



# Trabajo Fin de Grado en

## Veterinaria

Estudio inmunohistoquímico de tumores testiculares en la especie porcina

Immunohistochemical study of testicular tumors in swine

Autor/es

Miren Benito Mendicote

Director/es

Bernardino Moreno Burgos  
Juan José Badiola Díez

Facultad de Veterinaria

2022

1. RESUMEN/ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Aspectos anatómicos e histológicos del aparato genital en el macho	4
2.1.1. Testículo	4
2.1.2. Túbulos seminíferos. Epitelio seminífero y células de Sertoli	5
2.1.3. Intersticio. Células de Leydig	7
2.1.4. Espermatogénesis	8
2.2. Tumores testiculares en el hombre	10
2.3. Tumores testiculares en las especies domésticas	14
2.4. Tumores testiculares en el cerdo	17
2.5. Estudios inmunohistoquímicos en tumores testiculares	21
2.5.1. En el hombre	21
2.5.2. En el perro	24
2.5.3. En el cerdo	26
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	35
7. VALORACIÓN PERSONAL	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

## **1. RESUMEN**

Los estudios inmunohistoquímicos sobre tumores testiculares en la especie porcina son escasos debido a la baja incidencia que presentan este tipo de neoplasias los cerdos, describiéndose solo casos esporádicos a nivel individual. Sin embargo, la gran cantidad de investigaciones realizadas en el ámbito de los tumores testiculares en el hombre y en la especie canina, permite utilizar esta información como base para el estudio de las neoplasias testiculares porcinas.

El presente trabajo pretende describir la utilidad de la inmunohistoquímica como técnica diagnóstica para definir objetivamente los tumores testiculares porcinos, además de valorar la aplicación de ciertos marcadores tumorales utilizados en el hombre y en otras especies animales. Para ello, se han analizado 17 muestras de tumores testiculares de cerdo, previamente clasificados mediante estudio histopatológico como seminomas, entre los cuales se encuentran 7 tumores de tipo intratubular, 3 difusos y 7 con áreas de seminoma intratubular y zonas de patrón difuso. Los tumores han sido sometidos a varias tinciones inmunohistoquímicas con los marcadores tumorales c-kit, vimentina y citoqueratina, para poder definirlos adecuadamente. Tras realizar el estudio inmunohistoquímico se concluyó que todos los seminomas eran de tipo espermatoцитico, ya que fueron todos negativos a c-kit.

## **ABSTRACT**

Immunohistochemical studies of testicular tumors in swine species are rare due to the low incidence of this type of neoplasm in pigs, describing sporadic cases at an individual level. However, the large amount of research carried out in the field of testicular tumors in humans and in the canine species allows to use this information as a basis for the study of swine testicular neoplasms.

The present work tries to describe the usefulness of immunohistochemistry as a diagnostic technique to define objectively testicular tumors in swine, as well as asses the application of certain tumor markers used in man and other animal species. For that purpose, 17 samples of pig testicular tumors have been analyzed, which had been previously classified by histopathological study as seminomas. Among that testis tumors, there are 7 intratubular seminomas, 3 diffuse seminomas and 7 tumors with areas of intratubular seminoma and areas of diffuse pattern. The tumors have been subjected to several immunohistochemical stains with c-kit, vimentin and cytokeratin tumor markers, that way tumors could be defined properly. After performing the immunohistochemical study, it was concluded that all the seminomas were spermatocytic, since they were all negative to c-kit.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Aspectos anatómicos e histológicos del aparato genital en el macho**

#### **2.1.1. Testículo**

Los testículos son órganos ovoides de localización bilateral responsables de la producción de gametos masculinos, los espermatozoides, y de la secreción de hormonas sexuales masculinas, principalmente la testosterona (Pawlina y Ross, 2016).

El testículo se desarrolla a ambos lados de la región lumbar, medial al riñón embrionario, a partir de la cresta gonadal. Durante el desarrollo embrionario los testículos se encuentran en la cavidad abdominal en asociación estrecha con el sistema urinario y posteriormente, descienden hasta las bolsas escrotales, situadas fuera de la cavidad abdominal. Esta localización final permite que los testículos se mantengan a una temperatura ligeramente inferior a la corporal, lo cual es necesario para el adecuado desarrollo de las células germinales masculinas (König y Liebich, 2005). El descenso de los testículos varía en función de las distintas especies, sucediendo en los cerdos normalmente en la etapa prenatal, alrededor de los 90-100 días de gestación, de manera que en el nacimiento lo habitual es que ambos testículos estén descendidos.

Al realizar la migración transabdominal, los testículos arrastran consigo un saco de membrana serosa, llamada túnica vaginal, derivada del peritoneo. Esta túnica consta de una capa parietal exterior y una capa visceral interna (Junqueira y Carneiro, 2005). La hoja visceral de la túnica vaginal descansa sobre una capsula de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea, formada por fibras colágenas y elásticas y células mioídes, y por la que discurren los grandes vasos sanguíneos del testículo, la vena y la arteria testicular (Climent *et al.*, 2013). La túnica albugínea se continúa con trabéculas de tejido conjuntivo, “septula testis”, que profundizan en el parénquima y lo dividen en lobulillos de forma piramidal. Cada lobulillo testicular contiene entre uno y cuatro canalículos testiculares contorneados llamados túbulos seminíferos que tienen a su cargo la formación de células germinales (König y Liebich, 2005). Posteriormente, estos tabiques de tejido conjuntivo convergen en el eje testicular para formar el mediastino testicular. En el caso del verraco, estas trabéculas que permiten la división de los distintos lobulillos son gruesas y completas. El escroto, por su parte, es la envoltura más externa de las gónadas masculinas y es común a ambos testículos. Consta de una piel delgada, cubierta por más o menos pelo, rica en glándulas sebáceas y sudoríparas. Además, esta envoltura desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los testículos a una temperatura inferior a la temperatura abdominal (Climent *et al.*, 2013).

Por otra parte, los túbulos seminíferos, que se encuentran en el interior de los lobulillos, se dirigen hacia la zona del mediastino testicular y convergen en conductos de mayor calibre llamados túbulos rectos. Éstos, entran en el mediastino formando una red conductos anastomosados llamada rete testis, la cual posteriormente termina en el conducto eferente para transportar los espermatozoides desde los testículos hasta la cabeza del epidídimos (Pawlina y Ross, 2016).

Los testículos del verraco son de grandes dimensiones, proporcionalmente de mayor tamaño que en otras especies. Este carácter se relaciona con la capacidad de producción de espermatozoides, así pues, los cerdos son la especie que produce mayor volumen eyaculado. La forma de los testículos es elíptica y su orientación oblicua. Esto hace que su borde libre se sitúe caudodorsalmente, y su polo caudal, se relacione con la cola del epidídimos, de manera que los testículos sean fácilmente palpables cerca del ano. Al corte transversal, el testículo presenta un parénquima de color pardo-rosáceo con una porción central más fibrosa que corresponde con el mediastino del testículo, lugar donde asienta la rete testis (Gil *et al.*, 2008).

Las características anatómicas e histológicas descritas hacen que el testículo se muestre firme y elástico a la palpación, disminuyendo su consistencia con la edad por la pérdida de túbulos seminíferos (Climent *et al.*, 2013).

### **2.1.2. Túbulos seminíferos: Epitelio seminífero y células de Sertoli**

La unidad funcional del testículo es el túbulos seminífero, que constituye básicamente la porción exocrina del testículo, siendo su producto de secreción final los espermatozoides. Los túbulos seminíferos se organizan en lobulillos dentro del testículo. Dentro de los lobulillos, los túbulos discurren en asas muy contorneadas describiendo un trayecto sinuoso; posteriormente se transforman en túbulos rectos que constituyen el primer segmento de conductos excretores intratesticulares. Éstos, se reúnen a nivel del mediastino para formar la “rete testis”, la cual se dirige a uno de los polos del testículo, atraviesa la albugínea y da lugar a los conductillos eferentes, localizados en la cabeza del epidídimos y que constituyen la primera parte de conductos excretores extratesticulares (Pawlina y Ross, 2016).

Los múltiples túbulos que componen las gónadas masculinas están formados por un epitelio seminífero o germinativo que está rodeado por una lámina basal y una cubierta de tejido conjuntivo constituido por varias capas de miofibroblastos. La capa que queda más unida a la lámina basal, conocida como túnica propia, está formada por células mioides aplanadas y contráctiles que tienen características similares a las de las células musculares lisas (Junqueira y Carneiro, 2005).

El epitelio del túbulo seminífero es de tipo estratificado complejo compuesto por dos poblaciones celulares básicas: las células de Sertoli y las células germinales. Estas últimas se disponen en 4-8 capas entre células de Sertoli contiguas, las cuales son células somáticas y por lo tanto no germinativas (Junqueira y Carneiro, 2005). Las células germinales se dividen con regularidad para diferenciarse en espermatozoides maduros, por lo que su función principal es la producción espermatozoides, mediante un proceso conocido como espermatogénesis. Estas células se encuentran en diferentes etapas de diferenciación de los espermatozoides, de manera que las células espermatogénicas más inmaduras, denominadas espermatogonias, descansan sobre la lámina basal, mientras que las más maduras, llamadas espermátidas, se encuentran en la porción apical de la célula de Sertoli en contacto con la luz tubular (Pawlina y Ross, 2016).

Por otro lado, las células de Sertoli son elementos esenciales en la formación de espermatozoides, ya que colaboran en la organización estructural de los túbulos extendiéndose a través de todo el espesor del epitelio seminífero. Microscópicamente, son células piramidales que rodean parcialmente a las células germinativas (Junqueira y Carneiro, 2005; Young et al., 2014).

Las células de Sertoli se mantienen unidas entre si mediante enlaces *occludens* formando así la barrera hematotesticular. Esta barrera es dinámica, ya que permite la migración de células germinales en distintos estadios de desarrollo entre los dos compartimentos que separa dicha barrera. De esta manera, en el compartimento basal, que contacta con el tejido conjuntivo y los vasos que rodean a los túbulos seminíferos, se encuentran las espermatogonias que durante la espermatogénesis se convertirán en espermátidas capaces de atravesar los complejos de unión que hay entre las células de Sertoli y pasar al compartimento adluminal (Young et al., 2014). Por lo tanto, la función de la barrera hematotesticular es evitar la exposición de los gametos, que son antigenicamente diferentes a las células somáticas, del sistema circulatorio y linfático para protegerlas del sistema inmunitario, impidiendo así una reacción autoinmune (Mruk y Cheng, 2015). Además, durante el proceso de diferenciación de espermatogonia a espermatozoide, las células de Sertoli aportan el soporte nutricional y estructural necesario a las células germinales para poder realizar la espermatogénesis. Por otra parte, las células de Sertoli fagocitan las células apoptóticas y los cuerpos residuales de las espermátidas formados durante la espermiogénesis (Junqueira y Carneiro, 2005). Así mismo, secretan la proteína fijadora de andrógenos (ABP), la cual regula la concentración de testosterona en el túbulo seminífero para la correcta maduración de los espermatozoides. Las células de Sertoli son también las responsables de secretar el líquido que facilita el paso de los espermatozoides en maduración a lo largo de los túbulos seminíferos, fructosa y transferrina testicular. Igualmente, secretan inhibina, ejerciendo así su función endocrina. La inhibina es una hormona que participa en el

control de la secreción de FSH por feedback negativo (Pawlina y Ross, 2016). Por lo tanto, cuando hay un número determinado de células espermato génicas en el epitelio seminífero, las células de Sertoli comienzan a liberar inhibina que actuara sobre la hipófisis para frenar o suprimir la secreción de FSH. En definitiva, las células de Sertoli son primordiales en el proceso de espermato génesis y lo regulan a través de la FSH secretada por la hipófisis anterior y mediante la inhibina sintetizada por ellas mismas (Wong y Khan, 2021).

Por último, cabe destacar la importancia del número de células de Sertoli presentes en el tejido testicular de un individuo, ya que esto determinara la producción espermática del mismo. Por esta razón la medición del tamaño testicular en la etapa prepuberal es tan importante para seleccionar los futuros verracos reproductores (França *et al.*, 2005). Las células de Sertoli se multiplican en dos oleadas antes de la pubertad y posteriormente no se dividen más. Suponen un 10% de las células del epitelio seminífero en los adultos, aumentando esta cifra en proporción con el paso de los años debido a que disminuyen las células germinativas (Junqueira y Carneiro, 2005). Una de las funciones más importantes de estas células es la síntesis de la hormona antimülleriana, la cual induce la regresión del esbozo de los conductos de Müller y orienta la diferenciación sexual hacia el fenotipo masculino (Wong y Khan, 2021).

#### **2.1.3. Intersticio: Células de Leydig**

Las células de Leydig o células intersticiales son células endocrinas productoras de andrógenos, principalmente testosterona. La función de las mismas está controlada principalmente por la LH, que colabora al desarrollo del número y función de las células intersticiales, aunque también participa en la regulación de su funcionamiento la FSH. Se trata del principal tipo celular localizado en el tejido conjuntivo presente en los espacios intersticiales que rodean los túbulos seminíferos. Las células de Leydig se encuentran aisladas o formando cordones y están incluidas en el plexo de capilares sanguíneos y linfáticos que rodean los túbulos seminíferos, existiendo canalículos intercelulares y uniones gap entre células adyacentes. Gracias a esta disposición, sus secreciones pasan fácilmente a la circulación, así pues, los andrógenos difunden desde el intersticio hacia los túbulos seminíferos actuando sobre las células de Sertoli y células germinales, estimulando y manteniendo la producción espermática (Pawlina y Ross, 2016; Aladamat y Tadi, 2021).

Las células de Leydig son células poliédricas y grandes con un amplio citoplasma eosinófilo que contiene vacuolas lipídicas similares a las de las células secretoras de la corteza renal (Young *et al.*, 2014; Aladamat y Tadi, 2021). Al igual que otras células secretoras de andrógenos, tienen un retículo endoplásmico liso complejo debido a que las enzimas necesarias

para la síntesis de testosterona a partir de colesterol están asociadas con este orgánulo (Aladamat y Tadi, 2021).

Las células intersticiales son la principal fuente de testosterona y andrógenos en los machos. Su papel es fundamental en la diferenciación inicial del feto masculino, permitiendo que las crestas gonadales se conviertan en testículos. Para ello producen andrógenos que inducen el desarrollo del conducto de Wolff en estructuras urogenitales masculinas. Además, la testosterona sintetizada, estimula el descenso de los testículos durante el periodo fetal (Pawlina y Ross, 2016; Aladamat y Tadi, 2021). Durante la pubertad, la testosterona sintetizada por las células de Leydig desempeña un papel crucial en muchos procesos fisiológicos vitales incluyendo la producción de esperma, el control del desarrollo sexual, la aparición de los caracteres sexuales secundarios y la secreción de las glándulas sexuales accesorias. En la etapa adulta, en cambio, esta hormona es necesaria para el mantenimiento de la función del epitelio seminífero, la espermatogénesis, las vías espermáticas y las glándulas sexuales accesorias (Pawlina y Ross, 2016). Los verracos adultos poseen un gran desarrollo de las células de Leydig, las cuales suponen un 37% del volumen testicular (Van Straaten y Wensing, 1978).

La disminución en la producción de testosterona ocurre con el envejecimiento y otras enfermedades, lo que provoca una bajada de los niveles séricos de testosterona y con ello ocurren cambios metabólicos que afectaran a la de calidad de vida (Zirkin y Papadopoulos, 2018).

#### **2.1.4. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso por el cual las espermatogonias dan origen a los espermatozoides. Este proceso comienza poco antes de la pubertad bajo la influencia de las concentraciones cada vez mayores de gonadotrofinas hipofisiarias y continua durante toda la vida (Pawlina y Ross, 2016).

El proceso se inicia con una célula germinativa primaria, la espermatogonia, que se encuentra en la lámina basal del epitelio. Durante la pubertad las espermatogonias comienzan a dividirse por mitosis y producen varias generaciones de células, que en el caso del verraco sucede a los 4-5 meses. Posteriormente, estas células sufren un periodo de estabilización, el cual suele ocurrir alrededor de los 7 meses en la especie porcina. A partir de entonces la calidad seminal comienza a ser aceptable.

Esta etapa se denomina fase espermatogónica, en la cual las células madre sufren divisiones múltiples y generan una progenie espermatogónica que puede continuar dividiéndose

(espermatogonias tipo B) o mantenerse como células madre para reemplazarse a sí mismas (espermatogonias tipo A) (Junqueira y Carneiro, 2005; Pawlina y Ross, 2016).

Posteriormente, se produce la fase espermatocítica, la cual se inicia con la división mitótica de las espermatogonias tipos B para producir espermatocitos primarios. Después de su formación, los espermatocitos primarios entran en la profase de la primera división meiótica. La meiosis I trae como consecuencia la reducción de la cantidad de cromosomas ( $2n$  a  $n$ ) y de la cantidad de ADN al estado haploide (Pawlina y Ross, 2016). Los espermatocitos primarios son las células más grandes de la estirpe espermatogénica y se caracterizan por su localización próxima a la lámina basal. De esta primera división meiótica emergen dos células más pequeñas llamadas espermatocitos secundarios que tras su formación entran inmediatamente en la profase de la segunda división meiótica. Debido a que no hay una fase S entre la primera y la segunda división meiótica, la cantidad de ADN por célula en la segunda división meiótica se reduce a la mitad, formando células haploides (Junqueira y Carneiro, 2005).

A medida que la segunda división meiótica se completa, a partir de cada espermatocito secundario se forman dos espermatides haploides. Es decir, como consecuencia de ambas divisiones, de una espermatogonia B se obtienen cuatro células haploides, las espermatides. Estas células pueden distinguirse por su pequeño tamaño y por sus núcleos con porciones diversas de cromatina condensada. Además, en el epitelio seminífero se encuentran en una posición próxima a la luz del túbulo seminífero (Junqueira y Carneiro, 2005; Pawlina y Ross, 2016).

Posteriormente, ocurre la espermiogénesis, que es la fase final de la formación de los espermatozoides. En este proceso, las espermatides se transforman en espermatozoides a través de una remodelación celular extensa en la que adquieren las características esenciales del espermatozoide maduro. Durante la espermiogénesis se produce la formación del flagelo, que permite el movimiento de los espermatozoides, el acrosoma, que contiene enzimas líticas, y se produce una gran pérdida de cantidad de material celular y la compactación del ADN (Young *et al.*, 2014; Pawlina y Ross, 2016).

Hacia el final de la fase de maduración, se produce la espermiación, que es el proceso mediante el cual las espermatides se liberan en la luz del túbulo seminífero. Tras su liberación, los espermatozoides viajan en un líquido secretado por las células de Sertoli. Gracias a este líquido y a las contracciones peristálticas de las células peritubulares, los espermatozoides pasan por los túbulos rectos, rete testis y finalmente llegan al epidídimos donde se procesan para adquirir movilidad y sufrir varios cambios madurativos. Posteriormente, llegan a la porción distal del epidídimos donde se almacenan antes de la eyaculación. Durante este proceso adquieren

importancia las células de Sertoli, que tienen receptores de andrógenos y FSH necesarios para la mediación del proceso (França *et al.*, 2005; Pawlina y Ross, 2016).

Las células espermatógenas se disponen de una manera específica y ordenada, formando unas asociaciones celulares que se repiten de forma cíclica a lo largo del tubo seminífero, lo que denominan ciclo del epitelio seminífero, y que abarca una serie de cambios que se producen en un área determinada entre la aparición de dos asociaciones idénticas. En el ciclo del epitelio seminífero se reconocen varios estadios, en función de cada especie animal, que se suceden en el tiempo en cualquier área del túbulo, y por tanto contabilizan tipos de segmentos. Los segmentos, son zonas del túbulo seminífero que están ocupadas por una asociación celular. Por otro lado, la onda del epitelio seminífero es una sucesión completa de los distintos segmentos (França *et al.*, 2005; Pawlina y Ross, 2016)

A lo largo de todo el proceso de desarrollo, desde la espermatogonia al espermatozoide, miles de espermátides permanecen conectadas unas con otras mediante estrechos puentes citoplasmáticos que tan solo se rompen cuando los espermatozoides se liberan en la luz del túbulo seminífero. Gracias a este fenómeno se produce un desarrollo sincrónico de los espermatozoides en cualquier parte del túbulo (Young *et al.*, 2014).

En el caso del verraco, la duración de la espermatogénesis es de 25-35 días, en la cual cada ciclo del epitelio seminífero dura entre 8,6-9 días. En el epitelio seminífero se diferencian 8 estadios y cada 3-7 días se produce una nueva onda. Por último, la maduración epididimaria dura entre 10 -14 días (França *et al.*, 2005).

## **2.2. Tumores testiculares en el hombre**

Los tumores testiculares son un grupo heterogéneo de neoplasias que presentan diferencias en cuanto a las características histopatológicas, curso clínico y pronóstico. Es la neoplasia maligna más común en hombres jóvenes de entre 15 y 35 años y la segunda causa principal de muerte por cáncer en este grupo poblacional, a pesar de que suponen tan solo el 1% de todas las neoplasias que afectan a los hombres. Sin embargo, su origen sigue siendo poco conocido, aunque se sospecha de algunos factores ambientales o genéticos de riesgo. Igualmente, la criptorquidia se considera un factor de riesgo importante, ya que en los pacientes que presentan un testículo no descendido, la posibilidad de desarrollar un carcinoma testicular es cuatro veces mayor (Boujelbene *et al.*, 2011; Huihui *et al.*, 2012). La incidencia de cáncer testicular se ha ido incrementando en las últimas décadas, siendo más prevalente en las

poblaciones del norte de Europa, mientras que en los asiáticos, africanos y afroamericanos la incidencia es mucho más baja. La supervivencia de estos tumores se ha incrementado significativamente en los últimos 30 años, llegando hasta un 90% (Garner *et al.*, 2005).

Los tumores testiculares primarios pueden originarse a partir de células germinales, células del cordón sexual o, con menos frecuencia, de células del estroma peritubular y hematopoyéticas. Los tumores de células germinales (TCG) representan más del 95% de todas las neoplasias malignas testiculares y son altamente curables con los tratamientos actualmente disponibles, especialmente si la enfermedad se encuentra en las primeras etapas (Huihui *et al.*, 2012; Akan *et al.*, 2020). Los TCG comprenden una población de tumores morfológicamente heterogénea pero relacionada histogenéticamente. Se clasifican en función de las diferencias citomorfológicas observadas en ellos, sin embargo, no es raro encontrar áreas difíciles de clasificar dentro de un tumor debido a la superposición de características morfológicas o mala conservación tisular. No obstante, la clasificación adecuada de los componentes tumorales de las células germinales es esencial, ya que el comportamiento biológico y las decisiones terapéuticas dependen de ella (Anuradha *et al.*, 2009; Abou Zahr *et al.*, 2019). De esta manera, los TCG se dividen en 2 grupos principales: seminomas y no seminomas. Los segundos, representan varios grupos de neoplasias, incluyendo carcinomas embrionarios, tumores de saco vitelino, coriocarcinomas, teratomas, así como tumores mixtos que contienen los tipos de tumores antes mencionados en diversos grados (Akan *et al.*, 2020).

Los **seminomas** son TCG malignos que surgen del epitelio germinal de los testículos y se originan a partir de la proliferación anómala de espermatogonias inmaduras. Constituyen el 40-50% de los tumores de células germinales testiculares y se caracterizan por la presencia del componente seminomatoso. Se diferencian principalmente en dos tipos: el clásico y el espermatocítico.

La manifestación típica del **seminoma clásico** es la aparición de una masa testicular indolora y elástica que protruye sobre el resto del parénquima sano. Macroscópicamente, el seminoma clásico es una masa homogénea, bien circunscrita y con límites nítidamente definidos, que con frecuencia presenta pequeños focos de hemorragia y necrosis. Al corte, se observa una tumoración de color marronácea-amarillo pálida lobulada o multinodular (Marko *et al.*, 2017; Abou Zahr *et al.*, 2019). Desde el punto de vista histológico, las células tienen un patrón de crecimiento sólido separadas por finas trabéculas fibrovasculares con linfocitos. Los septos separan el tumor en lóbulos de células tumorales proporcionándole su aspecto multinodular característico. Las células tienen un citoplasma claro ligeramente eosinófilo, un núcleo redondo central, con uno o dos prominentes nucleolos y bordes citoplasmáticos definidos (Boujelbene *et al.*, 2011; Marko *et al.*, 2017).

La mayoría de los seminomas se limitan al testículo, por lo que la extensión más allá de la túnica hacia el cordón espermático ocurre solo en una minoría de pacientes (Boujelbene *et al.*, 2011). En caso de metastatizar, los órganos diana suelen ser los pulmones e hígado, observándose en raras ocasiones metástasis cerebrales y óseas. A diferencia de otras neoplasias malignas, los seminomas presentan un buen pronóstico, incluso habiendo metastatizado, debido a su gran susceptibilidad a la radioterapia y quimioterapia (Huihui *et al.*, 2012; Abou Zahr *et al.*, 2019).

El **seminoma espermatoocítico** es un TCG raro que representa tan solo el 1% de los tumores testiculares. Es distinto del seminoma clásico, con características histológicas, moleculares y genéticas únicas. Afecta a hombres de edad avanzada y no se asocia con la criptorquidia. El tumor espermatoocítico se manifiesta como una masa indolora de crecimiento lento. La mayoría de los tumores miden más de 5 cm en el momento del diagnóstico. Es unilateral en el 90% de los casos, pero en el 10%, la enfermedad bilateral es más común que en el clásico. Presenta un comportamiento indolente y rara vez genera metástasis, por lo que, la terapia típica para el tumor espermatoocítico sin transformación sarcomatosa, se limita a la orquiectomía curativa (Marko *et al.*, 2017).

A diferencia del seminoma clásico, el seminoma espermatoocítico tiene un aspecto heterogéneo y se muestra gelatinoso al corte. Histológicamente, está compuesto por una mezcla de células tumorales pequeñas, medianas y gigantes. Las células gigantes pueden ser multinucleadas. El pleomorfismo, las mitosis atípicas y la apoptosis son hallazgos comunes. Las células tumorales carecen de glucógeno, el cual se observa en el seminoma clásico, y el infiltrado linfocitario es escaso e incluso a veces está ausente (Aggarwal y Parwani, 2009; Marko *et al.*, 2017).

Según la literatura actual, los **tumores mixtos de células germinales** (TMCG) son los segundos tumores de células germinativas testiculares más comunes después de los seminomas, suponiendo un 40-45% de todos los TCG primarios (Akan *et al.*, 2020). Entre los componentes no seminomatosos se encuentran entidades patológicas como el carcinoma embrionario, carcinoma del saco vitelino y teratoma. Además, se describen casos que muestran contenido seminomatoso y no seminomatoso simultáneamente, los cuales se clasifican igualmente como TMCG debido a la presencia de más de un tipo histológico en la masa tumoral. La forma de presentación más común es el aumento testicular que generalmente se asocia con dolor (Dalgı *et al.*, 2009).

Los TMCG suelen tener los márgenes mal definidos y es común encontrar calcificaciones, hemorragias y necrosis en ellos. La histología es idéntica a las distintas neoplasias en sus formas puras (Marko *et al.*, 2017; Cedeno *et al.*, 2022). Los tumores de las células germinales solo responden a la quimioterapia, siendo ineficaz el uso de radioterapia (Boujelbene *et al.*, 2011).

Los tumores de las células del cordón sexual suponen tan solo el 4% de las neoplasias testiculares. Estos tumores derivan de 2 tipos de células somáticas: las células de Leydig y las células de Sertoli (Ocal *et al.*, 2019).

El **tumor de las células de Leydig** (TCL) es un tipo de tumor testicular poco común. A pesar de su baja incidencia, es la neoplasia intersticial del testículo más frecuente. A diferencia de los TCG, no hay evidencias que demuestren la asociación entre la criptorquidia y este tipo de tumor. Los tumores de las células de Leydig aparecen principalmente en hombres de entre 30-60 años, aunque también se han descrito casos en niños entre 5 y 10 años. La forma más frecuente de presentación es como una masa indolora testicular unilateral (Rubio *et al.*, 2006; Al-Agha *et al.*, 2007). Los TCL son considerados hormonalmente activos ya que secretan andrógenos, principalmente testosterona, aunque también pueden producir estrógenos. Debido a su actividad endocrina, aparecen los típicos síndromes de feminización o masculinización, en función de las hormonas que secreta el tumor (Fankhauser *et al.*, 2020).

Los tumores de células de Leydig suelen estar bien delimitados, circunscritos al parénquima testicular y son de un tamaño inferior a 5 cm. El color del tumor generalmente varía de marrón-amarillo a gris-blanquecino. La apariencia marrón dorada, que suele atribuir el abundante pigmento de lipofuscina de las células tumorales, es muy característica. El patrón de crecimiento de estas células tumorales es en forma de nidos separados por septos fibrovasculares. Histopatológicamente, los TCL están compuestos por células poligonales, con un núcleo central, un pequeño nucléolo y un citoplasma eosinofílico. En algunos casos se encuentran cristales de Reinke que son inclusiones citoplasmáticas fusiformes patognomónicas para las células de Leydig, en el caso de los humanos (Rubio *et al.*, 2006; Al-Agha *et al.*, 2007).

Los TCL suelen ser benignos, por lo que el tratamiento de elección es la orquitectomía. En el caso de los malignos, además de la orquitectomía, está indicada la linfadenectomía retroperitoneal, ya que la metástasis con frecuencia involucra ganglios retroperitoneales. Otros lugares a los que puede extenderse este tumor son los pulmones, hígado y huesos (Al-Agha *et al.*, 2007).

Con menos frecuencia, se han descrito **tumores de las células de Sertoli** (TCS). Esta neoplasia constituye tan solo el 0.4–1.5% de todas las neoplasias testiculares primarias, considerándose una entidad rara. Los tumores de células de Sertoli se dividen histopatológica y

clínicamente en tres formas: la clásica, esclerosante y de células grandes calcificadas. Cada una difiere en su comportamiento maligno, así como en su asociación con procesos extragonadales. Hasta en un 25% de los casos puede observarse una actividad hormonal que se manifiesta clínicamente como ginecomastia y un crecimiento óseo acelerado. Este tumor puede tener un comportamiento maligno y producir metástasis a pulmón, hueso o ganglios linfáticos (Young, 2005; García-Villa *et al.*, 2009).

En cuanto a su aspecto macroscópico, los TCS son firmes, varían de un color blanco a amarillo-marronáceo y frecuentemente presentan focos hemorrágicos. Microscópicamente, muestran un patrón de crecimiento en forma de nido, aunque algunos tumores tienen patrones secundarios de túbulos sólidos con trabéculas, túbulos huecos y pseudofolículos. Las células son poligonales con núcleos pequeños o medianos, de forma redonda u oval y con vesículas de contornos irregulares. Frecuentemente se observa fibrosis en el estroma e infiltrados linfoides, de la misma manera, es habitual ver necrosis tumoral e invasión vascular (Henley *et al.*, 2002; Ocal *et al.*, 2019).

Por último, a pesar de ser poco frecuente, varios tumores primarios pueden metastatizar en los testículos. El tumor primario más común que metastatiza a los testículos es el adenocarcinoma prostático. También se han descrito metástasis testiculares de tumores pulmonares, renales, de colon y melanomas. Las metástasis testiculares ocurren en el contexto de enfermedad metastásica avanzada (Abou Zahr *et al.*, 2019).

### **2.3. Tumores testiculares en las especies domésticas**

Los tumores testiculares son unas neoplasias poco frecuentes en las especies domésticas, sin embargo, en el perro la incidencia es mayor que en cualquier otro mamífero. En la especie canina, los tumores testiculares suponen el tercer tipo de neoplasia más frecuente, después del melanoma y de los sarcomas de tejidos blandos. Asimismo, estos tumores representan más del 90% de todas las neoplasias genitales caninas, siendo los tumores de células de Leydig (TCL), los seminomas (SEM) y los tumores de células de Sertoli (TCS) las formas más comunes (Yu *et al.*, 2009; Hohsteter *et al.*, 2014). Múltiples estudios retrospectivos han demostrado que los TCL y los seminomas constituyen más del 90% de los tumores testiculares, mientras que la prevalencia de los TCS y de los tumores mixtos es muy baja, suponiendo tan solo el 8% de todos los tumores testiculares caninos (Liao *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2020).

Varios factores pueden influir en el desarrollo de tumores testiculares, incluida la edad, la raza, la criptorquidia y la exposición a carcinógenos ambientales. Los testículos no descendidos tienen 13,6 veces más probabilidades de desarrollar una neoplasia que los

testículos escrotales, lo cual sugiere que la criptorquidia podría contribuir o acelerar la oncogénesis testicular (Liao *et al.*, 2009; DeForge, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado que la raza podría ser un factor de riesgo importante en la incidencia de tumores de testículo. Las razas con mayor predisposición a desarrollar neoplasias testiculares son el Boxer, Pastor Alemán, Lebrel Afgano, Braco de Weimar y Pastor de Shetland, todos ellos, animales de razas de tamaño mediano-grande. Por otro lado, la gran propensión de determinadas razas pequeñas a la criptorquidia hace que también se consideren de riesgo. Entre éstas destacan los Caniches Miniatura, Toy y Estándar; los Chihuahuas, Yorkshire Terrier y Schnauzer Miniatura (Liao *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2020).

La mayoría de los tumores testiculares en la especie canina son unilaterales, aunque se han descrito casos de neoplasias bilaterales. Cuando son unilaterales es frecuente que el testículo contralateral se encuentre atrofiado (Patnaik y Mostofi, 1993). A pesar de que lo más común es identificar un patrón histológico, también se han descrito casos en los que se diferencian distintas neoplasias en un mismo testículo. Igualmente, se han observado tumores testiculares bilaterales en los que cada testículo presentaba un tipo tumoral diferente. Los tumores compuestos por más de un patrón histológico son denominados tumores mixtos, siendo la combinación más frecuente seminoma y TCL, seguida de seminoma y TCS, y TCS y TCL (Nascimento *et al.*, 2020).

El **tumor de las células de Leydig** es la neoplasia testicular más frecuente en perros de edad avanzada y generalmente se consideran tumores benignos (Kudo *et al.*, 2019). Según estudios recientes, los TCL suponen más del 50% de los tumores identificados en testículos clínicamente normales. Es frecuente encontrar de forma accidental este tipo de tumores al realizar la necropsia sin haberse observado previamente un aumento del tamaño testicular. Esto implica que la oncogénesis de los TCL podría ser más lenta que la de otros tipos tumorales y por eso, no es posible detectar algunos tumores hasta que son lo suficientemente grandes (Liao *et al.*, 2009).

Macroscópicamente, los tumores de las células de Leydig se caracterizan por ser de tamaño reducido y difíciles de palpar. Sus características hacen que en muchas ocasiones tan solo produzcan una ligera alteración del testículo afectado en los estadios iniciales. Al corte, muestran una apariencia similar al TCL humano, apareciendo como una masa amarilla-marronácea bien delimitada de aspecto multinodular con áreas de hemorragia y necrosis (Kudo *et al.*, 2019). La mayoría de los tumores están formados por células poligonales con un citoplasma eosinofílico. Igualmente, pueden observarse pequeñas vacuolas y el núcleo es redondo con cromatina condensada e hipercromática (Nascimento *et al.*, 2020).

El **seminoma** canino es un tipo de tumor testicular de comportamiento maligno bajo. Varios estudios realizados han revelado que probablemente los seminomas caninos presenten una patogénesis similar a la de los seminomas espermatocíticos humanos (Nascimento *et al.*, 2020), por ello y por su comportamiento biológico, el seminoma canino es considerado como el seminoma espermatocítico humano (Kim *et al.*, 2010).

Los seminomas suelen producir un evidente aumento del volumen testicular y una atrofia del testículo contralateral. Además, ocasionalmente pueden causar dolor por hemorragias intraescrotales y edema. Se describen como masas de entre 5 y 10 cm que pueden llegar a atrofiar completamente el parénquima testicular. Macroscópicamente presentan una consistencia blanda y una superficie de sección de color blanco-amarillento homogéneo con áreas de hemorragias. Es común observar imágenes de malignidad, con marcadas atipias celulares y abundantes mitosis. Las células que componen el tumor son grandes, redondas o poliédricas y con un citoplasma eosinófilo. Normalmente, las células tumorales se localizan en el centro de los túbulos seminíferos y suelen estar rodeadas periféricamente por células germinales y estromales que no presentan transformaciones neoplásicas (Nascimento *et al.*, 2020). Igualmente, es frecuente observar infiltrados inflamatorios focales de tipo linfocitario (Grieco *et al.*, 2004). A pesar de ser infrecuente, los seminomas pueden metastatizar en los linfonodos regionales e infiltrarse en el epidídimo y túnica albugínea del testículo adyacente (Nascimento *et al.*, 2020).

El **tumor de células de Sertoli** es un tumor testicular poco frecuente en perros, afectando principalmente a animales de edad avanzada o criptórquidos. Los TCS tienen generalmente un comportamiento biológico benigno, aunque ocasionalmente se han descrito casos malignos. La manifestación clínica más común de los TCS es un aumento del volumen testicular, que al igual que ocurre en el seminoma, pueden causar dolor. Entre el 25 y el 50% de los perros afectados por tumores de las células de Sertoli muestran signos de feminización debido al componente estrogénico de la neoplasia (Banco *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2020).

Los tumores de las células de Sertoli aparecen como masas multinodulares de entre 0,4 y 3 cm. A la sección, presentan una superficie blanquecina o marrón-amarillenta de consistencia firme debido al alto contenido en estroma intersticial que poseen. Igualmente, es frecuente observar grandes áreas de necrosis y hemorragias. Microscópicamente consisten en agregados heterogéneos de células de Sertoli de tamaño variable, separados por un abundante estroma fibroso. Las células neoplásicas se caracterizan por presentar una morfología agrandada, con los bordes celulares poco definidos y un citoplasma ligeramente eosinofílico (Banco *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2020).

En cuanto al resto de especies domésticas, los casos de tumores testiculares son poco frecuentes y no suelen tener mayor trascendencia, apareciendo como hallazgos casuales. En los toros, el tumor de las células de Leydig es la neoplasia testicular más observada, aunque también se han descrito casos de tumores de células de Sertoli y seminomas. Los toros con TCL suelen ser animales que ya han llegado a la madurez o de edad avanzada, mientras que los TCS pueden aparecer en terneros. Los tumores de las células de Leydig son tumores nodulares de color pardo anaranjado con una consistencia blanda. Los tumores de las células de Sertoli, por su parte, se describen típicamente como tumores unilaterales, nodulares, con una consistencia que varía de firme a ligeramente blanda y de color gris-blanquecino a rojo-violáceo. En ambos casos, es común observar focos de calcificaciones, hemorragias y necrosis. En el caso de los TCS, es raro observar metástasis a los ganglios regionales, sin embargo, las células neoplásicas pueden invadir la vena testicular y vasos linfáticos produciendo un hidrocele (Jensen *et al.*, 2008).

En los caballos, la incidencia actual de tumores testiculares en sementales es difícil de determinar debido a la práctica de castrarlos a una edad temprana (Gelberg y McEntee, 1987). A pesar de tratarse de casos aislados, se han descrito tumores de células de Leydig, tumores de células de Sertoli, seminomas, teratomas y mastocitomas testiculares, entre otros. Los seminomas y los tumores de células de Leydig suelen aparecer en sementales adultos o geriátricos y pueden presentarse tanto en testículos descendidos como en criptórquidos. Los teratomas, en cambio, suelen observarse con mayor frecuencia en animales con testículos criptórquidos. En esta especie, se han observado casos de seminomas con enfermedad metastásica del cordón espermático y órganos de la cavidad abdominal (Ball, 2008; Valentine, 2009).

En relación a la especie ovina, las neoplasias testiculares primarias son también raras. Los pocos casos documentados son de seminomas y tumores de las células de Sertoli. Los escasos estudios realizados se refieren a TCS ovinos similares histológicamente a los TCS caninos (Shortridge, 1962). De manera anecdótica, se han descrito otras neoplasias en el aparato reproductor de los carneros, como cistoadenocarcinomas papilares intratesticulares, hemangiosarcomas, tumores de las células de Leydig, leimomas y lipomas extratesticulares (Searson, 1980; Foster *et al.*, 1989).

#### **2.4. Tumores testiculares en el cerdo**

El desarrollo de neoplasias en la especie porcina es un hecho poco frecuente debido a que la mayoría de los animales son sacrificados antes de alcanzar la madurez. En muchas

ocasiones, los tumores que aparecen en los cerdos no manifiestan signos clínicos, por lo que el diagnóstico de estos suele ser hallazgos accidentales al inspeccionar las canales en el matadero.

Debido a la baja incidencia y a la ausencia de la disminución del rendimiento que producen las lesiones neoplásicas en los cerdos, apenas suponen impacto económico en la producción porcina. A pesar de ello, prevalece una preocupación científica en la investigación de las enfermedades neoplásicas, ya que la carcinogénesis en el cerdo representa un modelo útil, dadas las similitudes anatómicas y fisiológicas entre cerdos y humanos (Morey-Matamalas *et al.* 2021).

Al igual que sucede con muchas de las neoplasias porcinas, la literatura científica relativa a tumores testiculares en verracos es escasa. Por ello, el presente estudio pretende recoger y reunir los distintos casos documentados a lo largo de las décadas.

Un estudio de Wekerle *et al.* (1987) realizado en 30 testículos de cerdos adultos castrados de un centro de inseminación, encontró que, en los testículos de 4 de los animales examinados, habían aparecido cambios atróficos de carácter difuso, además de signos que indicaban que la espermiogénesis estaba dañada. En algunos túbulos seminíferos se observó el crecimiento de células germinales atípicas. Estas células anormales también se observaron en la túnica albugínea, vasos linfáticos y pequeñas venas del cordón espermático. Asimismo, en varias localizaciones del túbulo seminífero se vio que la luz estaba completamente ocupada por una proliferación celular que podría corresponder a un tumor. En algunos casos, se pudieron observar pequeños focos gris-amarillentos de forma redondeada, los cuales microscópicamente presentaba los cambios intratubulares descritos. Los cambios observables a nivel macroscópico solían suceder en verracos de edad avanzada. En otros casos, no se pudieron observar cambios macroscópicos en los testículos debido a que las modificaciones atróficas se habían producido en menor medida. Esta imagen histológica se asemejaba mucho a lo observado anteriormente en los tumores intratubulares de las células germinales en humanos, los cuales frecuentemente no se pueden reconocer macroscópicamente. Para concluir, este estudio estableció que algunos de los testículos infértilles que sufrieron los cambios atróficos descritos, posteriormente desarrollarían un tumor, por ello los tumores intratubulares de las células germinales podrían ser considerados como la fase preinvasiva de los tumores de las células germinales.

Posteriores investigaciones, describieron casos de tumores testiculares primarios de células de Leydig, seminomas y tumores mixtos.

Uno de los casos trataba sobre un **tumor mixto** de las células del cordón sexual. El cerdo, que presentaba un aumento del volumen del testículo derecho, tenía 6 meses y era cruzado de Landrace-Large White y Yorkshire. Al examinar la masa, se observó que la superficie externa presentaba un aspecto nodular con manchas rojas y estaba envuelta por una capsula brillante

relativamente gruesa. Al seccionar el tumor, se observó que las áreas nodulares estaban compuestas por tejido que variaba de blanquecino a marrón-amarillento con una red esponjosa. El testículo derecho estaba completamente ocupado por un tejido neoplásico, compuesto por células de Sertoli y de Leydig en distintos grados de diferenciación y en una proporción variable. Por otro lado, se encontraron células de Sertoli neoplásicas en el linfonodo inguinal superficial derecho. De la misma manera, se encontraron nódulos metastásicos en el plexo pampiniforme derecho, conducto deferente izquierdo y túnica albugínea izquierda. También se observaron metástasis en la capsula del hígado, bazo, riñones y en la superficie peritoneal y diafragmática. Al examinar el testículo izquierdo, no se observó invasión tumoral, excepto en las estructuras genitales ya mencionadas. En conclusión, se trataba de un tumor testicular unilateral mixto de las células del cordón sexual, del cual las células de Sertoli neoplásicas metastatizaron, por lo que su comportamiento biológico era maligno (Mabara et al., 1990).

En otro caso de tumor mixto, un cerdo de raza Kune Kune de 7 años que presentaba un aumento bilateral del tamaño testicular. El diámetro del testículo derecho media entre 15-20 cm, mientras que el del testículo izquierdo media 8-10 cm. Ambos testículos se mostraban anormalmente firmes. El parénquima del testículo derecho había sido reemplazado por una proliferación neoplásica multilobular no encapsulada. Las células neoplásicas eran grandes y poligonales, con un citoplasma eosinofílico y gran núcleo ovoide. Esta imagen citológica era compatible con un TCL. El testículo izquierdo, por su parte, mostraba un pequeño nódulo irregular blanquecino parcialmente encapsulado. Las células neoplásicas presentes en el testículo izquierdo eran alargadas con pequeños núcleos, asemejándose mucho a la morfología de las células de Sertoli. Estas células malignas se encontraban confinadas dentro de los túbulos seminíferos y estaban rodeadas de abundante estroma fibrovascular. La ausencia de invasión de los vasos linfáticos indicaba bajo riesgo de extensión metastásica. El diagnóstico histopatológico determinó que se trataba de un caso de tumores testiculares poco frecuente, de localización bilateral con diferentes orígenes. En el testículo derecho se desarrolló un tumor de células intersticiales o de Leydig y en el izquierdo, en cambio, un tumor de células de Sertoli (Williams y Verin, 2016).

En cuanto a los **tumores de las células de Leydig**, en el año 2000 Weaver *et al.* describieron un caso en un cerdo Vietnamita de compañía de 9 años. Además del aumento de tamaño del testículo derecho, el cerdo presentaba un comportamiento menos masculino que el resto de los cerdos que convivían con él. Al examinar los testículos, se observó que el volumen de ambos estaba aumentado, midiendo el testículo derecho 20 cm de largo y el izquierdo 8 cm. A la palpación, los testículos eran normales. Macroscópicamente, se observaron varios nódulos

firmes de 0,5 cm de diámetro y de color pardo diseminados por ambos testículos. Igualmente, se observaron focos de hemorragias dispersos a lo largo de todo el tejido neoplásico. El examen histopatológico reveló que los testículos estaban ocupados mayoritariamente por tejido neoplásico constituido por nidos sólidos y láminas fusionadas de células ovaladas de citoplasma eosinófilo, granular y con vacuolas. Los bordes celulares estaban bien definidos y sus núcleos eran redondos y ligeramente basófilos. En base a estos hallazgos, se realizó un diagnóstico de un tumor bilateral de células de Leydig.

Posteriormente, se documentó otro caso de TCL en un cerdo Vietnamita de 2 años. En el examen macroscópico de los testículos, se vio que ambos estaban agrandados y presentaban una consistencia firme. Al seccionar las gónadas masculinas, se observó que el parénquima testicular había sido reemplazado por numerosas y grandes cavidades quísticas, las cuales se encontraban llenas de fluido seroso. Esta imagen, parece ser característica de los tumores testiculares de células intersticiales. De la misma manera, se encontraron infiltrados multifocales coalescentes de células de Leydig distribuidos por todo el tejido testicular. La arquitectura y las características citológicas del tumor eran prácticamente idénticas a las descritas en el anterior caso de TCL en verracos (Roberson y Andrews, 2007)

Los TCL se caracterizan por ser benignos en animales adultos, por lo que en raras ocasiones causan metástasis. Estos tumores suelen ser unilaterales y el testículo contralateral puede aparecer normal o atrofiado. Parece que los tumores funcionales de las células de Leydig suelen ser más comunes en animales de edad avanzada. Estos casos tratan de tumores bilaterales de las células de Leydig sin evidencias de metástasis a otros órganos. Además, uno de los cerdos afectados, mostraba signos leves de feminización (Weaver *et al.*, 2000; Roberson y Andrews, 2007).

Por último, en 2009 Dünzel *et al.* documentaron un caso de un **seminoma** en un verraco Pietrain de 9,5 años. Inicialmente, el animal presentaba un ligero agrandamiento no doloroso del testículo izquierdo. Unos meses después, se realizó un análisis espermático en el que se obtuvo que la densidad del eyaculado y la motilidad espermática habían disminuido significativamente. Posteriormente se realizó un examen macroscópico de la masa y se encontró que parte del parénquima testicular había sido sustituido por tejido de color marrón-rojizo jaspeado, rodeado por una capsula de tejido conjuntivo. El tumor presentaba una consistencia blanda y frágil con abundantes áreas de hemorragias y necrosis. Las células neoplásicas que constituyan el tumor eran de tamaño variable, con un núcleo hipercromático y un citoplasma eosinófilo. Al examinar el testículo derecho, que no presentaba ninguna alteración

macroscópica, se encontraron múltiples túbulos seminíferos con células tumorales pleomórficas y parcialmente apoptóticas, las cuales no presentaba un crecimiento infiltrativo hacia el intersticio. De la misma manera, en el testículo derecho se observó un infiltrado linfocitario difuso. En cuanto al resto de órganos torácicos y abdominales, no se encontraron evidencias de metástasis ni macroscópica ni histológicamente. Los exámenes histopatológicos e inmunohistoquímicos revelaron la presencia de un seminoma intratubular, difuso e infiltrativo en el testículo izquierdo, del cual se habían desprendido múltiples émbolos de células neoplásicas a la sangre y vasos linfáticos. Durante el examen clínico del testículo derecho, no se apreció ningún cambio patológico, sin embargo, la histología reveló lesiones compatibles con un seminoma intratubular difuso.

## **2.5. Estudios inmunohistoquímicos en tumores testiculares**

### **2.5.1. En el hombre**

El diagnóstico anatopatológico de los tumores se basa principalmente en el examen histológico, mediante el cual se pretende identificar las características microscópicas de las neoplasias. No obstante, en ocasiones la morfología de los tumores no es clara, por lo que es esencial el uso de técnicas auxiliares para realizar un correcto diagnóstico. La técnica inmunohistoquímica (IHQ) permite una tipificación precisa de las distintas neoplasias testiculares, fundamental para un correcto manejo terapéutico y la determinación de su pronóstico (Xiao *et al.*, 2017).

Las múltiples investigaciones realizadas en el ámbito de los tumores han permitido identificar marcadores tumorales específicos relacionados con la patogénesis tumoral. Los marcadores tumorales son moléculas que pueden estar en concentraciones elevadas en presencia de un cáncer, bien como reacción del huésped ante el tumor o bien como producto del propio tumor. Así pues, los marcadores tumorales pueden ser producidos tanto por células normales como por células neoplásicas. Estas moléculas son detectables en diferentes fluidos biológicos como la sangre, orina, en distintos tejidos del organismo y, lo más relevante, en las células tumorales. En estas, el marcador puede aparecer de nuevo, aumentar o disminuir su presencia o modificar sus patrones de localización.

La alta sensibilidad y especificidad de algunos marcadores tumorales hacen que sean muy utilizados en múltiples pruebas de screening con el fin de detectar la presencia de neoplasias, ya que permiten diferenciar a los pacientes con cáncer de individuos sanos o enfermos con patologías benignas (Hermida *et al.*, 2016). Entre los marcadores más relevantes en materia de tumores testiculares se conocen el c-KIT, las citoqueratinas, la vimentina, CD30, inhibina-alfa,

OCT3/4, Ki-67, podoplanina, fosfatasa alcalina placentaria, gonadotropina coriónica humana beta y alfa-fetoproteína (Yu *et al.*, 2009). Muchos de estos estudios se han realizado en el hombre, sin embargo, en animales los estudios son más escasos. Entre éstos destaca el perro, en el cual los tumores testiculares son frecuentes y, por ello, los estudios han sido más frecuentes. Estos han permitido, no obstante, demostrar semejanzas y diferencias en las inmunotinciones.

En el hombre, la caracterización inmunohistoquímica de los seminomas ha demostrado que el **seminoma clásico** muestra una expresión alta del c-KIT, siendo uno de los marcadores más utilizados para la diferenciación del seminoma espermatoцитico, junto con otros. (Yu *et al.*, 2009). Al igual que la mayoría de los tumores de las células germinales, el seminoma clásico es positivo para SALL4 (Miettinen *et al.*, 2014). Esta neoplasia también es positiva a la inmunotinción con fosfatasa alcalina placentaria (PLAP).

En muchos casos, la imagen histológica del seminoma clásico puede ser confundida con la que presentan los tumores con origen en las células del cordón sexual (Obiorah *et al.*, 2018). De la misma manera, el seminoma y el carcinoma embrionario son dos entidades estrechamente relacionadas, ya que las células presentes en el seminoma son morfológica e inmunofenotípicamente semejantes a las células germinales embrionarias, mientras que las células de carcinoma embrionario se asemejan a las células madre pluripotenciales de la masa celular interna del blastocisto. Por eso, en estos casos es interesante el uso de un panel inmunohistoquímico que incluya los siguientes marcadores: citoqueratina AE1/AE3, CD30, c-KIT, SOX2, SOX17 y podoplanina para diferenciar el seminoma del carcinoma embrionario. Las tinciones AE1/AE3 y CD30 son difusamente positivas en el carcinoma embrionario y negativas en seminoma, mientras que el seminoma es positivo para c-KIT y el carcinoma embrionario negativo, al igual que el resto de tumores de células germinales no seminomatosos (Huihui *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2017). SOX2 ha sido descrito como un marcador discriminatorio útil entre el carcinoma embrionario y el seminoma. Los núcleos de las células neoplásicas del carcinoma embrionario se tiñen intensamente al utilizar este marcador en la inmunohistoquímica, sin embargo, el seminoma es negativo para este marcador. SOX17, en cambio, muestra reactividad nuclear en los seminomas pero no en los carcinomas embrionarios (Nonaka, 2009; Huihui *et al.*, 2012). A diferencia de la fuerte tinción difusa observada para la podoplanina o D2-40 en el seminoma clásico, el carcinoma embrionario es típicamente negativo o solo muestra una reactividad focal débil para D2-40.

La distinción entre el seminoma y el carcinoma embrionario es fundamental ya que el tratamiento para cada neoplasia es distinto (Marko *et al.*, 2017). El Ki-67 es un marcador indicador de la proliferación celular y una alta expresión del mismo se asocia con metástasis tumorales y mal pronóstico. En el caso de los tumores de células germinales, se ha demostrado una fuerte inmunorreactividad nuclear al Ki-67, lo que implica un peor pronóstico debido a una multiplicación celular activa (Kudo *et al.*, 2019).

Por otro lado, los tumores de las células germinales también se pueden clasificar en función de su inmunorreactividad a OCT3/4, de manera que hay tumores OCT3/4 positivos, entre los cuales se encuentran el seminoma y el carcinoma embrionario, y los OCT3/4 negativos, como es el tumor del saco vitelino, coriocarcinoma y seminoma espermatocítico. Esta molécula es un marcador excelente para el seminoma y el carcinoma embrionario debido a la sensibilidad y especificidad que posee para estas neoplasias, tiñéndose el núcleo de las células neoplásicas difusa e intensamente, de manera que se puede usar en pruebas de cribado cuando se trata de tumores metastásicos con origen desconocido (Xiao *et al.*, 2017).

Con respecto al **seminoma espermatocítico**, algunos de los marcadores útiles para otros tumores de las células germinales son generalmente negativos para esta neoplasia, incluyendo OCT3/4, AE1/AE3 y CD30. Se ha observado que tan solo el 40% de los seminomas espermatocíticos son positivos a c-KIT. Al igual que el seminoma clásico, esta neoplasia es positiva para SALL4. Tanto el seminoma clásico como en el espermatocítico son reactivos para VASA, sin embargo, el segundo se tiñe con mayor intensidad (Aggarwal y Parwani, 2009; Marko *et al.*, 2017). A diferencia del seminoma clásico, el espermatocítico rara vez expresa PLAP (Kim *et al.*, 2010).

De la misma manera, la alfa-fetoproteína (AFP) y la gonadotropina coriónica humana son marcadores utilizados en el manejo del cáncer testicular. En los pacientes con seminomas clásicos los niveles séricos de AFP deberían ser normales. En caso de encontrar altos niveles de AFP en pacientes con diagnóstico de seminoma se debe sospechar de algún foco tumoral no seminomatoso de células germinales no detectado, como puede ser un tumor testicular del saco vitelino. Los altos niveles de gonadotropina coriónica son más frecuentes en tumores no seminomatosos de las células germinales (Marko *et al.*, 2017). Cabe destacar la importancia de GDF3 en el diagnóstico de los tumores testiculares no seminomatosos, concretamente en los tumores del saco vitelino. A pesar de que los seminomas y muchos de los carcinomas embrionarios también muestran inmunorreactividad para este marcador, la tinción citoplasmática difusa y la fuerte inmunorreactividad de las células neoplásicas del tumor del

saco vitelino lo diferencian del resto de neoplasias testiculares. De manera que la positividad para GDF3, en ausencia de OCT3/4 y CD30, combinado con la observación de las características morfológicas de las células neoplásicas puede ser de gran ayuda a la hora de diagnosticar tumores testiculares del saco vitelino (Gopalan *et al.*, 2009).

Los marcadores inmunohistoquímicos que han demostrado ser de mayor utilidad para la evaluación de los **tumores de las células del cordón sexual** (TCL y TCS) son la inhibina, la calretinina y la proteína melan-A. La inhibina es un marcador característico de los tumores del cordón sexual y el estroma, por eso es considerada como el mejor marcador para diferenciar los tumores estromales de los tumores de las células germinales. La proteína melan-A es también considerada un buen marcador para los tumores secretores de esteroides, incluyendo los TCL, una vez se ha excluido el melanoma. En cuanto al índice de proliferación celular Ki-67, se ha observado un aumento de la actividad mitótica y expresión de Ki-67 en los TCL malignos, aunque varios estudios han demostrado la ausencia de expresión de este antígeno en un alto porcentaje de tumores de células de Leydig humanos (Ciaputa *et al.*, 2014; Kudo *et al.*, 2019).

La calretinina es comúnmente expresada por los tumores de células de Leydig y en menor medida los tumores de células de Sertoli, mientras que los tumores de las células germinales son negativos para este marcador. Al igual que el carcinoma embrionario, los TCL y TCS expresan citoqueratinas. Las células tumorales de los TCL son positivas también para vimentina, aunque son negativas para los marcadores más utilizados en los tumores de células germinales como c-KIT, OCT3/4, PLAP, AFP y gonadotropina coriónica humana (Al-Agha *et al.*, 2007; Obiorah *et al.*, 2018). Por último, GATA-4 es expresada en tumores testiculares estromales, concretamente en los tumores de Sertoli, aunque también se ha visto en tumores de células de Leydig. No obstante, esta proteína no es expresada en los seminomas (Ramos-Vara y Miller, 2009).

### **2.5.2 En el perro**

Como ya se ha comentado, existen multitud de marcadores tumorales utilizados para la diferenciación de los tumores testiculares humanos y a pesar de que algunos de ellos han sido estudiados en los tumores testiculares caninos, la información de estos en la especie canina aun es limitada. Debido a su utilidad en el diagnóstico y la evaluación de la patogénesis tumoral, se ha determinado que es necesario realizar más investigaciones en el ámbito de los tumores testiculares caninos para que sea posible una aproximación más exacta a estas neoplasias (Yu *et al.*, 2009; Hohsteter *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en varios estudios relativos al **seminoma clásico** canino determinan que el c-KIT es marcador más sensible para esta neoplasia, ya que las células

tumorales se tiñen fuerte y homogéneamente. En la especie canina el seminoma **espermatoocítico** es negativo a c-KIT y tiene un comportamiento biológico benigno (Yu *et al.*, 2009; Hohšteter *et al.*, 2014). En el caso de PLAP, se ha observado que tan solo un pequeño porcentaje de muestras de seminoma son positivas para este marcador (Yu *et al.*, 2009). Esto se debe a que la mayoría de seminomas caninos son de tipo espermatoocítico y, al igual que el seminoma espermatoocítico humano, no se expresa PLAP. Por eso, en general, la mayoría de los seminomas caninos son negativos a la tinción con fosfatasa alcalina placentaria (Hohšteter *et al.*, 2014). La técnica inmunohistoquímica para evidenciar c-KIT y PLAP se usa para distinguir entre los seminomas clásicos y los espermatoocíticos. El seminoma clásico expresa ambos marcadores, mientras que el espermatoocítico no expresa ninguno de los dos. Esto se debe a que el seminoma clásico deriva de células germinales en estados precoces de maduración, mientras que el seminoma espermatoocítico proviene de células más maduras (Kim *et al.*, 2010; Grieco *et al.*, 2004).

OCT3/4 es un marcador altamente sensible para el seminoma y carcinoma embrionario humano, sin embargo, las investigaciones realizadas en los seminomas caninos han demostrado que en esta especie no expresan OCT3/4. Por otro lado, al igual que en el seminoma humano, en la especie canina esta neoplasia no expresa CD30. La inmunorreactividad de los seminomas a AFP, inhibina alfa, vimentina y desmina es baja. Como el origen del seminoma son las células germinales que se originan del tejido epitelial, la vimentina y desmina no son marcadores apropiados (Yu *et al.*, 2009).

Por último, al igual que en los seminomas humanos, el marcador de proliferación celular Ki-67, suele ser intensamente positivo en los tumores de las células germinales caninos, lo que supone que estos tumores tienen un alto índice mitótico (Owston y Ramos-Vara, 2007; Ciaputa *et al.*, 2014).

En cuanto a los **tumores de las células de Sertoli**, se ha demostrado que la inhibina alfa y vimentina son los marcadores más sensibles para este tipo de tumor testicular. Se ha observado que las células de Sertoli neoplásicas producen inhibina alfa en cantidades abundantes. A diferencia de los TCS humanos, en la especie canina, estos tumores son positivos a PLAP en algunas ocasiones. Este tipo de tumor tampoco expresa CD30, lo que sostiene la teoría de que esta molécula es solo expresada por el carcinoma embrionario (Yu *et al.*, 2009).

En cuanto a OCT3/4, tampoco se ha identificado en los tumores de células de Sertoli caninos (Yu *et al.*, 2009). En veterinaria, no hay mucha literatura relativa a la expresión de citoqueratinas en tumores testiculares. Sin embargo, en un estudio realizado por Banco *et al.*

(2010) obtuvo que los seminomas no eran inmunorreactivos a las citoqueratinas y que estas eran expresadas principalmente por los TCS. Además, las células de Sertoli normales no expresan citoqueratinas, de manera que este marcador también podría ser de utilidad para diagnosticar tumores de las células de Sertoli. Igualmente, la citoqueratina AE1/AE3 mostró buenos resultados en la diferenciación de tumores estromales de tumores de células germinales. Por otro lado, al igual que en los seminomas, se ha observado reactividad a la desmina en los tumores de células de Sertoli (Patnaik y Mostofi, 1993; Banco *et al.*, 2010).

La proteína E-cadherina es expresada en la membrana citoplasmática de las células de Sertoli y rara vez se expresa en las células germinales. El factor de transcripción GATA-4, por su parte, es expresado por las células de Sertoli neoplásicas, aunque no lo expresan las células tumorales de Leydig o de origen germinal. Por último, se ha observado que los tumores de células de Sertoli caninos son fuertemente positivos a gamma enolasa (Owston y Ramos-Vara, 2007).

Los **tumores de células de Leydig** muestran una reactividad similar a los de células de Sertoli, ya que son negativos a OCT3/4, y son positivos tanto a la vimentina como a la inhibina alfa. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína melan-A y la calretinina son marcadores altamente sensibles para los TCL y por lo tanto los más adecuados para la identificación de este tipo de neoplasia (Radi y Miller, 2005; Canadas *et al.*, 2016). Se ha observado que los TCL caninos expresan moderadamente el Ki-67. Los índices mitóticos de Ki-67 para los TCL benignos suelen ser del 0% y los de los TCL malignos se aproximan al 20%, por lo que aumento de la expresión de Ki-67 se considera una característica indicativa de un fenotipo maligno (Kudo *et al.*, 2019).

En conclusión, los marcadores GATA-4, NSE, INH-a y E-cadherina son útiles para distinguir el componente estromal de los tumores mixtos y la melan-A e inhibina son marcadores excelentes, pero no completamente específicos, para los tumores de células intersticiales (Owston y Ramos-Vara, 2007).

### 2.5.3 En el cerdo

Apenas existen estudios inmunohistoquímicos sobre tumores testiculares en la especie porcina. Una de las investigaciones más reseñables, fue la realizada por Mabara *et al.* (1990) en la cual se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica para evidenciar hormonas esteroideas como la testosterona. Los resultados obtenidos demostraron que las células neoplásicas de los tumores estromales no se teñían con anticuerpos monoclonales para hormonas esteroideas, pero si lo hacían con anticuerpos polyclonales para testosterona. La tinción positiva se observó en algunas áreas del tumor compuestas por células Sertoli y la mayoría de las células eran

moderadamente diferenciadas. Algunas células neoplásicas de Leydig se tiñeron débilmente y la mayoría de ellas eran moderadamente diferenciadas. La tinción positiva de testosterona en las células neoplásicas de Sertoli sugiere la presencia de proteínas receptoras para esta hormona, ya que las células de Sertoli no tumorales también contienen receptores para andrógenos. La tinción positiva en las células neoplásicas de Leydig se interpreta como evidencia de síntesis intracelular, ya que las células normales de Leydig producen hormonas esteroideas.

La conclusión a la que llegaron fue que la reactividad a la testosterona se observó principalmente en las células neoplásicas de Sertoli. Por lo tanto, los anticuerpos policlonales para las hormonas esteroideas pueden ser útiles para la detección de proteínas de unión a hormonas esteroideas en neoplasias gonadales y del tracto reproductivo.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Los tumores testiculares son frecuentes en el perro y en la especie humana y, en la mayoría de los casos, se corresponden con seminomas, tumores de células de Sertoli y tumores de células de Leydig. Habitualmente, el estudio histológico permite su diagnóstico, sin embargo, existen algunos tumores que presentan dificultades diagnósticas. Además, en algunos casos, también existen tumores mixtos, con células tumorales de origen germinal y de los cordones sexuales.

En estos casos, el empleo de marcadores tumorales es útil en su diferenciación, además de que alguno de ellos es relevante en la evaluación de su pronóstico. Mientras que en perros y en el hombre, los estudios inmunohistoquímicos han sido frecuentes, en el cerdo ocurre lo contrario, debido, en buena parte, a la escasa prevalencia de tumores testiculares en esta especie. Además, estos estudios han permitido observar semejanzas y diferencias entre el perro y el hombre en la expresión de tales marcadores y su utilidad para diferenciar tumores.

Por ello, el objetivo del presente TFG es el empleo de diferentes marcadores de tumores testiculares utilizados habitualmente en el perro y en el hombre para valorar su expresión en porcino y su capacidad para diferenciar tumores.

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Para su realización, se han estudiado 18 tumores testiculares porcinos.

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica, utilizando el buscador Pubmed, sobre tumores testiculares en el cerdo y en otras especies animales, especialmente el perro y en la especie humana. Además, se ha realizado una revisión sobre

marcadores que pueden utilizarse en la identificación de los tumores, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

En este estudio se han utilizado los siguientes anticuerpos, alguno de los cuales había sido previamente puesto a punto en el laboratorio:

- c-kit (dilución 1/400)
- Vimentina (prediluido)
- Citoqueratina (prediluido)

En todos ellos, se han utilizado un control positivo y un control negativo, que son los siguientes:

- **c-kit:**
  - Control positivo: control interno de espermatogonias y mastocitos.
  - Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.
- **Vimentina:**
  - Control positivo: control interno de tejido conjuntivo de intersticio y pared de vasos sanguíneos.
  - Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.
- **Citoqueratina:**
  - Control positivo: estructuras tubulares en rete testis.
  - Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.

Para la realización de la inmunohistoquímica se ha partido de cortes de 4 µm adheridos en portas gelificadas, que produce una fijación mayor de las secciones y evita su desprendimiento durante el procesado.

La técnica empleada fue el método Envision, de Dako, utilizando un teñidor automático en ciertos pasos. El paso inicial es la desparafinación de los cortes. Para ello, se sumergen en xileno, y se rehidratan en etanol a concentraciones decrecientes (100°, 96°, 70°), durante 5 minutos. A continuación, se procede a la desenmascaración de los epítopos, sumergiendo los cortes en soluciones liberadoras de antígenos, de pH bajo o pH alto, en función del anticuerpo utilizado (en este caso todos los anticuerpos se desenmascaran pH alto). Este proceso se realiza en un aparato específico (PT LINK DAKO) durante 20 minutos, a 96°C. Antes del siguiente paso, las muestras se enfrián en el propio PT LINK y se sumergen en buffer de lavado durante 5'.

El resto de la técnica se realiza en un teñidor automático (Autostainer plus), a temperatura ambiente. Entre los diferentes pasos se realizan lavados con un buffer específico

durante 10', en dos veces. El primer paso es el bloqueo de la peroxidasa endógena y para ello se sumergen los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno y metanol durante 5 minutos. Posteriormente, se añaden los anticuerpos primarios anteriormente citados, incubándose durante 30'. A continuación, se añade el complejo polimérico que también se incuba durante 30'. La reacción se revela utilizando el cromógeno DAB, durante 5 min, que aporta una coloración marronácea a la tinción. El paso final en el teñidor es el contraste con hematoxilina durante 5', que permitirá la diferenciación del tejido, al teñir ligeramente los núcleos de color azulado.

El paso final es el montaje en DPX para la colocación del cubreobjetos y dejar la muestra lista para su visualización al microscopio. Para ello, se deshidratan los cortes en alcoholes crecientes y se dejan reposar finalmente 5'en xilol. A continuación, se depositan unas gotas de DPX y se coloca el cubreobjetos.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este TFG se ha realizado el estudio inmunohistoquímico de 17 tumores testiculares en la especie porcina con el objeto de definirlos adecuadamente y valorar la utilidad de ciertos marcadores tumorales utilizados en el hombre y en otras especies animales. Los tumores habían sido previamente clasificados, mediante estudio histopatológico, todos ellos como seminomas, aunque en tres de ellos se observó también la proliferación aparentemente tumoral de células de Leydig o de Sertoli, sugiriendo la clasificación de tumores mixtos.

Según el patrón de distribución de las células tumorales en los seminomas, estos fueron clasificados como seminomas intratubulares (7), difusos (3) y con áreas de seminoma intratubular y zonas de distribución difusa (7).

En dos de los tumores, uno de ellos con patrón difuso y otro con intratubular, se observaron acúmulos intersticiales irregulares, alguno de ellos más o menos bien delimitado, de células poligonales grandes vacuolizadas mezcladas con abundantes células de Leydig bien diferenciadas, que sugerían un tumor de células de Leydig.

En uno de los tumores con patrón difuso e intratubular, en algunos túbulos con seminoma intratubular, se observó también la proliferación de células de aspecto fusiforme, que partían de la membrana basal, y que arropaban a las células redondeadas a poligonales características del seminoma, que se encontraban en la luz.

En el estudio inmunohistoquímico, se han utilizado marcadores frente a vimentina, c-kit y citoqueratinas de amplio espectro, los cuales permiten diferenciar ciertos tipos celulares y

evidenciar antígenos de células indiferenciadas o expresados en testículos fetales e inmaduros, algo característico de ciertos tumores. En testículos de cerdos control, la vimentina marcaba en los túbulos seminíferos exclusivamente el citoplasma de las células de Sertoli, con un patrón de aspecto piramidal y en el intersticio las células de Leydig, el tejido conjuntivo y los vasos. El c-kit marcaba las espermatogonias y los mastocitos intersticiales y la citoqueratina de amplio espectro, utilizada en este estudio, las células de túbulos de la rete testis.

El estudio inmunohistoquímico evidenció positividad frente a vimentina en algunos de tumores, siendo negativos todos ellos frente a c-kit y a citoqueratinas. Respecto a vimentina, se observó la positividad en la mayoría de los seminomas difusos (2 de 3) y de los tumores con ambos patrones (5 de 7). Respecto al seminoma de localización intratubular, fue negativa en la mayoría de los tumores intratubulares puros (6 de 7 negativos) y de los de ambos patrones (6 de 7). Respecto al número de células positivas, también fue muy variable, pero, en general, aparecían pocas células marcadas. El patrón de inmunotinción se correspondió con localización citoplasmática, bien perinuclear, completa o parcial, o con patrón granular. En los seminomas intratubulares, la positividad con vimentina evidenció una morfología aberrante de las células de Sertoli, con aparente deslocalización e hipertrofia citoplasmática irregular.

En los tumores considerados como mixtos, en el tumor con la proliferación de las células de Sertoli, éstas aparecían claramente teñidas. En los dos tumores con infiltrado intersticial, sin embargo, las células de Leydig bien diferenciadas aparecían intensamente inmunomarcadas, semejante a lo observado en cerdos normales, sin embargo, las células vacuolizadas, a menudo, aparecían negativas.

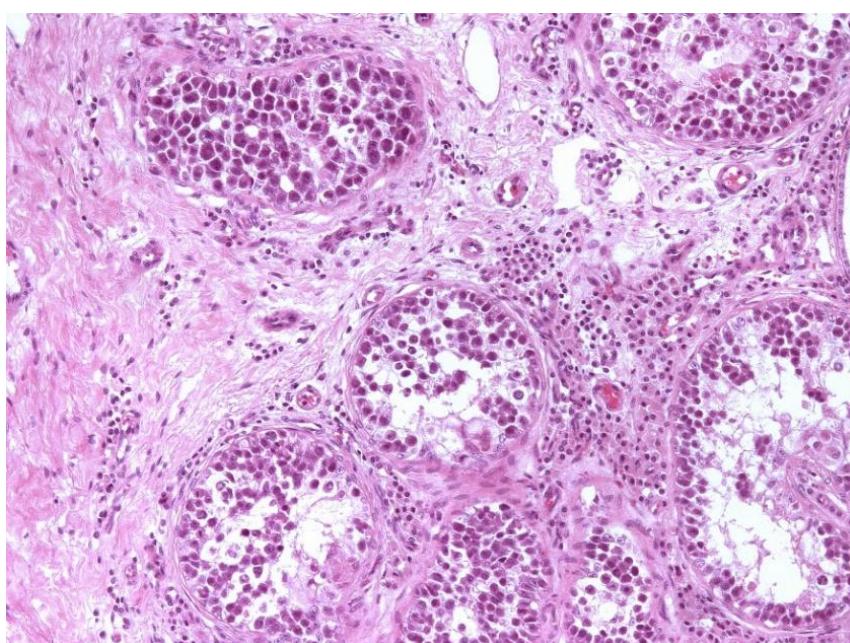


Figura 1: Seminoma intratubular, tinción Hematoxilina-eosina (x100)

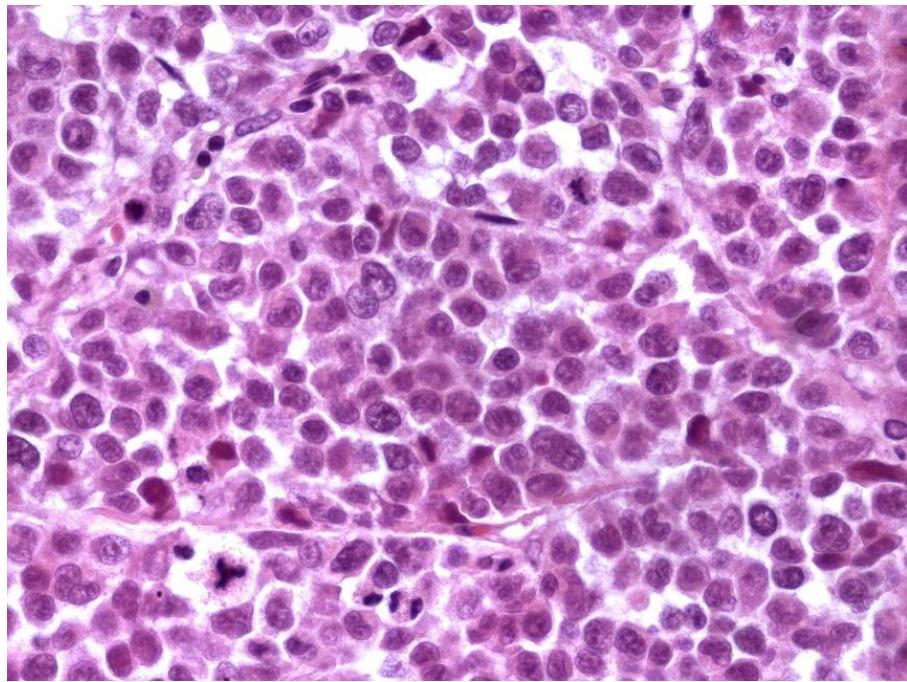


Figura 2: Seminoma espermatocítico con mitosis (x400)

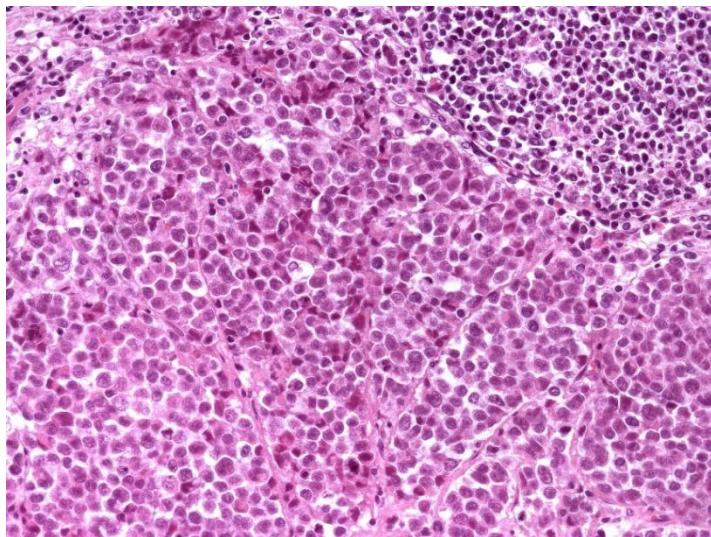


Figura 3: Seminoma espermatocítico con inflamación de linfocitos, células multinucleadas y mitosis (x200)

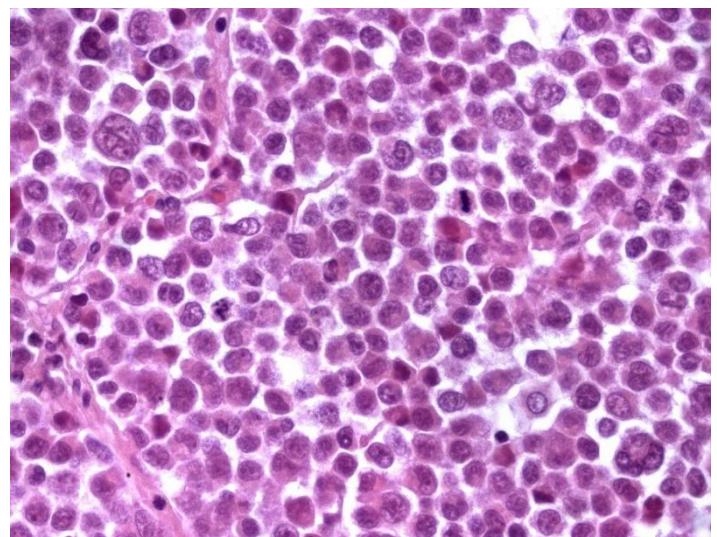
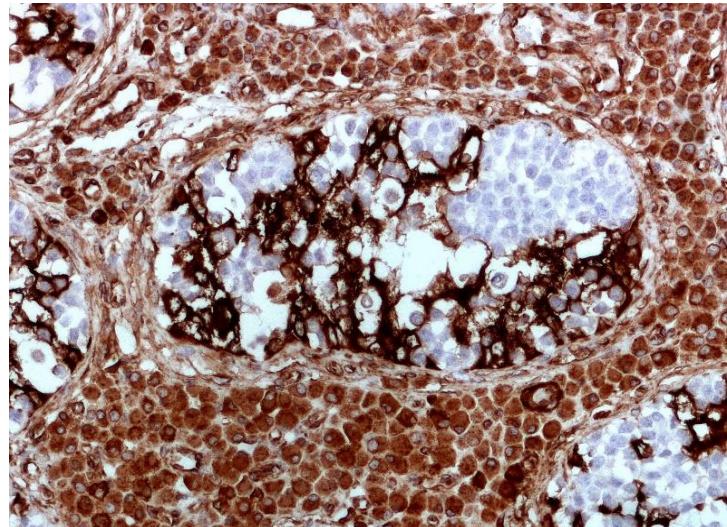
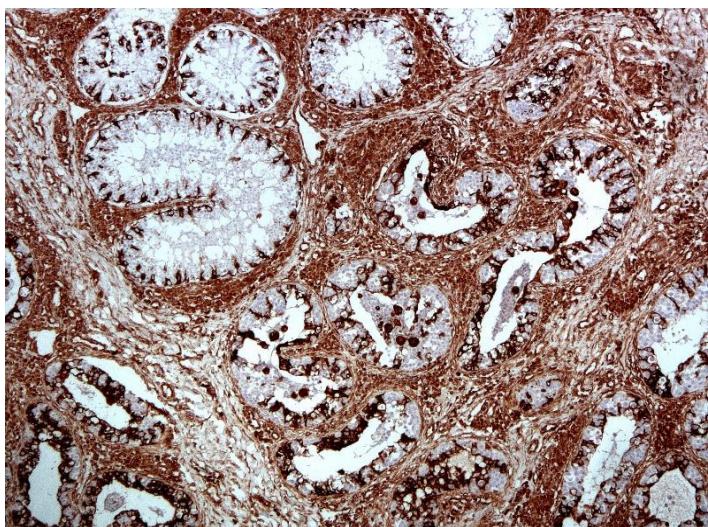
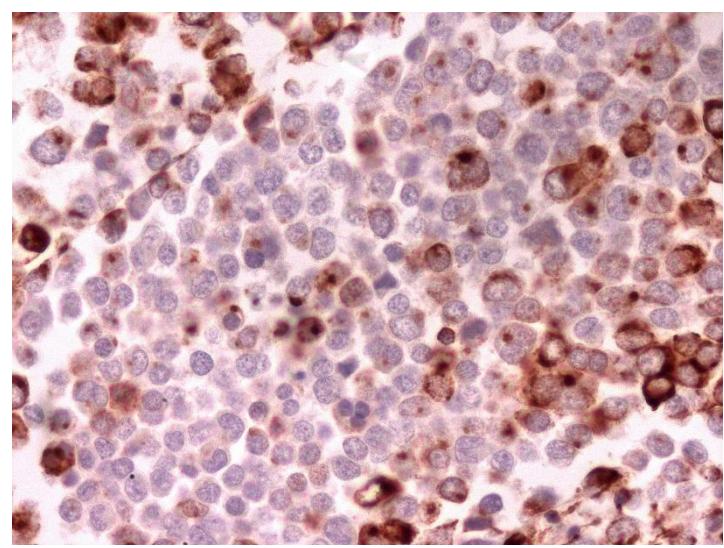
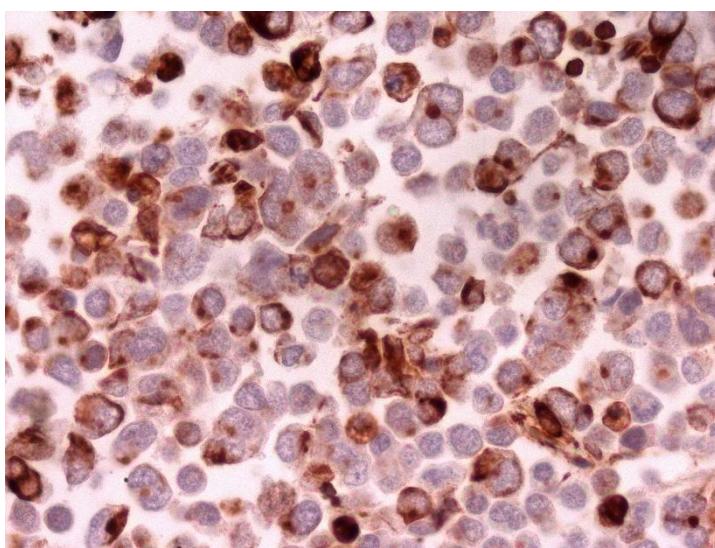


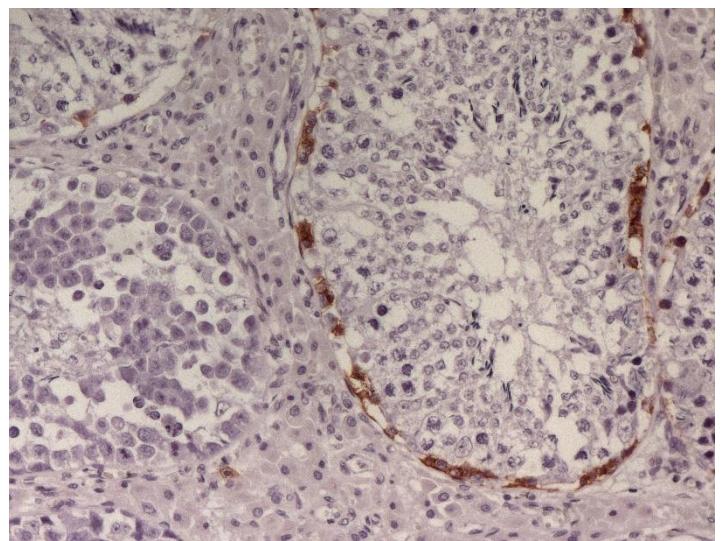
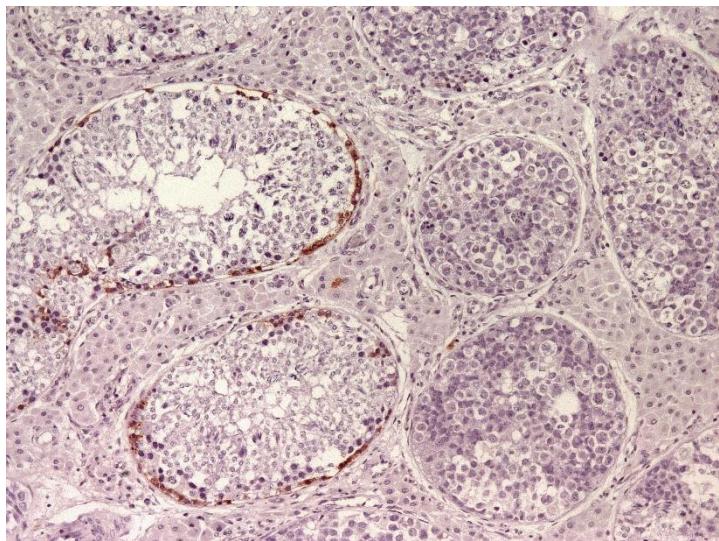
Figura 4: Seminoma espermatocítico con mitosis y células multinucleadas grandes (x400)



Figuras 5 y 6: Células de Sertoli con tinción alterada. Tinción inmunohistoquímica con vimentina (x50 y x200)



Figuras 7 y 8: Seminoma espermatocítico, tinción con vimentina. Células tumorales con patrón de positividad de localización citoplasmática, perinuclear y granular (x400)



Figuras 9 y 10: Seminoma intratubular, negativo a tinción con c-kit. Control positivo interno: espermatogonias normales y mastocitos  
(x100 y x200)

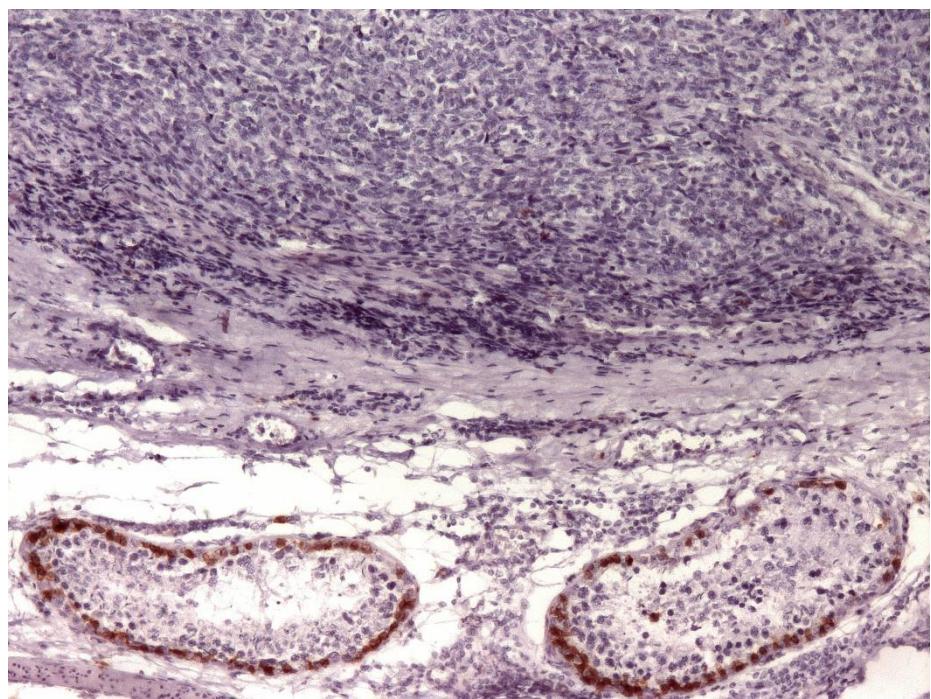
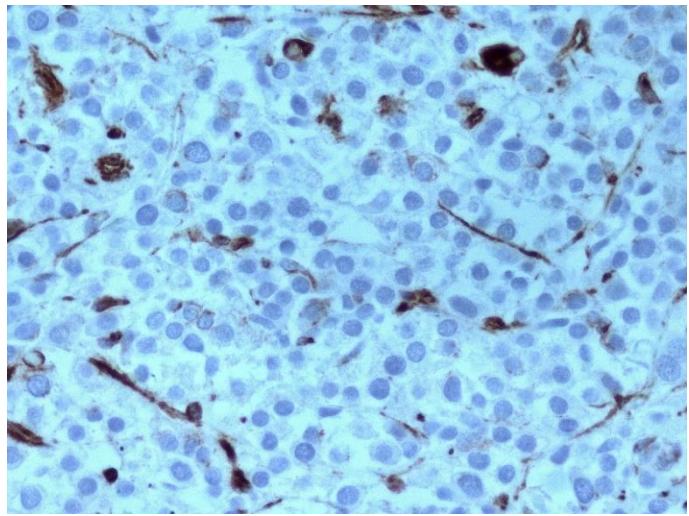
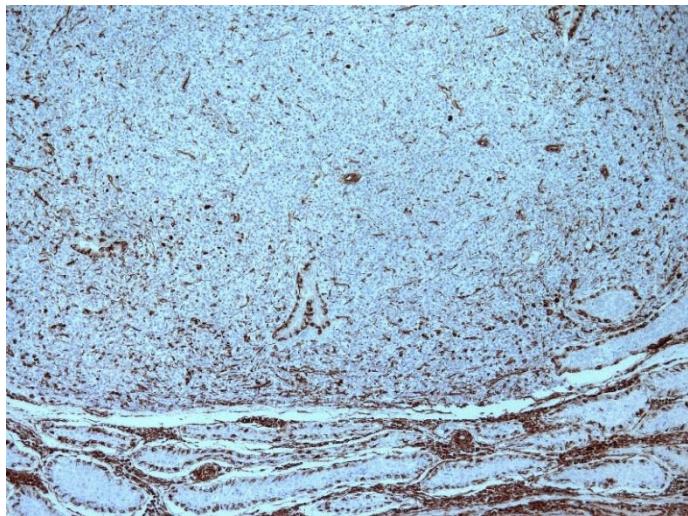


Figura 11: Seminoma difuso, negativo a c-kit (x100)



Figuras 12 y 13: Seminoma difuso con células vacuolizadas en algunas zonas, predominantemente negativo a vimentina (x50 y x400)

El presente trabajo pretende ampliar la información obtenida en el estudio sobre la expresión del receptor c-kit en tumores de animales domésticos, realizado en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza en el año 2017, por Vanessa Díaz Gimeno.

Al igual que el TFG realizado en 2017, los resultados obtenidos en la actual investigación sugieren que la mayoría de tumores testiculares porcinos son seminomas. Además, nuevamente, todos los seminomas han resultado ser negativos a c-kit lo cual sugiere que estos son de tipo espermatocítico. Esta condición se asemeja a lo que ocurre en la especie canina, ya que la mayoría de los seminomas son negativos a c-kit debido a que son seminomas espermatocíticos (Hohsteter *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2020).

En cuanto a la reactividad de los seminomas frente a la citoqueratina, se observó una reacción negativa en todos los tumores analizados. Las citoqueratinas son expresadas por las células de Sertoli indiferenciadas (normales) presentes en los túbulos seminíferos prepuberales mientras que las células maduras del testículo adulto no las expresan (Patnaik y Mostofi, 1993; Kruse *et al.*, 2009). Así pues, este marcador es de gran utilidad para estudiar tumores de células de Sertoli, ya que las células tumorales mostrarían inmunorreactividad frente a las citoqueratinas.

La mayoría de los seminomas difusos y seminomas con áreas de patrón difuso e intratubular mostraron positividad frente a vimentina, aunque en ambos casos había pocas células marcadas. El patrón de positividad tenía una localización citoplasmática pudiendo aparecer de manera perinuclear y/o granular, lo cual se correspondía con lo descrito previamente en la literatura (Patnaik y Mostofi, 1993; Yu *et al.*, 2009). Uno de los seminomas intratubulares presentó una tinción irregular con células tumorales en la base del túbulo seminífero separadas por células de Sertoli normales. Además, en este caso, se encontraron

células de Sertoli desprendidas en la luz del túbulo seminífero entre las células tumorales de origen germinal. En el seminoma con un nódulo de células de Leydig tumorales, las células intersticiales se tiñeron fuertemente y asociadas a estas se observaron células vacuolizadas negativas o débilmente positivas.

## **6. CONCLUSIONES**

- Este estudio demuestra que el seminoma es el principal tumor testicular en cerdos eliminados por infertilidad.
- Al igual que lo observado en el estudio previo de 2017, los seminomas porcinos analizados en este estudio han resultado ser negativos a c-kit, sugiriendo que la mayoría de éstos son de tipo espermatocítico en esta especie.
- De la misma manera que en la especie canina, la utilidad de las citoqueratinas en el ámbito de tumores testiculares porcinos podría estar relacionada con la diferenciación de tumores germinales y tumores del cordón sexual, ya que todos los seminomas han sido negativos para este marcador, aunque al no haberse estudiado tumores estromales no puede confirmarse esta hipótesis.
- Los patrones de positividad frente a vimentina de los seminomas, principalmente los difusos, son de localización citoplasmática y de tipo perinuclear y/o granular. Además, la positividad de los seminomas para este marcador tumoral es variable, lo cual puede estar relacionado con el tipo de patrón que presentan.
- Tres de los tumores estudiados en este estudio podrían considerarse como mixtos, sin embargo, los marcadores utilizados no han podido definirlos con claridad.
- Es necesario realizar investigaciones más profundas sobre tumores testiculares porcinos para poder establecer hipótesis plausibles y reales. En este sentido es imprescindible estudiar más seminomas y tumores de otros tipos (estromales y mixtos) además de realizar estudios inmunohistoquímicos en los que se incluyan un amplio panel de marcadores tumorales que permita definir objetivamente cada tipo de tumor.

## **CONCLUSIONS**

- This study shows that seminoma is the most common testicular tumor in eliminated boars due to infertility.
- As observed in the previous study carried out in 2017, the swine seminomas analyzed in this study have been found to be negative to c-kit, suggesting that in pigs, most of these neoplasms are spermatocytic.

- In the same way as in the canine species, the usefulness of cytokeratins in the field of swine testicular tumors could be related to the differentiation between testicular germ tumors and sex cord tumors, although since stromal tumors have not been studied, this hypotheses cannot be confirmed.
- The positivity patterns of seminomas for vimentin, mainly the diffuse ones, are located in the cytoplasm and they can be perinuclear and/or granular. In addition, the positivity of seminomas for this tumor marker is variable. This fact may be related to the different type of pattern which seminomas present.
- Three tumors studied in this study could be considered as mixed tumors, however, the used markers have not been able to define them clearly.
- It is essential to carry out more deep research about swine testicular tumors in order to establish plausible and real hypotheses. In this regard, is indispensable to study more seminomas and other type of tumors (stromal and mixed tumors) in addition to do more immunohistochemical studies that include a broad panel of tumor markers which allow to define objectively each type of tumor.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha ayudado a ampliar los conocimientos sobre los tumores testiculares, un tema de gran interés en la medicina veterinaria y para mí personalmente. De la misma manera he aprendido a realizar una búsqueda bibliográfica y a seleccionar información relevante procedente de fuentes científicas actualizadas. Por otro lado, asistir al laboratorio me ha ayudado a desarrollar competencias que indudablemente serán de gran ayuda en mi futuro profesional, como el conocimiento de la técnica inmunohistoquímica y su utilidad diagnóstica para la caracterización objetiva de los tumores. Igualmente, ver como se trabaja en el laboratorio me ha servido para ser consciente de la importancia del trabajo de investigación en el ámbito de la veterinaria, que además, podría ser una salida profesional para mi futuro. Para terminar, agradecer a mis tutores, Bernardino Moreno y Juan Badiola, su implicación en la realización del presente trabajo, tanto por sus consejos durante la redacción, como por la ayuda prestada en laboratorio durante la realización de la inmunohistoquímica. También agradecer al departamento de Patología Animal y al Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Facultad de Veterinaria por permitirme utilizar el laboratorio para la realización de este estudio.

## 8. **BIBLIOGRAFIA**

- Abou Zahr, R., Chalhoub, K., Matta, I., Horani, S., Bedoyan, Z., el Hachem, G., Ghantous, I., y Jabbour, M. (2019). Classic Testicular Seminoma in Men Aged 50 Years or Over: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Urology*, 36(5), pp. 432-438  
<https://doi.org/10.1155/2019/4391015>
- Aggarwal, N., y Parwani, A. v. (2009). Spermatocytic Seminoma. *Arch Pathol Lab Med*, 133(12), pp. 1024-1028. <http://dx.doi.org/10.1177/0300985810385150>
- Akan, S., Ediz, C., Tavukcu, H. H., Ozgun, A., y Yilmaz, O. (2020). The Clinical Significance of Seminoma Component in Testicular Mixed Germ Cell Tumour. *Urologia Internationalis*, 104(5-6), pp. 489-496. <https://doi.org/10.1159/000506780>
- Aladamat, N., y Tadi, P. (2021). *Histology, Leydig Cells*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556007/> [Consultado 12-06-2022].
- Al-Agha, O. M., y Axiotis, C. A. (2007). An In-Depth Look at Leydig Cell Tumor of the Testis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 131(2), pp. 311-317. <https://doi.org/10.5858/2007-131-311-ailalc>
- Allison, N. y Moeller, R.B. (1999) Bilateral testicular leiomyosarcoma in a stallion. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), pp. 179-182. <https://doi.org/10.1177/104063879901100214>
- Aughey, E. y Frye, F.L. (2001). *Comparative Veterinary Histology*. Londres: Manson Publishing/The Veterinary Press. pp. 167-182
- Ball, B. A. (2008). Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), pp. 650-665. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.003>
- Banco, B., Giudice, C., Veronesi, M. C., Gerosa, E., & Grieco, V. (2010). An Immunohistochemical Study of Normal and Neoplastic Canine Sertoli Cells. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4), pp. 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.04.001>
- Boujelbene, N., Cosinschi, A., Boujelbene, N., Khanfir, K., Bhagwati, S., Herrmann, E., Mirimanoff, Iiv R. O., Ozsahin, M., y Zouhair, A. (2011). Pure seminoma: A review and update. *Radiation Oncology*, 6 (90), pp. 1-12. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-90>
- Canadas, A., Romão, P., & Gärtner, F. (2016). Multiple Cutaneous Metastasis of a Malignant Leydig Cell Tumour in a Dog. *Journal of Comparative Pathology*, 155(2-3), pp. 181-184. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.05.012>
- Cedeno, J. D., Light, D. E., y Leslie, S. W. (2022). *Testicular Seminoma*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448137/> [Consultado 12-06-2022].

- Ciaputa, R., Nowak, M., Madej, J. A., Poradowski, D., Janus, I., Dziegiej, P., Gorzynska, E., & Kandefer-Gola, M. (2014). Inhibin- $\alpha$ , E-cadherin, calretinin and Ki-67 antigen in the immunohistochemical evaluation of canine and human testicular neoplasms. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 52(4), pp. 326–334. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2014.0036>
- DeForge, T. L. (2020). Sertoli cell tumor/mixed germ cell-stromal cell tumor as separate neoplasms in a bilaterally cryptorchid dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 61(9), pp. 994-996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc7424932/>
- Fankhauser, C. D., Grogg, J. B., Hayoz, S., Wettstein, M. S., Dieckmann, K. P., Sulser, T., Bode, P. K., Clarke, N. W., Beyer, J., y Hermanns, T. (2020). Risk Factors and Treatment Outcomes of 1,375 Patients with Testicular Leydig Cell Tumors: Analysis of Published Case Series Data. *The Journal of Urology*, 203(5), pp. 949–956. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000705>
- Foster, R. A., Ladds, P. W., & Hoffmann, D. (1989). Testicular Leiomyoma in a Ram. *Veterinary Pathology*, 26(2), pp. 184–185. <https://doi.org/10.1177/030098588902600215>
- França, L. R., Avelar, G. F., y Almeida, F. F. L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2), pp. 300–318. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.014>
- Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, et al. (2005). Epidemiology of testicular cancer: an overview. *International Journal of Cancer*, 116(3), pp. 331–339. <https://doi.org/10.1002/ijc.21032>
- Gelberg, H. B., McEntee, K. (1987). Equine testicular interstitial cell tumors. *Veterinary Pathology*, 24(3), pp. 231-234. <https://doi.org/10.1177/030098588702400306>
- Gil Cano, F., Ramírez Zarzosa, G., Ayala Florenciano, M., López Albors, O., Latorre Reviriego, R., Martínez Gomariz, F., Sánchez Collado, C., Arencibia Espinosa, A., y Orenes Hernández JM<sup>a</sup> Vazquez Autón, M. (2008). *Anatomía interactiva del cerdo*. Disponible en: [www.um.es/anatvet/](http://www.um.es/anatvet/) <http://www.um.es/anatvet/interactividad/acerdo/indexd.htm> [Consultado 12-06-2022].
- Gopalan, A., Dhall, D., Olgac, S., Fine, S. W., Korkola, J. E., Houldsworth, J., Chaganti, R. S., Bosl, G. J., Reuter, V. E., & Tickoo, S. K. (2009). Testicular mixed germ cell tumors: a morphological and immunohistochemical study using stem cell markers, OCT3/4, SOX2 and GDF3, with emphasis on morphologically difficult-to-classify areas. *Modern Pathology*, 22(8), pp. 1066–1074. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.66>

- Grieco, V., Rondena, M., Romussi, S., Stefanello, D., y Finazzi, M. (2004). Immunohistochemical characterization of the leucocytic infiltrate associated with canine seminomas. *Journal of Comparative Pathology*, 130(4), pp. 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2003.12.001>
- Henley, J., Young, R. y Ulbright, T. (2002). Malignant Sertoli Cell Tumors of the Testis, *The American Journal of Surgical Pathology*, 26(5), pp. 541-550. <https://doi.org/10.1097/00000478-200205000-00001>
- Hermida Lazcano, I., Sánchez Tejero, E., Nerín Sánchez, C., Cordero Bernabé, R., Mora Escudero, I., & Pinar Sánchez, J. (2016). Marcadores Tumorales. *Revista Clínica de Medicina de Familia*. 9(1), pp. 31-42. Disponible en: [especial.pdf \(isciii.es\)](http://especial.pdf (isciii.es)) [Consultado 12-06-2022].
- Hohšteter, M., Artuković, B., Severin, K., Kurilj, A. G., Beck, A., Šoštarić-Zuckermann, I. C., y Grabarević, Z. (2014). Canine testicular tumors: Two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 10(169), pp. 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0169-8>
- Jensen, K. L., Krag, L., Boe-Hansen, G. B., Jensen, H. E., & Lehn-Jensen, H. (2008). Malignant Sertoli cell tumour in a young Simmenthal bull - Clinical and pathological observations. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(6), pp. 760–763. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00991.x>
- Junqueira, L.C. y Carneiro, J. (2005). *Histología básica*. (6º edición). México D.F.: Editorial Médica Panamericana. pp. 415-427.
- Kim, J. H., Yu, C. H., Yhee, J. Y., Im, K. S., Kim, N. H., y Sur, J. H. (2010). Canine classical seminoma: A specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. *BMC Cancer*, 10(243), pp. 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-243>
- König, H. E. y Liebich, H. G. (2005). *Anatomía de los Animales Domésticos, Órganos, Sistema circulatorio y sistema nervioso. Tomo II*. México D. F.: Editorial Medica Panamericana. pp. 119-124.
- Kruse, R., Eigelshoven, S., Kaiser, A., Ruzicka, T., & Neumann, N. J. (2009). Cytokeratin 18 expression in immature Sertoli cells: Co-localization with interstitial lymphocytic infiltrates. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(1), pp. 127–130. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0009-z>
- Kudo, T., Kamiie, J., Aihara, N., Doi, M., Sumi, A., Omachi, T., y Shirota, K. (2019). Malignant Leydig cell tumor in dogs: two cases and a review of the literature. *Journal of*

- Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(4), pp. 557–561.  
<https://doi.org/10.1177/1040638719854791>
- Liao, A. T., Chu, P.-Y., Yeh, L.-S., Lin, C.-T., & Liu, C.-H. (2009). A 12-Year Retrospective Study of Canine Testicular Tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), pp. 919–923. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.919>
  - Mabara, S., Hashimoto, N. y Kadota, K. (1990). Malignant Sertoli and Leydig Cell Turnout in a Boar. *Journal of Comparative Pathology*, 103(4), pp. 369-378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80025-4)
  - Marko, J., Wolfman, D. J., Aubin, A. L., y Sesterhenn, I. A. (2017). Testicular seminoma and its mimics. *Radiographics*, 37(4), pp. 1085–1098. <https://doi.org/10.1148/rg.2017160164>
  - Miettinen, M., Wang, Z., Mccue, P. A., Sarlomo-Rikala, M., Rys, J., Biernat, W., Lasota, J., & Lee, Y. S. (2014). A systematic immunohistochemical study of 3215 cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 38(3), pp. 410–420. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000116>
  - Mruk, D. D., y Cheng, C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocrine Reviews*, 36(5), pp. 564–591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
  - Nascimento, H. H. L., dos Santos, A., Prante, A. L., Lamego, E. C., Tondo, L. A. S., Flores, M. M., Fighera, R. A., y Kommers, G. D. (2020). Testicular tumors in 190 dogs: clinical, macroscopic and histopathological aspects. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 40(7), pp. 525–535. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6615>
  - Nonaka, D. (2009). Differential expression of SOX2 and SOX17 in testicular germ cell tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, 131(5), pp. 731–736. <https://doi.org/10.1309/AJCP7MNCNCRN8NO>
  - Obiorah, I. E., Kyrillos, A., & Ozdemirli, M. (2018). Synchronous Leydig Cell Tumor and Seminoma in the Ipsilateral Testis. *Case Reports in Urology*, 2018(8), 1–4. <https://doi.org/10.1155/2018/8747131>
  - Ocal, O., Baydar, D. E., Idilman, I. S., Dogan, H. S., Tekgul, S., y Ozmen, M. (2019). Sonographic diagnosis of large-cell calcifying sertoli cell tumor. *Journal of Ultrasonography*, 19(77), pp. 161–164. <https://doi.org/10.15557/JoU.2019.0024>
  - Owston, M. A., & Ramos-Vara, J. A. (2007). Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. *Veterinary Pathology*, 44(6), pp. 936–943. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-936>

- Patnaik, A. K., & Mostofi, F. K. (1993). A Clinicopathologic, Histologic, and Immunohistochemical Study of Mixed Germ Cell-Stromal Tumors of the Testis in 16 Dogs. *Veterinary Pathology*, 30(3), pp. 287-295. <https://doi.org/10.1177/030098589303000310>
- Pawlina, W. y Ross, M. (2016). *Histología texto y atlas: correlación con biología molecular y celular* (7º edición). Estados Unidos: Lippincott. pp. 849-869.
- Radi, Z. A., y Miller, D. L. (2005). Immunohistochemical expression of calretinin in canine testicular tumours and normal canine testicular tissue. *Research in Veterinary Science*, 79(2), pp. 125–129. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2004.11.016>
- Ramos-Vara, J. A., y Miller, M. A. (2009). Immunohistochemical evaluation of GATA-4 in canine testicular tumors. *Veterinary Pathology*, 46(5), pp. 893–896. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0287-R-BC>
- Roberson, J. R., Andrews, G. A. (2007). Theriogenology: Question of the Month. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6), pp. 827-828. <https://doi.org/10.2460/javma.230.6.827>
- Rubio, I., Rodrigo, V., García, M., Verges, A., Planelles, J. y San Juan de Laorden, J. (2006). Tumor de células de Leydig: nuestros casos y revisión de la literatura. *Urología Oncológica Archivos Españoles de Urología*, 59(5), pp. 467-472. Disponible en: [ARTICULO-1--59-5.indd \(isciii.es\)](#) [Consultado 12-06-2022].
- Searson, J. E. (1980). Testicular adenocarcinoma in a ram. *Veterinary Pathology*, 17(3), pp. 391-993. <https://doi.org/10.1177/030098588001700315>
- Shortridge, E. H. (1962). Lesions of the testicle and epididymis of rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 10(2), pp. 23–26. <https://doi.org/10.1080/00480169.1962.33453>
- Valentine, B.A. (2009). Equine testicular tumors. *Equine Veterinary Education*, 21(4), pp. 177-178. Disponible en: [eve-21-4-Valentine\\_EVE\\_21-4\\_lores.pdf \(aaep.org\)](#) [Consultado 12-06-2022].
- Van Straaten, H. W. M., y Wensing, C. J. G. (1978). Leydig Cell Development in the Testis of the Pig. *Biology of reproduction*, 18(1), pp. 86-93. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/18/1/86/2767459>
- Wekerle, L., Osváth, S., Kiss, F. y Bajtai, A. (1987). Intratubular Germ Cell Tumours of Pig Testicles. *Andrologia*, 19(5), pp. 554–560. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1987.tb01898.x>
- Williams, H. J., y Verin, R. (2016). Bilateral testicular tumours of mixed origin in a Kune Kune boar. *Veterinary Record Case Reports*, 4(1), pp. 1. <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2015-000267>

- Wong, W. J., y Khan, Y. S. (2021). *Histology, Sertoli Cell*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560631/> [Consultado 12-06-2022].
- Young, B., O'Dowd, G. y Woodford, P. (2014). *Histología funcional* (6º edición). Estados Unidos: Elsevier. pp. 334-346.
- Young, R. H. (2005). Sex cord-stromal tumors of the ovary and testis: Their similarities and differences with consideration of selected problems. *Modern Pathology*, 18(2), pp. 81–98. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800311>
- Yu, C. H., Hwang, D. N., Yhee, J. Y., Kim, J. H., Im, K. S., Nho, W. G., Lyoo, Y. S., y Sur, J. H. (2009). Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. *Journal of Veterinary Science*, 10(1), pp. 1–7. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.1.1>
- Zirkin, B. R., y Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 99(1), pp. 101-111. <https://doi.org/10.1093/BIOLORE/IOY059>