer Inst* 1962; 28: 247-267.
- Stevens LC. The biology of teratomas. *Adv Morphog* 1967b; 6: 1-31.

- Su S, Szarek M, Vooght A, Hutson J, Li R. Gonocyte transformation to spermatogonial stem cells occurs earlier in patients with undervirilisation syndromes. *J Pediatr Surg* 2014; 49(2):323-7.
- Tennekes H, Kaufmann W, Dammann M, van Ravenzwaay B. The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats and the implications for carcinogenic risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 40(3):293-304.
- Tickoo SK, Hutchinson B, Bacik J, Mazumdar M, Motzer RJ, Bajorin DF, Bosl GJ, Reuter VE. Testicular seminoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 cases with special reference to seminomas with atypical features. *Int J Surg Pathol* 2002; 10(1): 23-32.
- Tran J, Brenner TJ, DiNardo S. Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* 2000; 407(6805): 754-7.
- Ulbright TM. Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol* 1993; 17(11): 1075-91.
- Ulbright TM, Roth LM, Brodhecker CA. Yolk sac differentiation in germ cell tumors. A morphologic study of 50 cases with emphasis on hepatic, enteric, and parietal yolk sac features. *Am J Surg Pathol* 1986; 10(3): 151-64.
- Ulbright TM, Srigley JR. Dermoid cyst of the testis: a study of five postpubertal cases, including a pilomatrixoma-like variant, with evidence supporting its separate classification from mature testicular teratoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(6): 788–793.
- Van Der Zwan YG, Stoop H, Rossello F, White SJ, Looijenga LH. Role of epigenetics in the etiology of germ cell cancer. *Int J Dev Biol* 2013; 57(2-4):299-308.
- Västermark A, Giwercman YL, Hagströmer O, Rajpert De-Meyts E, Eberhard J, Stahl O, Cedermark GC, Rastkhani H, Daugaard G, Arver S, Giwercman A. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. *Eur J Cancer* 2011; 47(3):413-9.
- Veeramachaneni DN, Vandewoude S. Interstitial cell tumour and germ cell tumour with carcinoma in situ in rabbit testes. *Int J Androl* 1999; 22(2): 97-101.
- Viguera-Villaseñor RM, Montelongo-Solis P, Chavez-Saldaña M, Gutierrez-Perez O; Arteaga-Silva M, Rojas-Castañeda J. Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochem* 2013; 115 (7): 677 – 85
- Viguera VRM, Montelongo SP, Chávez SM, Gutiérrez PO y Rojas CJC. Intratubular germ cell neoplasia in chinchilla rabbit. Artículo en revisión
- Walt H, Oosterhuis JW, Stevens LC. Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis. *Int J Androl* 1993; 16(4): 267-71.
- Walsh TJ, Grady RW, Porter MP, Lin DW, Weiss NS. Incidence of testicular germ cell cancers in U.S. children: SEER program experience 1973 to 2000. *Urology* 2006; 68(2): 402-5.
- Walsh TJ, Dall’Era MA, Croughan MS, Carroll PR, Turek PJ. Prepubertal orchiopexy for cryptorchidism may be associated with lower risk of testicular cancer. *J Urol* 2007; 178 (4 Pt 1): 1440-1446.

- Walter J, Looijenga L. Testicular Germ Cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews* 2005; 5: 210-222.
- Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, Dumstrei K, Wise C, Lovell-Badge R, Thisse C, Thisse B, Raz E. dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 2003; 13(16): 1429-34.
- Wermann H, Stoop H, Gillis AJ, Honecker F, van Gurp RJ, Ammerpohl O, Richter J, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 2010; 221(4): 433-42.
- Wylie C. Germ cells. *Cell* 1999; 96(2): 165-74.
- Yasuda Y, Kihara T, Tanimura T. Effect of ethinyl estradiol on the differentiation of mouse fetal testis. *Teratology* 1985; 32(1): 113-8.
- Yasuda Y, Konishi H, Tanimura T. Leydig cell hyperplasia in fetal mice treated transplacentally with ethinyl estradiol. *Teratology* 1986; 33(3):281-8.
- Yasuda Y, Ohara I, Konishi H, Tanimura T. Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethinyl estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(5): 1246-50.
- Ye H, Ulbright TM. Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(4):435-46.
- Youngren KK, Coveney D, Peng X, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, Lamb BT, Deng JM, Behringer RR, Capel B, Rubin EM, Nadeau JH, Matin A. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* 2005; 435(7040):360-4.