



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

1. RESUMEN/ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Introducción a los tumores testiculares del perro	4
2.2. Anatomía e histología de los testículos del perro	6
2.3. Caracterización de los tumores testiculares del perro	8
2.4. Concepto y generalidades de los marcadores tumorales	12
2.5. Técnicas diagnósticas de tumores basadas en pruebas inmunohistoquímicas	12
2.6. C-kit en el diagnóstico y clasificación de los tumores testiculares del perro	14
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Tumor de células de Leydig	23
5.2. Seminoma	24
5.3. Tumor de células de Sertoli	25
6. CONCLUSIONES	25
7. VALORACIÓN PERSONAL	27
8. BIBLIOGRAFÍA	27
9. ANEXOS	30

1. RESUMEN

En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre los tumores testiculares en la especie canina, una de las neoplasias más frecuentes en esta especie. Su incidencia varía en función de factores tales como la edad, la localización anatómica del testículo, o la raza. Su etiología no está clara, pero se conoce que presentan un origen multifactorial en el que probablemente influyan factores hormonales y genéticos.

En este trabajo se incluye, además, una colección de 48 casos de tumores testiculares procedente del Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, a partir de los cuales se realiza una revisión de los datos disponibles y de las preparaciones histopatológicas correspondientes a cada caso comparando la información obtenida con los datos de la revisión de la bibliografía científica.

En los casos estudiados, además de las técnicas histológicas convencionales, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas con el marcador tumoral c-kit para la valoración de los seminomas y su clasificación en función de la positividad o negatividad a la técnica, a partir de lo que se puede determinar si son seminomas de tipo clásico o de tipo espermatocítico.

1. ABSTRACT

The present study has been carried out on a bibliographic review of canine testicular tumors, which is one of the most frequent. Its incidence depends on several factors, such as age, anatomical location of the testicle or race. Its etiology is not clear, but it is known that their origin is multifactorial, in which hormonal and genetic factors are likely to influence.

Likewise, this study also exposes a collection of 48 cases from the Anatomopathological Diagnostic Service, from which is made an exhaustive review of the available data, and the visualization of the histopathological preparations from each case, relating this to the information obtained in the review of the scientific bibliography.

In these cases, in addition to conventional histological techniques, immunohistochemical tests were performed with c-kit for the evaluation of some cases of seminomas and their classification according to the positivity or negativity to the technique, from which it can be determined if they are classical or spermatocytic seminomas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1-Introducción a los tumores testiculares del perro

Los tumores testiculares son una de las neoplasias más frecuentes en los perros. En el testículo del perro se pueden originar una gran variedad de crecimientos neoplásicos, tanto primarios como secundarios, aunque son más frecuentes las neoplasias primarias testiculares. Son tres los tumores testiculares en la especie canina que se observan más habitualmente: los tumores de células de Sertoli (TCS), los seminomas (SEM) y los tumores de células intersticiales o de Leydig (TCI o TCL) (Mialot, 2012).

Su frecuencia de presentación no está muy clara, pero en general la bibliografía consultada coincide en que la incidencia de los seminomas y los tumores de células intersticiales es similar, mientras que los tumores de células de Sertoli aparecen en menor proporción. Sin embargo, algunos autores afirman que la frecuencia de presentación de estos tres tipos de tumores es similar (Nodvedt *et al.*, 2010). Un estudio de 2008 realizado por Grieco *et al.* concluyó que la frecuencia con la que se presentan no es similar, puesto que de 232 perros estudiados en necropsia, un 27% presentaban un tipo o más de tumores testiculares; siendo el 50% tumores de células intersticiales o de Leydig, 42% seminomas, y solamente un 8% resultaron ser tumores de células de Sertoli.

Existen otros tipos de tumores testiculares en el perro, como hemangiomas, tumores de células de la granulosa, gonadoblastomas, teratomas, mesoteliomas, etc., pero al ser su frecuencia de presentación muy baja no se abordarán en el presente estudio. Por otro lado, cabe destacar que en una proporción no despreciable de casos coexisten dos de los tres tipos, o incluso tres de los tumores más frecuentes en un mismo animal (North y Banks, 2009)

Son tres los principales factores que intervienen en la predisposición de un perro a presentar un tumor testicular, la edad, la localización de los testículos (escrotales o abdominales) y la raza. En la práctica, pueden aparecer tumores testiculares en cualquier edad, pero es mucho más frecuente encontrarlos en animales mayores, especialmente a partir de los 7 años de edad. Sin embargo existen diferencias según el animal presente los testículos completamente descendidos o no, puesto que los perros criptórkidos tienen un riesgo mayor de padecer tumores testiculares en edades más tempranas (Harvey y McKeever, 2009). Concretamente, se ha referido que el riesgo de neoplasia testicular en perros criptórkidos es entre 10 y 13 veces mayor que en perros con los testículos completamente descendidos (Theilen y Madewell, 1979). En otro estudio de Liao *et al.* de 2009 se demostró que un 72% de los tumores mixtos se

encontraban en testículos criptórqidos; que un 69% eran tumores de células de Sertoli, los seminomas un 58%, y los tumores de células de Leydig un 24%. Paralelamente, no se ha podido demostrar que la criptorquidia se produzca más frecuentemente en un testículo que en otro, pero algunos autores indican que el testículo derecho presenta mayor predisposición. Según Nielsen y Kennedy (1990) es probable que el testículo derecho tenga más tendencia a la criptorquidia por encontrarse en una posición más craneal, lo que supone que la distancia hacia el escroto sea mayor que en el testículo izquierdo.

La edad y la localización de los testículos son los factores más influyentes sobre la presentación de neoplasias testiculares, aunque se piensa que otros factores podrían ejercer una influencia en la génesis tumoral testicular, aunque todavía no se han identificado claramente. Como se ha dicho anteriormente, la raza es otro factor que se cree que tiene relevancia en la incidencia de tumores de testículo. Algunos estudios han concluido que las razas con mayor predisposición son los Chihuahua, Pomerania, Caniche miniatura y mediano, Schnauzer miniatura, Pastor de Shetland, Husky Siberiano y Yorkshire Terrier; mientras que las razas con una menor frecuencia de presentación son Beagle, Labrador Retriever, y los mestizos (Mialot, 2012).

Es muy frecuente que los tumores testiculares se detecten de forma accidental e inesperada, puesto que en una alta proporción de casos no dan lugar a signos clínicos evidentes. Además, estadísticamente predominan los tumores benignos de testículo (Gregory *et al.*, 2008). Las neoplasias benignas se caracterizan, en general, por estar constituidas por células muy cercanas morfológicamente al tejido del cual se originan. Asimismo, suelen ser crecimientos encapsulados, bien circunscritos, y no invasivos, que tienden a presentar una velocidad de crecimiento lento y una menor proporción de neovasos en comparación con los tumores malignos. Los tumores benignos no suelen alterar la piel que los recubre, y de forma general no comprometen la vida del animal de forma directa, salvo excepciones. Sin embargo, algunos tumores testiculares pueden ser malignos, y se caracterizan por estar constituidos por células notablemente diferentes a las del tejido del que se originan, por no estar encapsulados, y por crecer a una alta velocidad invadiendo tejidos adyacentes. Además, suelen presentar una elevada proporción de neovasos que pueden dar lugar fácilmente a hemorragias intratumorales (Misdorp, 1996).

Los tumores testiculares en los perros son, generalmente, unilaterales, aunque se han descrito casos de neoplasias de testículo bilaterales. Cuando son unilaterales es frecuente que el testículo contralateral se observe atrofiado (Patnaik y Mostofi, 1993).

2.2-Anatomía e histología de los testículos del perro

Para comprender las características de las neoplasias testiculares y las diferencias anatomopatológicas entre los tres tipos de tumores más frecuentes es preciso conocer la anatomía, citología e histología de los testículos. El testículo es un órgano doble de localización bilateral que se desarrolla a ambos lados en la región lumbar, medial al riñón embrionario, a partir de la cresta gonadal (König y Liebich, 2005). A partir de esta posición anatómica, los testículos se desplazan hasta las bolsas escrotales, que se sitúan fuera de la cavidad abdominal. Este posicionamiento final se explica porque, al situarse fuera de la cavidad abdominal, los testículos permanecerán a una temperatura ligeramente inferior a la corporal, lo que favorecerá el desarrollo de las células germinales masculinas. En el caso del perro, este descenso de los testículos desde el abdomen no ocurre en el periodo perinatal como en otras especies, sino que se produce alrededor del mes tras el nacimiento (Climent *et al.*, 2013). Por otra parte, cada testículo se encuentra suspendido por separado dentro del escroto gracias a un cordón espermático, un conjunto de estructuras que incluyen el conducto deferente, vasos y nervios. La superficie externa del testículo es lisa por el revestimiento peritoneal directo excepto en sus extremos y a lo largo del borde, donde el testículo se encuentra unido al epidídimo (Dyce *et al.*, 1999).

Por la parte más externa, los testículos están recubiertos por una hoja del proceso vaginal del peritoneo a modo de cubierta serosa monocapa. Por el interior de esta hoja, los testículos se encuentran rodeados por una cápsula de tejido conectivo denominada túnica albugínea, formada por fibras colágenas y elásticas y células mioides, y por la que discurren los grandes vasos sanguíneos del testículo, la vena y la arteria testicular (Climent *et al.*, 2013). Esta túnica cumple la función de mantener el parénquima testicular bajo presión, lo que explica que en casos de inflamación del parénquima los animales presenten un fuerte dolor (Dyce *et al.*, 1999). Además, a partir de la túnica albugínea se proyectan, hacia el interior, los septos del testículo, también constituidos por tejido conectivo. Estos septos dividen el parénquima en lobulillos piramidales, y se unen entre sí en el eje testicular para formar el mediastino del testículo. Éste, contiene la red testicular, formada por numerosos tubulillos anastomosados entre sí, y que bajo la influencia de los estrógenos producidos por las glándulas suprarrenales podrán reabsorber hasta un 90% del agua que rodea los espermatozoides (Climent *et al.*, 2013). Por su parte, cada lobulillo testicular contiene entre 1 y 4 canalículos testiculares, localización donde se producirá la formación de las células germinales masculinas (Blanco y García, 2004). Esas células se diferencian desde espermatogonias hasta espermatozoides durante la espermatogénesis (König y Liebich, 2005). Además de éstas células del epitelio

germinativo, se encuentran también unas células de sostén, las conocidas como células de Sertoli, que tienen la función de producir diversas proteínas que dirigen la espermatogénesis, nutren las células, fagocitan pequeñas gotas citoplasmáticas, y liberan espermatídes maduras a la luz tubular (König y Liebich, 2005). Por otra parte, los túbulos seminíferos contorneados, que se encuentran en el interior de los lobulillos, discurren en asas enrolladas cuyas terminaciones, los túbulos seminíferos rectos, se introducen en la red del testículo en el mediastino testicular (Climent *et al.*, 2013; König y Liebich, 2005). En el intersticio testicular se encuentran las células intersticiales o también conocidas como células de Leydig, encargadas de la producción de hormonas sexuales masculinas, especialmente testosterona. Por último, de la red del testículo nacen entre 8 y 12 conductos excretores del testículo que perforan la túnica albugínea y llegan a la cabeza del epidídimo (König y Liebich, 2005).

Es por todas estas características anatómicas e histológicas por lo que a la palpación del testículo, éste se muestra firme a la vez que elástico, disminuyendo esta consistencia con la edad por la pérdida de túbulos seminíferos, aunque una consistencia blanda en un perro joven puede indicar una degeneración del testículo (Climent *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta que el testículo es un órgano glandular, que se comporta como exocrino al excretar los espermatozoides, y como un órgano endocrino al producir testosterona. La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero, que, como se ha indicado anteriormente, es un saco ciego revestido por dos tipos de células: las células de Sertoli y las células productoras de espermatozoides. Así pues, las funciones endocrinas del testículo se realizan por las células intersticiales de Leydig a través la producción de un andrógeno, y por las células de Sertoli, responsables de la producción de inhibina. Ambos tipos de células están, generalmente, bajo el control pulsátil pero más o menos tónico de las gonadotropinas (Dyce *et al.*, 1999).

Las células de Sertoli, además de las funciones antes señaladas, tienen una participación activa en la formación de la barrera hematotesticular. Esta barrera posee una función metabólica e inmunológica, impidiendo que las células espermatogénicas más diferenciadas entren en contacto directo con los capilares sanguíneos o linfáticos. Además, las células de Sertoli desempeñan funciones metabólicas, entre las que destacan la fagocitosis de los productos de desecho, así como de espermatozoides en regresión y la producción de las proteínas ABP (*androgen-binding protein*), que son las encargadas de activar la hormona FSH hipofisaria y la secreción de testosterona. Es por ello que, al convertirse estas células en células neoplásicas,

son capaces de sintetizar estrógenos, que serán los responsables de la inhibición de las hormonas hipofisarias llevando a una feminización del perro (Blanco y García, 2004).

Las células de Leydig son las encargadas de la síntesis y secreción de hormonas masculinas, principalmente testosterona (Blanco y García, 2004). Se localizan en el tejido conjuntivo presente en los espacios intersticiales que rodean los túbulos seminíferos formando grupos alrededor de los capilares. Se disponen en forma de cordones o racimos, sin existir una estrecha relación de cada célula con un capilar, y existiendo canaliculos intercelulares y uniones gap entre células adyacentes (Dellman, 1994).

Microscópicamente, las células de Sertoli presentan un núcleo grande ovalado, perpendicular a la base, con cromatina dispersa y un nucléolo muy voluminoso. Las células de Sertoli contiguas se unen mediante complejos de unión y delimitan compartimentos basales y apicales (barrera hematotesticular). En el compartimento basal se sitúan las espermatogonias, mientras que en el compartimento apical se pueden encontrar el resto de células espermatogénicas.

Por su parte, las células de Leydig presentan, microscópicamente, una forma poliédrica, núcleo esférico, citoplasma extenso y muy eosinófilo. Tienen un origen mesenquimatoso, y su desarrollo da lugar a dos generaciones de células intersticiales, las fetales y las pubertales (Wrobel y Dellman, 1987). En sus membranas se encuentran la mayoría de enzimas necesarios para la síntesis de esteroides (Dellman, 1994).

2.3- Caracterización de los tumores testiculares del perro

La histogénesis de los tumores del testículo es similar a la de los tumores del ovario. Por su parte, el seminoma es homólogo al disgerminoma del ovario, derivando ambos de las células germinales. Los tumores de células de Leydig y Sertoli (tumores de las células de los cordones sexuales-estroma gonadal) comparten similitudes con algunas formas de tumores de las células de la granulosa del ovario y con luteomas. Los tumores de células de Sertoli se relacionan frecuentemente con una producción hormonal.

Los tres tumores testiculares más frecuentes son: Tumor de Células de Sertoli (SCT), Tumor de Células de Leydig o Intersticiales (ICT), y Seminoma (SEM).

Es frecuente que los tumores de células de Leydig se encuentren de forma accidental en el curso de la realización de la necropsia, caracterizándose por ser de tamaño reducido, difíciles

de palpar, y muy frecuentemente sin haberse observado previamente signos clínicos en el animal. Aproximadamente un 50% de los tumores testiculares encontrados en animales que no muestran signos clínicos son tumores de células de Leydig, hecho que puede significar que el desarrollo de esta neoplasia es más lento que otros tipos tumorales, por lo que no se detecta hasta que el tumor alcanza mayores tamaños cuando el perro ya tiene una edad avanzada (Liao et al. 2009). Por su parte, los seminomas y los tumores de células de Sertoli generalmente presentan un signo clínico común: el aumento de tamaño del testículo afectado y una atrofia del testículo contralateral. Además, ocasionalmente pueden causar dolor por hemorragias intraescrotales y edema.

El **tumor de células de Sertoli** puede exhibir signos clínicos diversos, que pueden aparecer de forma aislada o bien conjuntamente. Incluso en algunas ocasiones su presencia puede pasar totalmente inadvertida no mostrando signo alguno. Pero por el contrario, su presencia puede provocar algunas alteraciones en la piel, como la aparición de alopecias simétricas en tórax ventral, abdomen o zona perineal o la pigmentación morada u oscura de la piel, acompañada o no de prurito generalizado. Asimismo, también el animal puede mostrar signos de feminización, debidos a un componente estrogénico de la neoplasia. Paralelamente, un signo que también puede predecirse es la ginecomastia, con aumento de tamaño de las glándulas mamarias y secreción mamaria, o la disminución del tamaño del prepucio y del pene, así como atrofia del testículo contralateral.

El síndrome de feminización es un signo esperable cuando existe un tumor de células de Sertoli, por lo que se considera un síndrome paraneoplásico que se debe a un aumento de la producción de estrógenos y/o a un aumento de la relación entre las proporciones de estradiol y testosterona. Estos incrementos en la producción hormonal se deben a la propia neoplasia por producir de forma directa estas hormonas, aunque en algunas ocasiones se ha atribuido a un aumento en la conversión de andrógenos a estrógenos (Okjin y Kyung-Suk, 2005). Es este aumento de la concentración de hormonas el que puede dar lugar a algunos de los signos clínicos anteriormente mencionados, como la alopecia simétrica. Además, puede conducir a otras alteraciones tales como eritema prepucial lineal, galactorrea o atrofia peniana, entre otros. Este síndrome no se presenta en todos los perros con tumores de células de Sertoli, aunque suele aparecer en gran parte de los casos. Se estima que se presenta en una proporción del 70% de los casos cuando el testículo tumoral se encuentra en una localización abdominal, mientras que solamente aparece en un 15% de los casos cuando el tumor se localiza en el escroto. Por otra parte, los estrógenos producidos por la neoplasia pueden conducir a una mielosupresión en aproximadamente un 15% de los perros con síndrome de

feminización (Merchant, 2005), hecho que empeora el pronóstico gravemente si no se realiza una castración antes de que transcurra demasiado tiempo. En una primera fase, los elevados niveles de estrógenos plasmáticos conducen a una leucocitosis neutrofílica y una hiperplasia mieloide, que conduce al animal a una pancitopenia que, en la mayoría de ocasiones, no revierte (Planellas *et al.*, 2007). En general, el síndrome de feminización desaparece cuando se castra el animal, pero si se han producido metástasis funcionales el síndrome puede persistir si no se detectan y tratan (Dahaliwal *et al.*, 1999).

Por su parte, la **clínica del seminoma** es poco manifiesta, siendo el signo más común el aumento de tamaño del testículo afectado. Aunque en algunos casos este tumor puede producir estrógenos causando la feminización del perro del mismo modo que ocurre en los tumores de células de Sertoli, y con las mismas complicaciones explicadas previamente.

La bibliografía acerca de la **clínica del tumor de células de Leydig** o intersticiales es contradictoria, por lo que se puede concluir que esta neoplasia no cuenta con signos específicos, aunque pueden observarse hernias perianales y alteraciones prostáticas.

Desde el punto de vista **anatomopatológico macroscópico y microscópico**, los **tumores de células de Sertoli** generalmente tienen la túnica albugínea intacta, y a la sección se muestra una red esponjosa fibrosa, que puede ser fina o gruesa, encerrando un tejido blanquecino o marrón-amarillento (Fig. 1).

Presentan una consistencia muy firme por el alto contenido en estroma intersticial, y son multinodulares. Microscópicamente consisten, típicamente, en agregados de células de Sertoli de tamaño variable, en forma tubular o difusa separadas por un abundante estroma fibroso. Las células neoplásicas suelen presentar una morfología agrandada, con un citoplasma pálido y, en algunos casos, con cierta vacuolización del citoplasma. En ocasiones pueden presentar un estroma fibroso extenso. En función del patrón histológico se pueden distinguir dos variantes de tumores de células de Sertoli: intratubular con o sin invasión, y de tipo difuso (González y Morales, 1997) (Fig. 2).

Los **seminomas**, por su parte, son neoplasias de las células germinales de los túbulos seminíferos. Macroscópicamente se caracterizan por presentar una consistencia blanda y una superficie de sección de color gris/blanco homogéneo (Fig. 3). Su tamaño es variable, pudiendo hacer aumentar el tamaño testicular de forma notable en muchos casos. Raramente son malignos, aunque desde el punto de vista histológico una buena parte de ellos suele presentar visibles imágenes de malignidad, con marcadas atipias celulares (Fig. 4). El tumor está

constituido por células grandes, poliédricas, con citoplasma granular acidófilo y uni o multinucleadas, además de observarse abundantes mitosis, algunas de ellas atípicas (Fig. 4), y hemorragias (González y Morales, 1997). Habitualmente se observa en estos tumores infiltrados inflamatorios focales de tipo linfocitario (Fig.5). En algunos seminomas se puede englobar la túnica albugínea, lo que puede dar lugar a un aumento de tamaño parecido al del tumor de células de Sertoli. Generalmente los seminomas se encuentran en uno de los polos testiculares.

En los seminomas humanos se consideran dos tipos, el clásico y el espermatocítico. Un estudio de Looijenga *et al.* (1994) realizado en perros concluyó que el seminoma más frecuente en la especie canina es el seminoma de tipo espermatocítico, por lo que sugiere reclasificarlo denominándose seminoma espermatocítico.

La característica diferencial del **tumor de células de Leydig** es su tamaño, que normalmente no sobrepasa un centímetro de diámetro, siendo su coloración desde amarillenta a naranja claro. Aparece en forma de nódulos esféricos bien delimitados del resto del tejido testicular (Fig. 6), de consistencia gomosa, y en muchas ocasiones se acompañan de hemorragias y quistes (Figs. 7 y 8) (Nieto *et al.*, 1989). Microscópicamente se caracteriza por estar constituido por células poliédricas de gran tamaño con núcleos oscuros de pequeño tamaño y abundante citoplasma eosinófilo con gotas lipídicas y cristaloides eosinófilos de Reinke (Fig 9). Las mitosis son infrecuentes, observándose gran cantidad de vasos sanguíneos neoformados. Según el patrón histológico se de los tumores de células de Leydig se han clasificado en tres tipos: el trabecular difuso, el vascular-quístico o angiomatoso, y el pseudoadenomatoso. El trabecular difuso se caracteriza por estar constituido por finas bandas de tejido conjuntivo con las células tumorales localizadas alrededor de los vasos sanguíneos de forma alineada; el vascular-quístico o angiomatoso se distingue por la presencia de cavidades quísticas de tamaños y formas variadas que contienen líquido y glóbulos rojos, delimitadas por las células tumorales (Fig.10). Por último, el pseudoadenomatoso se caracteriza por estar constituido por pequeños paquetes de células que simulan estructuras glandulares exocrinas (Nielsen and Lein, 1974; Nieto *et al.*, 1989).

No es raro que al estudiar un tumor testicular histológicamente se observen más de un tipo neoplásico, normalmente dos, constituyendo los conocidos como tumores mixtos. Estos pueden presentar características variables, pero comúnmente los tumores mixtos de células germinales y células de Sertoli presentan una “mezcla” íntima entre ambos tipos celulares en distintas proporciones, siempre contenidas en estructuras con forma tubular que pueden

variar en tamaño (Fig. 11). El estroma de soporte de las células neoplásicas puede ser desde fibrovascular hasta fibrocartilaginoso (Patnaik y Mostofi, 1993). Este tipo de tumores no se muestran encapsulados, y de forma general no suelen invadir la túnica albugínea testicular. Microscópicamente se observan las mismas características que las células neoplásicas de cada tipo tumoral que conforma el tumor mixto.

2.4-Concepto y generalidades de los marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son una eficaz herramienta para el diagnóstico y clasificación de las neoplasias en general. De forma específica, los marcadores tumorales son moléculas que pueden presentarse en concentraciones más elevadas respecto a los valores normales existentes en las células a partir de las que se origina la neoplasia. Este incremento en su concentración puede deberse a una reacción del huésped ante el tumor, o bien puede ser un producto del propio tumor (Hermida *et al.*, 2016). Así pues, los marcadores tumorales pueden ser producidos tanto por células normales como por células neoplásicas. Asimismo, también pueden ser considerados marcadores tumorales otras sustancias e incluso procesos que se alteran de forma cualitativa o cuantitativa como resultado de la presencia de una neoplasia (Campuzano, 2010).

De esta forma, los marcadores tumorales pueden ser de distinta naturaleza. También se puede considerar marcadores tumorales las células neoplásicas circulantes en sangre. Es por estas características que los marcadores tumorales son muy útiles tanto en la determinación de la presencia de un proceso neoplásico como su identificación. Por ello, mediante marcadores se puede determinar si existe neoplasia, en qué órgano u órganos se localiza, si existe metástasis, la agresividad del proceso neoplásico, el tipo de neoplasia concreta, etc. Clínicamente, un marcador tumoral debe ser altamente específico para un determinado tumor o grupo de tumores evitando los falsos positivos, debe permitir la detección del proceso neoplásico antes de que se presenten signos clínicos, y debe ser altamente sensible evitando los falsos negativos (Campuzano, 2010).

2.5-Técnicas diagnósticas de tumores basadas en pruebas inmunohistoquímicas

Clásicamente, el diagnóstico anatomopatológico de las neoplasias en los animales se ha basado en la histopatología de los tejidos estudiados mediante tinciones. Para ello, ha sido de

gran importancia la experiencia y conocimientos del profesional para llegar a una clasificación correcta del tipo de tumor (Quezada *et al.*, 1993). Sin embargo, en una parte no despreciable de los casos se producen problemas de diagnóstico (Osborn y Weber 1983), puesto que ni todos los tumores del mismo tipo son iguales histológicamente ni todos los tumores pueden ser encuadrados dentro de una clasificación ya existente por presentar variaciones frente a ésta. Además, en muchos tejidos pueden desarrollarse tumores mixtos difícilmente clasificables en algunos casos.

En los últimos tiempos, su identificación se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas. De forma general, estas técnicas se basan en la unión específica de un anticuerpo con un antígeno tisular, seguida de una serie de procedimientos dirigidos a hacer visible la reacción (Quezada *et al.*, 1993). Así pues, se utilizan anticuerpos marcados que se unirán a las proteínas que se pretenden identificar. En las últimas décadas ha crecido de forma notoria el desarrollo comercial de anticuerpos específicos para estos diagnósticos, tanto monoclonales como policlonales, lo que ha impulsado fuertemente el uso de estas técnicas para el diagnóstico oncológico (Kohler y Milsten, 1975). Actualmente, incluso, han llegado al mercado paneles con distintos anticuerpos (poli y monoclonales) que permiten determinar el perfil antigénico de los tumores. Estos paneles consisten en aplicar de forma consecutiva 3-4 anticuerpos que permiten clasificar el tumor en cuestión en un grupo antigénico determinado que condicionará, del mismo modo, los anticuerpos más específicos a utilizar después para conseguir un diagnóstico definitivo (Quezada *et al.*, 1993).

La técnica inmunohistoquímica se fundamenta en una alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, que permitirá determinar la expresión de biomarcadores (proteínas). Se puede realizar de varias formas, sobre tejidos en fresco, fijados en formol e incluidos en parafina (de Dios y Acosta, 2018).

Es muy común realizarla previa fijación, que de forma general se realiza en formaldehído. Este fijador desnaturaliza las proteínas rompiendo masivamente los puentes de hidrógeno que conforman su estructura. El formaldehído es tolerado por los tejidos y presenta una buena, aunque lenta, penetración. Se usa en solución al 10%. De este modo, con la fijación se asegura la preservación de los tejidos frente a la autólisis y putrefacción, conservando la morfología celular (de Dios y Acosta, 2018).

Realizada la fijación, se procede a seleccionar los sectores de tejido que se requieran mediante el tallado apropiado de las muestras, que posteriormente se deshidratarán con alcoholes y se incluirán en parafina. Seguidamente se realiza el corte en secciones de entre 3 y 4 micras de

espesor, y a continuación se montarán en portaobjetos de vidrio. Una vez montados, los cortes deberán secarse entre 37 y 45°C durante 12 horas, o a 60°C durante una hora; aunque en algunas ocasiones también se pueden almacenar a temperatura ambiente (de Dios y Acosta, 2018). Generalmente, cuando haya que almacenar las muestras para estudiarlas posteriormente se deberán envolver en papel de aluminio a una temperatura igual o inferior a 20°C (Alarcón *et al.*, 2015).

A continuación se procede al desparafinado de los cortes. En este paso del proceso es precisa la recuperación antigénica, ya que durante la fijación se producen puentes metilo cruzados entre las proteínas formándose compuestos cálcicos, que afectan a las zonas antigénicas y deberán eliminarse para obtener un buen resultado de la prueba inmunohistoquímica (Vaquero, 2007). Así pues, la recuperación antigénica es el procedimiento mediante el que se restaura la estructura molecular del antígeno y se recupera la inmunoreactividad (de Dios y Acosta, 2018). Este procedimiento se puede llevar a cabo a través de varios métodos, de los que el más común es la recuperación antigénica inducida por calor; aunque también se puede realizar mediante digestión enzimática, o mediante una combinación de ambas (Vaquero, 2007; de Dios y Acosta, 2018). La recuperación antigénica inducida por calor puede realizarse en microondas, baño térmico, olla a presión, cámara de presión Pascal, etc. Una vez realizada la recuperación, se procede a dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente con el objetivo de que las proteínas recuperen su estructura secundaria y terciaria para que puedan ser reconocidas por el anticuerpo primario (de Dios y Acosta, 2018).

En este punto, ya es necesario realizar el marcaje inmunohistoquímico, lo que significa que, para visualizar el lugar donde se produce la unión antígeno-anticuerpo, es preciso emplear un marcador. Para ello, se pueden usar distintas soluciones según el objetivo a alcanzar, además de “bañarse” las muestras en los anticuerpos que requiera la tinción específica que se esté realizando.

Ya en último lugar, se procede a la deshidratación de las muestras marcadas, que se realiza con la ayuda de etanol en distintas concentraciones y xilol. Una vez deshidratadas ya se pueden montar las muestras para proceder a la visualización de las mismas a microscopio óptico.

2.6- C-kit en el diagnóstico y clasificación de los tumores testiculares del perro

KIT, también denominado CD117, es una proteína transmembrana. Se trata de una proteína que actúa como receptor de la tirosin-kinasa, y que se codifica a partir del protooncogén c-kit.

Se expresa en una gran variedad de tejidos y constituye un mediador de efectos biológicos pleiotrópicos a través de su ligando, que es el factor de células madre (SCF) (Sattler y Salgia, 2004). La interacción entre el receptor KIT y el factor de células madre SCF es esencial para el desarrollo, proliferación y maduración de tipos celulares variados, como los mastocitos y las células germinales (Goddard *et al.*, 2007). Las células germinales primordiales (PCG) expresan el receptor KIT y migran desde el ectodermo embrionario hasta el intestino posterior, donde empiezan a proliferar. Después, alcanzan el esbozo testicular embrionario donde interactúan con las células de Sertoli, que expresan el factor de células madre, conduciendo a una diferenciación de las células germinales primordiales hasta gonocitos. Éstos, antes del nacimiento se diferencian a pre-espermatogonias. Durante la pubertad y la vida adulta la interacción entre el factor de células madre y el receptor KIT lleva a la diferenciación de las pre-espermatogonias a espermatogonias de tipo A y B (Grieco *et al.*, 2010).

Sin embargo, el receptor KIT no es el único marcador para evidenciar las células germinales primordiales, ya que muchos estudios han concluido a través de técnicas inmunohistoquímicas que otro marcador fiable es la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP, por su nombre en inglés *placental alkaline phosphatase*) (Grieco *et al.*, 2008). Sin embargo, la expresión de PLAP solamente se evidencia hasta la etapa de pre-espermatogonia (Rajpert-De Meyts *et al.*, 2003).

El factor de células madre y c-Kit se han relacionado en muchas alteraciones neoplásicas hematológicas y no hematológicas. Se ha podido demostrar la activación de mutaciones del receptor KIT en neoplasias gastrointestinales estromales, y en otros tumores se ha sugerido que la producción del factor de células madre de origen autocrino ha conducido a la expansión clonal de células que expresan el c-kit (Sattler y Salgia, 2004).

En el diagnóstico humano, la técnica inmunohistoquímica para evidenciar KIT y PLAP se usa para distinguir entre los seminomas clásicos y los seminomas espermatocíticos. El seminoma clásico expresa ambos marcadores, mientras que el espermatocítico no expresa ninguno de los dos (Dekker *et al.*, 1992; Cummings *et al.*, 1994). Esto indica que el seminoma clásico deriva de células germinales en estados precoces de maduración, mientras que el seminoma espermatocítico proviene de células más maduras donde la expresión de ambos antígenos está desapareciendo (Grieco *et al.*, 2010).

En la especie canina también se ha descrito la expresión de PLAP en los seminomas (Grieco *et al.*, 2007). Un estudio de Grieco *et al.* de 2010 concluyó que en perros, al igual que en los humanos, el receptor KIT no se expresa en las células de Sertoli, aunque sí que lo hace en espermatogonias y células de Leydig. Este mismo estudio afirma que la coexpresión de PLAP y

KIT define un seminoma clásico en perros. Por su parte, otro estudio (Hohsteter *et al*, 2014) llegó a la misma conclusión, y además afirmó que la diferenciación inmunohistoquímica entre los dos tipos de seminoma puede ser clínicamente importante teniendo en cuenta el comportamiento de ambas neoplasias en humanos, siendo en éstos más agresivo el seminoma clásico c-kit positivo.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Es muy frecuente que al buscar información sobre neoplasias testiculares caninas aparezcan artículos y trabajos muy específicos, en los que las características más básicas de estos tumores no se explican. Por otra parte, al recopilar la información a partir de libros de veterinaria específicos, ocurre exactamente lo contrario, obteniéndose datos demasiado generales sobre tumores y poco específicos sobre tumores testiculares.

Es por los motivos citados que el principal objetivo de este trabajo es la ampliación de conocimientos acerca de los tumores testiculares del perro, así como realizar una recopilación de los aspectos que los caracterizan a partir de la revisión de la bibliografía. Se pretende sintetizar en un mismo trabajo aspectos clave de las neoplasias testiculares caninas, como la incidencia, los tipos tumorales más frecuentes, los factores que influyen en su aparición, sus características clínicas y anatomopatológicas más destacadas, etc.

A su vez, este trabajo también ha pretendido abordar un aspecto muy concreto de los seminomas, que es la positividad o negatividad a un marcador denominado c-kit y describir sus características y utilidad de forma sencilla y práctica. Así pues, el trabajo se complementa con los resultados de pruebas inmunohistoquímicas sobre un grupo de seminomas que servirán de soporte a esta explicación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado gestores bibliográficos tales como el PubMed para la búsqueda de información científica relativa a los tumores testiculares del perro.

El estudio sobre casos concretos se ha realizado utilizando un determinado número de tumores testiculares diagnosticados en el servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, tanto de muestras de tejido obtenidos

tras la extirpación quirúrgica como de necropsias practicadas a cadáveres de perros recibidos en el Servicio.

Se seleccionaron 48 muestras tumorales que se hallaban incluidas en bloques de parafina, de las que se obtuvieron cortes de 3-4 micras de espesor, que fueron teñidas con la técnica de hematoxilina eosina, que se describe brevemente a continuación:

1. Desparafinado: inmersión en Xilol durante 10 minutos (2 veces).
2. Hidratación:
 - Inmersión en Etanol 100º durante 10 minutos (2 veces).
 - Inmersión en Etanol 96º durante 10 minutos.
 - Inmersión en Etanol 80º durante 10 minutos.
 - Inmersión en agua destilada durante 10 minutos.
3. Tinción:
 - Inmersión en Hematoxilina durante 3 minutos.
 - Inmersión en agua corriente durante 15 minutos.
 - Inmersión en agua destilada durante 10 minutos (2 veces).
 - Inmersión en Eosina durante 30 segundos.
 - Inmersión en Etanol 80º durante 15 segundos.
4. Deshidratación:
 - Inmersión en Etanol 96º durante 30 segundos.
 - Inmersión en Etanol 100º durante 5 minutos.
 - Inmersión en Etanol 100º durante 10 minutos.
 - Inmersión en Xilol durante 10 minutos (2 veces).
5. Montaje de las muestras mediante un medio de montaje (pegamento) y el cubreobjetos.
6. Dejar secar la preparación y observación al microscopio.

Una vez observadas las muestras teñidas con la técnica hematoxilina eosina al microscopio óptico se procede a seleccionar 12 seminomas para realizar la técnica inmunohistoquímica sobre ellos, y así poder determinar si son de tipo espermatocítico o de tipo clásico.

En este trabajo, para la realización de la técnica inmunohistoquímica, se ha utilizado un anticuerpo policlonal de c-kit. El protocolo utilizado ha sido el siguiente:

1. Desparafinar las muestras:

- 5 minutos en Xilol
- 5 minutos en Xilol
- 5 minutos en Etanol al 99%
- 3 minutos en Etanol 96%
- 3 minutos en Etanol al 70%
- 5 minutos en Agua destilada

2. Liberación del antígeno:

- Encender la máquina Peteling para precalentar a 85°C (operación que dura unos 20 minutos aproximadamente).
- Preparar las cubetas con el líquido de pH alto, que es el que se precisa para c-kit.
- Alcanzados los 85°C se introducen las muestras y se incuban a 96°C durante 20 minutos.
- Terminado el proceso de incubación a 96°C se retiran las muestras de la máquina de Peteling y se sumergen durante 5 minutos en una solución de lavado.

3. Preparación del teñidor automático:

- Abrir el programa del ordenador y configurarlo. Éste calculará los volúmenes necesarios y la posición de cada producto dentro de la máquina.
- Las soluciones a preparar con el volumen determinado por el ordenador son:
 - Agua oxigenada
 - DAB+ (LiquidDAB+substrate Chromogen System®). Es un reactivo que bloquea la peroxidasa del anticuerpo secundario produciendo un cambio de color hacia marrón. Es preciso diluir este reactivo en la siguiente proporción: 1 mL de buffer/1 gota de DAB+.
 - Hematoxilina. Se añade para conseguir un mejor contraste con el DAB+.
 - Anticuerpo c-kit primario. En este caso se ha diluido el anticuerpo c-kit a una dilución de 1/400, utilizando como diluyente DakoReal Antibody Diluent®.
 - Anticuerpo secundario (Darko Envision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit®). Este anticuerpo, por una parte detecta el anticuerpo primario y por otra parte elimina la peroxidasa endógena (puesto que

el anticuerpo secundario está marcado con peroxidasa, que actuará como ligando del DAB+).

- Colocar las muestras en el teñidor automático y mantenerlas mojadas con solución de lavado.
4. Iniciar el protocolo de tinción (iniciar el programa):
 - 5 minutos en bloqueante de la Peroxidasa (agua oxigenada).
 - 30 minutos con el anticuerpo primario.
 - 30 minutos con el anticuerpo secundario.
 - 5 minutos con DAB+.
 - 5 minutos con hematoxilina.
 5. Terminada la tinción, sacar las muestras de la máquina y sumergirlas en agua destilada.
 6. Deshidratar las muestras:
 - 10 inmersiones en Etanol al 70%.
 - 10 inmersiones en Etanol al 96%.
 - 10 inmersiones en Etanol al 99%.
 - 10 inmersiones en Xilol.
 - 10 inmersiones en Xilol.
 7. Escurrir el Xilol del portaobjetos con la muestra teñida. Montar las muestras echando una gota de PBX (pegamento) en un cubreobjetos, acercando el portaobjetos al cubreobjetos para que el pegamento se pose lentamente hasta cubrir todo el cubreobjetos. Retirar las posibles burbujas que hayan quedado entre el portaobjetos y el cubreobjetos y dejar secar durante 10 minutos.
 8. Observar al microscopio. Se observa en un microscopio Zeiss con objetivos de x5, x10, x20, x40, x63.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los casos a estudiar en el trabajo fueron en total 48, de los cuales 23 son tumores de células de Leydig, 17 son seminomas, y 8 son tumores de células de Sertoli. Así pues, la proporción en este estudio es de: 48% tumores de células de Leydig, 35,5% seminomas, y 16,5% tumores de células de Sertoli.

Estos casos proceden de biopsias y necropsias remitidas desde diferentes clínicas y el Hospital Veterinario de la Facultad al Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico. Se tomó una muestra representativa de los casos analizados entre los años 2010 y 2017.

Las siguientes tres tablas (una para cada tipo tumoral: tumor de células de Leydig, seminoma y tumor de células de Sertoli) muestran la raza y la edad de los perros de los que fueron estudiados los tumores, así como las observaciones de algunos de los casos.

TUMORES DE CÉLULAS DE LEYDIG (TCL)				
REFERENCIA	RAZA	EDAD	TIPO DE TUMOR	OBSERVACIONES
1	Mestizo	12 años	TCL quístico	
2	Desconocida	Desconocida	TCL	
3	Husky Siberiano	11 años	TCL	
4	Schnauzer	12 años	TCL	
5	Pastor Alemán	10 años	TCL	Quistes prostáticos
6	Westie	14 años	TCL	El otro testículo presenta un Seminoma
7	Golden Retriever	14 años	TCL	
8	Westie	8 años	TCL	El otro testículo presenta un TCS
9	Caniche mediano	13 años	TCL	
10	Mestizo	13 años	TCL	
11	Yorkshire	10 años	TCL	
12	Labrador Retriever	10 años	TCL quístico	
13	Cocker Spaniel	11 años	TCL	
14	Labrador retriever	13 años	TCL	El otro testículo presenta un Seminoma

15	Golden Retriever	11 años	TCL	El otro testículo presenta un Seminoma
16	Yorkshire	11 años	TCL	
17	Golden Retriever	13 años	TCL	
18	Shih-tzu	14 años	TCL	
19	Dálmata	11 años	TCL bilateral	
20	Golden Retriever	10 años	TCL	El otro testículo presenta un Seminoma
21	Cocker Spaniel	13 años	TCL	
22	Desconocida	13 años	TCL quístico	
23	Golden Retriever	12 años	TCL	

Esta primera tabla recoge los tumores de células de Leydig (TCL), 23 en total, y se puede observar que la media de la edad de presentación de este tipo tumoral es de unos 11 años y medio (11,7 años de edad). También se aprecia que una de las razas que presentan este tipo de tumor más frecuentemente es el Golden Retriever (5 perros de los 23 estudiados). En cuatro de los casos el testículo contralateral presentaba un Seminoma, y en uno de los casos presentaba un tumor de células de Sertoli (TCS).

SEMINOMAS				
REFERENCIA	RAZA	EDAD	TIPO DE TUMOR	OBSERVACIONES
24	Cocker Spaniel	12 años	Seminoma difuso	
25	Cocker Spaniel	18 años	Seminoma	
26	Pomerania	11 años	Seminoma intratubular	
27	Husky Siberiano	12 años	Seminoma difuso	
28	Schnauzer gigante	10 años	Seminoma	

29	Westie	13 años	Seminoma intratubular	El otro testículo presenta un TCL
30	Mestizo	13 años	Seminoma	
31	Labrador Retriever	13 años	Seminoma	El otro testículo presenta un TCL
32	Bóxer	13 años	Seminoma bilateral	
33	Mestizo	13 años	Seminoma	
34	Golden Retriever	11 años	Seminoma	El otro testículo presenta un TCL
35	Chihuahua	14 años	Seminoma	
36	Golden Retriever	10 años	Seminoma	El otro testículo presenta un TCL
37	Cocker Spaniel	14 años	Seminoma	
38	Schnauzer	13 años	Seminoma difuso	
39	Cocker Spaniel	5 años	Seminoma	
40	Golden Retriever	12 años	Seminoma	

En esta segunda tabla se recogen los seminomas estudiados, un total de 17 tumores, en los que se observa que la media de la edad de presentación es de unos 10 años y medio (10,7 años de edad). También se puede comprobar que la raza que más veces lo presenta en esta colección de casos fue el Cocker Spaniel (4 perros de los 17 estudiados), seguido del Golden Retriever (3 perros de los 17 estudiados). También se describen 4 casos en los que en el testículo contralateral se presentó un tumor de células de Leydig (TCL).

TUMORES DE CÉLULAS DE SERTOLI (TCS)				
REFERENCIA	RAZA	EDAD	TIPO DE TUMOR	OBSERVACIONES
41	Mestizo	9 años	TCS	
42	Westie	8 años	TCS	El otro testículo presenta un TCL
43	Mestizo	4 años	TCS intratubular	
44	Yorkshire	Desconocida	TCS intratubular	

45	Mestizo de Pastor Alemán	9 años	TCS	
46	Pastor Alemán	15 años	TCS	
47	Boxer	7 años	TCS	
48	Bulldog Inglés	7 años	TCS	

En la última tabla se recogen los tumores de células de Sertoli, 8 en total. La media de edad de presentación en este caso es de 8 años y medio (8,4 años de edad), por lo que es la media de edad de presentación más baja de entre los 3 tipos tumorales. Además, en un caso concreto (caso 43), apareció un tumor en un perro de 4 años, lo que es muy infrecuente. Por otro lado, en solamente un caso apareció un tumor de células de Sertoli asociado a un tumor de células de Leydig en el testículo contralateral.

A continuación se realiza el estudio de los informes anatomopatológicos de cada uno de los tumores incluidos en este trabajo, y a partir de los cuales se pueden obtener los rasgos más característicos y más observados en el estudio de cada uno de los tipos tumorales.

5.1-Tumor de células de Leydig

Como se ha explicado anteriormente, se han estudiado 23 casos de tumores de células de Leydig en este trabajo, y a partir del examen de las preparaciones histopatológicas de dichos casos se resumen las características más significativas tanto macro como microscópicamente que permiten identificar este tipo tumoral.

Macroscópicamente se observa como un nódulo intraparenquimatoso de reducido tamaño, en torno de 1-2 cm de diámetro aproximadamente, de forma redondeada y bien aislado del tejido adyacente (Fig. 6). La consistencia suele ser firme, con hendiduras y espacios huecos de distintos tamaños. A la sección se suele observar un color grisáceo, gris claro o blanquecino. Alguno de estos tumores presenta formaciones quísticas que contienen sangre bien visible en la superficie de corte (Figs. 7 y 8). El crecimiento de la zona afectada suele tener una evolución de varios meses.

Microscópicamente, se caracteriza por estar constituido por células de morfología poligonal o redondeada, con un núcleo central y un citoplasma eosinófilo y vacuolizado (Fig. 9). Dichas vacuolas suelen presentar un contenido lipídico en su interior (Fig. 9). Los núcleos pueden presentar tamaños más o menos homogéneos, o bien puede observarse anisocariosis, es decir la presencia de tamaños nucleares diferentes en el mismo tumor. Asimismo, los núcleos

también pueden ser tanto hipercromáticos como normocromáticos. En la gran mayoría de estos tumores se pueden observar nucléolos en las células neoplásicas. Generalmente el número de mitosis que se puede observar es escaso, y no se observan zonas de necrosis. En el estroma del tumor aparecen gran cantidad de vasos sanguíneos, que en algunos casos pueden aparecer con coagulación y abundantes redes de fibrina. Algunos tumores presentan formaciones quísticas de tamaños y formas variables limitados por filas de células tumorales a modo de revestimiento epitelial (Fig. 10). Los quistes contienen en su mayoría sangre, que en ocasiones aparece coagulada (Fig. 10). Las características descritas configuran el tipo de Tumor de Leydig denominado quístico o angiomatoide (Fig. 10). El tumor, en la mayor parte de los casos, está bien delimitado por una cápsula rica en fibras colágenas, y en ningún caso se observa invasión tumoral de vasos sanguíneos y linfáticos.

5.2-Seminoma

De este tipo tumoral se han estudiado 17 casos, a partir de los cuales se han agrupado los hallazgos que los caracterizan macroscópica y microscópicamente.

Desde el punto de vista macroscópico se observan que el testículo afectado muestra un marcado aumento de tamaño (Fig. 3), un crecimiento más o menos lento, una consistencia firme, y que a la sección presentan una coloración blanquecina homogénea (Fig. 3), que puede tener, en la zona central, un aspecto hemorrágico en algunos casos. La masa tumoral está, en todos los casos, bien delimitada (Fig. 3) con respecto al tejido testicular normal por una fina cápsula conjuntiva.

Microscópicamente, se observa un acúmulo denso de células de morfología poligonal, con citoplasma claro eosinófilo, con los núcleos redondeados, hipocromáticos y de tamaños variables (Fig. 4). En todos los casos los nucléolos son muy evidentes, pudiendo hallarse de 1 a 4 por cada núcleo. En algunas zonas de la neoplasia se observan zonas con células gigantes multinucleadas, y el número de mitosis es elevado, además de ser algunas de ellas de aspecto atípico (Fig. 4). Solamente en un caso se observa que el número de mitosis es escaso. El tumor presenta ciertas zonas con infiltrados linfocitarios multifocales predominantemente perivasculares (Fig. 5), además de algunas áreas de hemorragias y formación de estructuras quísticas. No se suele observar la presencia de células tumorales en vasos sanguíneos y linfáticos, aunque en un caso aparecen algunas células tumorales aisladas en un vaso sanguíneo.

5.3-Tumor de células de Sertoli

Se han estudiado 8 casos de tumores de células de Sertoli, en los que macroscópicamente se observaban los testículos tumorales con forma multinodular y de consistencia firme (Fig.1).

Microscópicamente se han observado tumores de células de Sertoli intratubulares y difuso, en los que las células se aprecian de mayor tamaño del normal y agrupadas en forma de empalizadas (Fig.2). Así, los grupos de células tumorales se distinguen por su forma de agrupación y una cierta vacuolización del citoplasma, aunque no tan marcada como en las células de Leydig. Su forma es más alargada y el núcleo es redondo y de tamaño moderado (Fig.2).

5.4-Resultados de la tinción inmunohistoquímica c-kit

Se han realizado 12 tinciones inmunohistoquímicas en 12 de los seminomas estudiados. La observación de las muestras teñidas al microscopio ha revelado la positividad de c-kit en 3 de los 12 tumores, aunque no de forma muy marcada. La positividad, en este caso, determina que el seminoma es de tipo clásico, mientras que la negatividad determina el tipo espermatocítico.

La positividad se demuestra con la aparición de un color dorado-marronáceo en la preparación, que está teñida de forma normal con un color azulado (Fig.12).

6. CONCLUSIONES

- Pueden presentarse varios tipos tumorales en el testículo del perro, pero los tres más frecuentes son el tumor de células de Leydig, el tumor de células de Sertoli y el Seminoma.
- Los tres factores principales que influyen en la presentación de tumores testiculares son: la edad, la posición anatómica de los testículos y la raza.
- En el trabajo realizado, en cuanto la incidencia de los tres tipos de tumores testiculares, la mayor es la correspondiente a los tumores intersticiales de Leydig, seguida de los seminomas, y siendo la de menor incidencia la relativa a los tumores de las células de Sertoli; datos que coinciden a grandes rasgos con lo expresado por varios trabajos previos.
- En el estudio realizado la edad de presentación es elevada en los perros afectados de tumores de células Leydig y Seminomas, siendo apreciablemente inferior la de los perros afectados de tumores de células de Sertoli.

- La raza en la que con mayor incidencia se han descrito tumores de células de Leydig es el Golden Retriever, en los Seminomas el Cocker Spaniel y en el tumor de células de Sertoli es el Pastor Alemán.
- La utilización de marcadores tumorales para el diagnóstico de tumores está creciendo significativamente en los últimos años.
- La realización de técnicas inmunohistoquímicas para la categorización de tumores es cada vez más frecuente, y tiene una aplicación directa en la clasificación de los Seminomas en el caso de los perros.
- En 3 de los 12 seminomas estudiados se observó positividad al uso de marcadores c-kit. Este marcador es una herramienta diagnóstica útil para la clasificación de los seminomas tanto en humanos como en perros.

6. CONCLUSIONS

- Several types of tumors may appear in the dog's testicle, but the three most frequent are the Leydig cell tumor, the Sertoli cell tumor and the Seminoma.
- The three main factors that influence the presentation of testicular tumors are: age, anatomical position of the testicles and race.
- In the work done, the incidence of the three main types of testicular tumors is the highest corresponding to interstitial Leydig tumors, followed by Seminomas, and with the lowest incidence the Sertoli cell tumors. This data broadly coincide with that expressed by several previous works.
- In the study performed, the age of presentation is high in dogs affected by Leydig tumors and Seminomas, being significantly lower on dogs affected by Sertoli cell tumor.
- The races with the highest incidence of Leydig cell tumors are the Golden Retriever, in Seminomas the Cocker Spaniel, and in the Sertoli cell tumor is the German Shepherd.
- The use of tumor markers for the diagnosis of tumors is growing significantly in recent years.
- The performance of immunohistochemical techniques for the categorization of tumors is increasingly frequent, and they have a direct application in the classification of seminomas in the case of dogs.
- In 3 of the 12 Seminomas studied, the use of c-kit marker was positive. This marker is a useful diagnostic tool for the classification of Seminomas in both humans and dogs.

7. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido muy beneficiosa para mí. En primer lugar me ha permitido ampliar los conocimientos con los que partía sobre los tumores testiculares, lo cual me ha aportado una gran satisfacción por el interés que tengo sobre este tema. Además, me ha permitido conocer nuevas técnicas diagnósticas como los procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos y llevarlas a cabo, que hasta antes de realizar el trabajo apenas conocía, lo que me ha llevado a pensar en la multitud de aplicaciones que pueden tener en muchos campos. También me ha servido para practicar en la visualización de preparaciones al microscopio, lo que ha sido muy útil porque me ha permitido refrescar conocimientos y ampliarlos.

Por último, debo agradecer a mis tutores Juan José Badiola y María Antonia Vargas su implicación y esfuerzos para facilitarme el trabajo, sus consejos y aportaciones, así como las dudas que me han resuelto. Asimismo debo agradecer a todos los integrantes del Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico su amabilidad y generosidad permitiéndome usar sus instalaciones y aportándome los casos de su archivo para poder realizar este trabajo. Por último agradecer a Bernardino Moreno su ayuda con la realización de la técnica inmunohistoquímica y su implicación en mi trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, M. C., Plaza, L., González, R. 2015. Anatomía patológica y citología. Ed. Formación Alcalá. **7**: 17-44.

Campuzano, M. G. 2010. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. *Med. & Lab.* **16**: 9-10.

Cummings, O. W., Ulbright, T. M., Eble, J. N., Roth, L. M. 1994. Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. *Hum. Path.* **25**: 54-59.

Dekker, I., Rozeboom, T., Delemarre, J., Dam, A., Oosterhuis, J. W. 1992. Placental-like alkaline phosphatase and DNA flow cytometry in spermatocytic seminoma. *Cancer.* **69**: 993-996.

De Dios, M., Acosta, G. Guía de inmunohistoquímica para técnicos. 2018. *Inst. Nac. Cáncer.* **1**: 7-21.

Dahaliwal, R. S., Kitchell, B. E., Knight, B. L., Schmidt, B. R. 1999. Treatment off aggressive testicular tumors in four dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **35**: 311-318.

Dellman, H. D. (1994) Histología veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza. 314-340.

- Goddard, N. C., McIntyre, A., Summersgill, B., Gilbert, D., Kitazawa, S. 2007. KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *Int. J. Androl.* **30**: 337-349.
- González, C. G., Morales, S. E. 1997. Estudio comparativo de neoplasias testiculares en el hombre y el perro. *Vet. Mex.* **28** (2): 169-174.
- Grieco, V., Banco, B., Giudice, C., Mosca, F., Finazzi, M. 2010. Inmunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. *J. Comp. Path.* **142**: 213-217.
- Grieco, V., Riccardi, E., Greppi, G. F., Teruzzi, F., Iermano, V. y Finazzi, M. 2008. Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *J. Comp. Pathol.* **138**: 86-89.
- Grieco, V., Riccardi, E., Rondena, M., Ciampi, V., Finazzi, M. 2007. Classical and spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. *J. Comp. Path.* **137**: 41-46.
- Grieco, V., Riccardi, E., Veronesi, M. C., Giudice, C., Finazzi, M. 2008. Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog. *Theriogenology*. **70**: 53-60.
- Harvey, R. G., McKeever, P. J. 2009. Enfermedades de la piel en perro y gato. Ed. Grass. Buenos Aires. 184-186.
- Hermida, I., Sánchez, E., Nerín, C., Cordero, R., Mora, I., Pinar, J. 2016. Marcadores tumorales. *Rev. Clin. Med. Fam.* **9** (1): 31-42.
- Hohsteter, M., Artukovic, B., Severin, K., Kurlj, A. G., Beck, A., Sostaric-Zuckermann, I. C., Grabarevic, Z. (2014) Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. *BMC Vet. Res.* **10**: 169.
- Kohler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256** (5517): 495.
- 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. *J. Vet. Med. Science*. **71**: 919-923.
- Looijenga, L. H. J., Olie, R. A., Gaag van der, I., Sluijs van, F. J., Matoska, J., Ploem-Zaaijer, J., Jnepflé, C., Oosterhuis, J. W. 1994. Seminoma of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men. *Lab. Inv.* **74**: 490-496.
- Merchant, S. R. 2005. The skin as a sensor of internal medical disorders. In: Ettinger SJ. & Feldman EC: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ed. Saunders. Ottawa. 32-34.

- Mialot, M. Tumores de los aparatos genitales en los dos sexos. Sarcoma de Sticker. 2012. *Vang. Vet.* **9** (51): 26 – 44.
- Misdorp, W. 1996. Veterinary cancer epidemiology. *Vet. Quarterly.* **18** (1): 32-36.
- Moreno, G., Vázquez, J., Arce, J. 2012. Criptorquidia canina. *Vang. Vet.* **9** (54): 24-28.
- Meuten, D.J. 2017. Tumors of the genital systems. *In: Tumors of domestic animals.* Fift Edition. Ed.Wiley Blackwell. Ames. Iowa. 689-722
- Nielsen, S. W., Lein, H. 1974. Tumors of the testis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **50**: 71-78.
- Nieto, J. M., Pizarro, M., Fontaine, J. J. 1989. Tumeurs testiculaires du chien. Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques. *Rec. Med. Vét.* **165**: 449-453.
- Nodtvedt, A., Gamlem. H., Gunnes G., Grotmol, T., Indrebo, A., Moe, L. 2010. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. *Vet.-Comp. Oncol.* **9** (1): 45-54.
- North, S., Banks, T. 2009. Tumors of the urogenital tract. *In: Small Animall Oncology.* Ed. Saunders Elsevier. New York. 151-171.
- Okjin, K., Kyung-Suk, K. 2005. Seminoma with hyperestrogenemia in a Yorkshire Terrier. *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 121-123.
- Osborn, M., Weber, K. 1983. Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* **48**: 372-394.
- Patnaik, A. K., Mostofi, F. K. 1993. A clinicopathologic, histologic and inmunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 dogs. *Vet. Path.* **30** (3): 287-295.
- Planellas, M., Martinez, I., Peña, M., Pastor, J. 2007. Síndrome de feminización de un perro con un tumor testicular de células de Sertoli. *Clin. Vet. Peq. Anim.* **27** (2): 109-113.
- Rajpert-De Meyts, E., Bartkova Jirina Samson, M., Hoei-Hansen, C. E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J. 2003. The emerging phenotype of testicular carcinoma in situ germ cell. *Act. Path. Micro. Inmuno.* **111**: 267-279.
- Sattler, M., Salgia, R. 2004. Targetinc c-Kit mutations: basic science to novel therapies. *Leuk. Res.* **28** (Supl.1): 11-20.
- Theilen, G. H., Madewell, B. R. 1979. Tumors of the urogenital tract. *In: Veterinary Cancer Medicine.* Ed. Lippincott Williams and Wikins. Philadelphia. 367-373.

Vaquero, M. 2007. Manual de calidad de inmunohistoquímica en anatomía patológica. Osakidetza. 5-14.

9. ANEXOS

Fig. 1. Aspecto macroscópico de un tumor de células de Sertoli

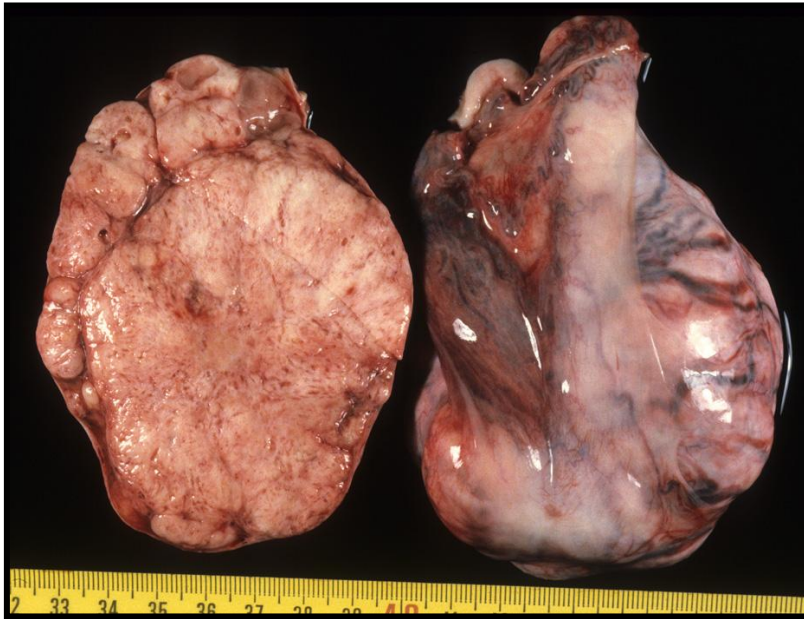


Fig. 2. Aspecto microscópico de un tumor de células de Sertoli (x200)

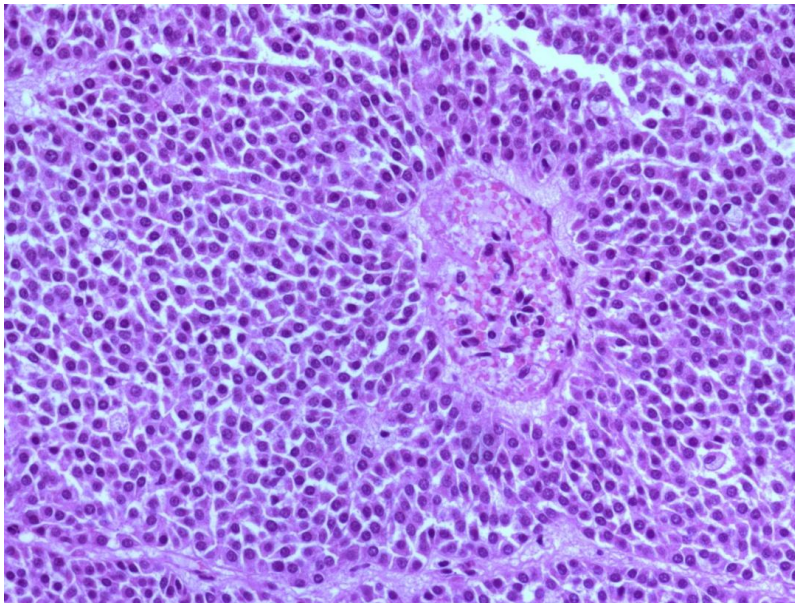


Fig. 3. Aspecto macroscópico de un Seminoma.



Fig. 4. Aspecto microscópico de un Seminoma (x400)

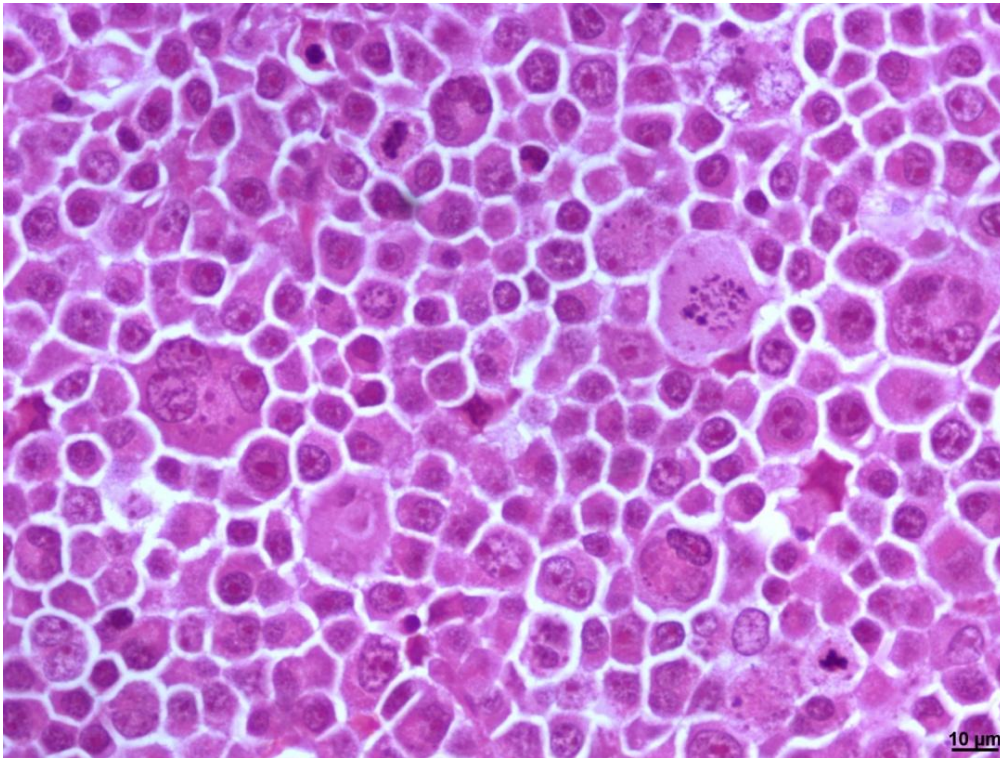


Fig. 5. Aspecto microscópico de un Seminoma con el infiltrado inflamatorio típico (x200).

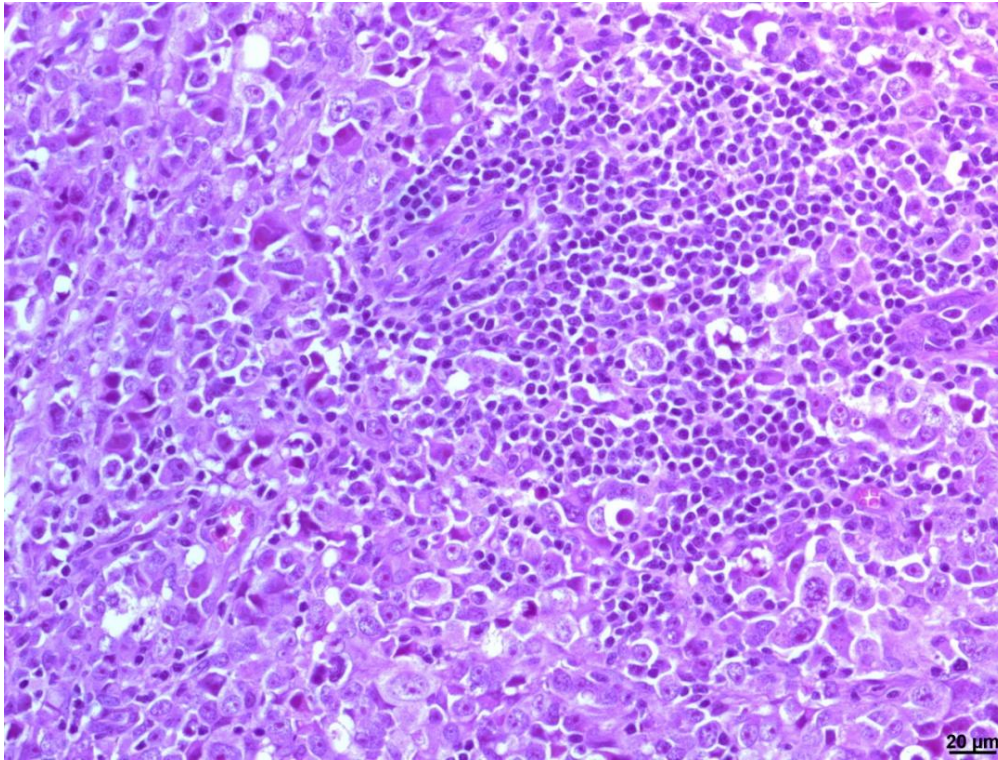
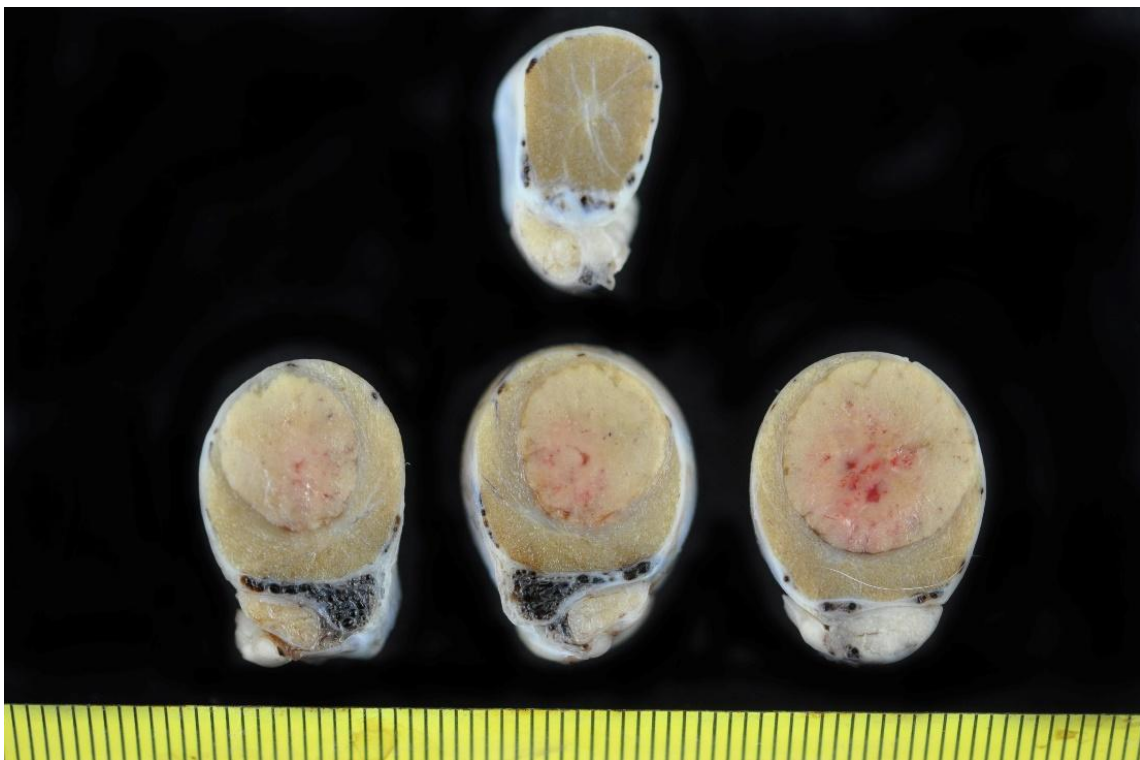


Fig. 6. Aspecto macroscópico de un tumor de células de Leydig (las tres imágenes de abajo). La de arriba corresponde a la superficie de corte de un testículo sin tumor, aunque atrófico.



Figs. 7 (izquierda) y 8 (derecha). Aspecto macroscópico de un tumor de células de Leydig de tipo quístico o angiomatoso.

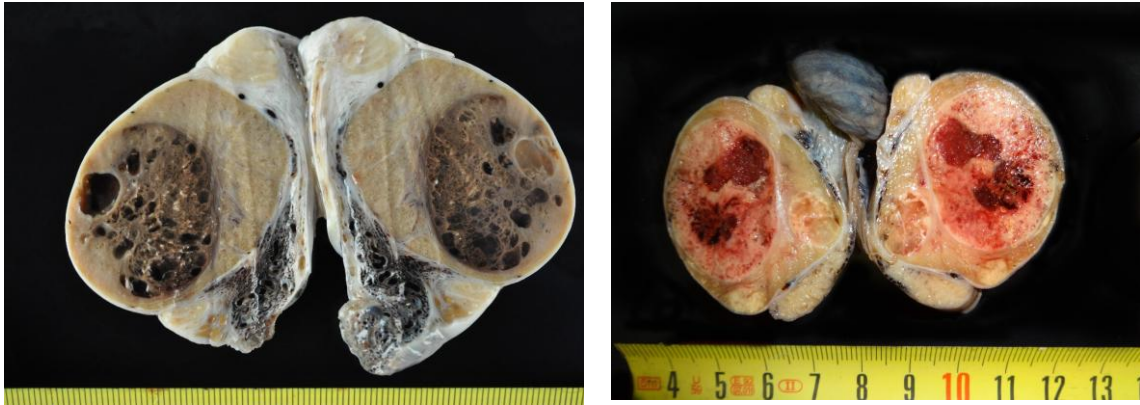


Fig. 9. Aspecto microscópico de un tumor de células de Leydig con abundante vacuolización (x100).

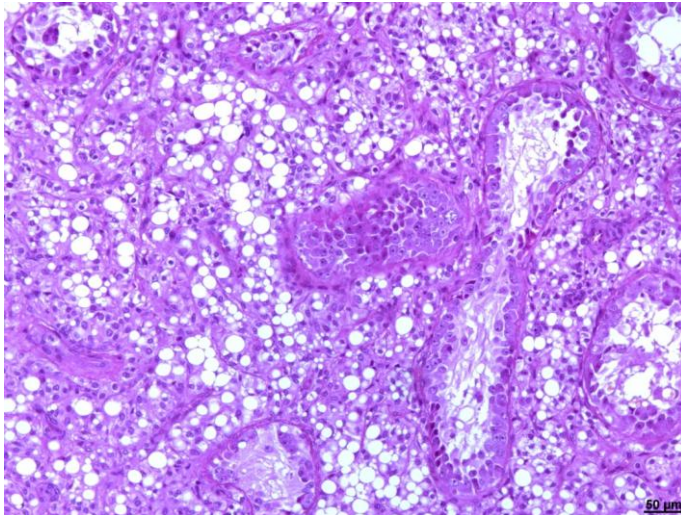


Fig. 10. Aspecto microscópico de un tumor de células de Leydig angiomatoso con abundantes espacios quísticos y algunas hemorragias (x50).

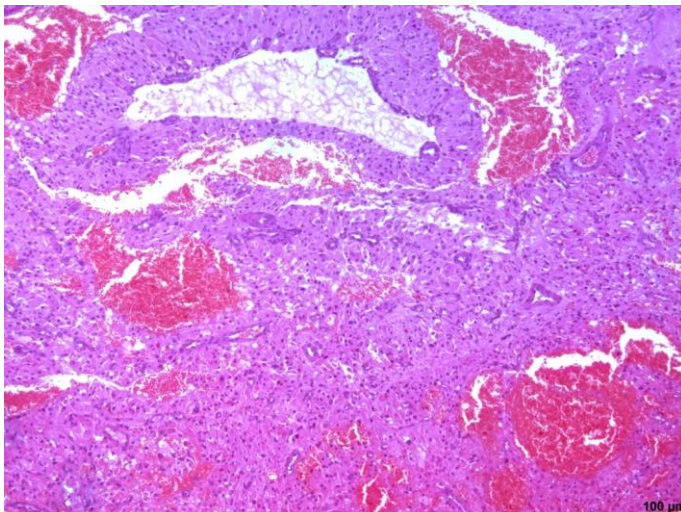


Fig. 11. Aspecto microscópico de un tumor mixto Seminoma-Células de Sertoli (x200).

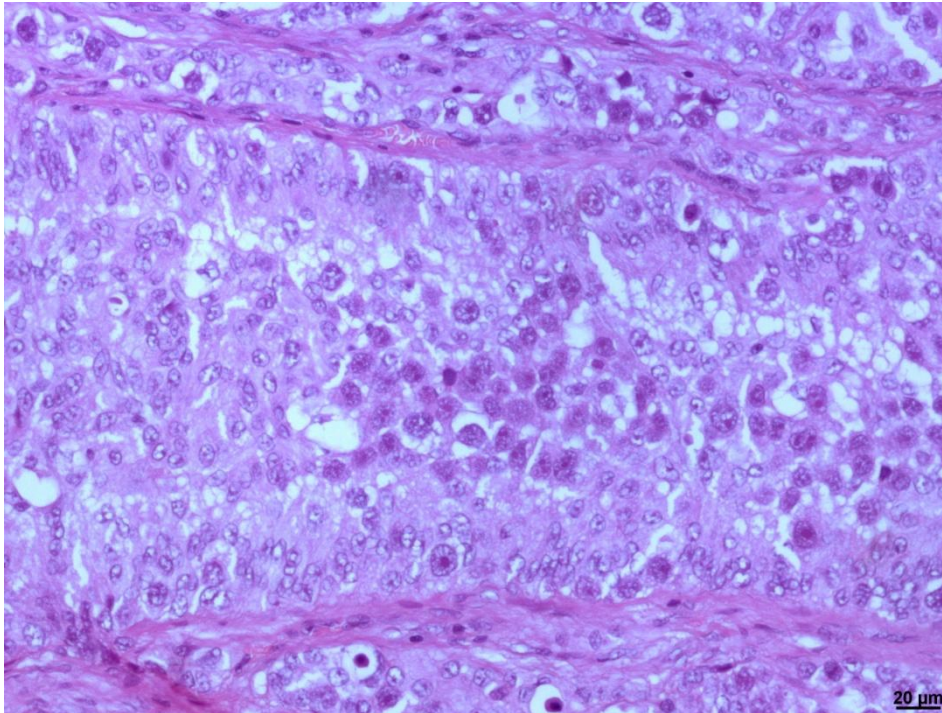


Fig. 12. Seminoma positivo a la tinción inmunohistoquímica con c-kit (x200).

