



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

ESTUDIO DE MARCADORES PARA NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR
(PLAP Y C-KIT) EN NIÑOS CON ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACION SEXUAL
(DISGENESIA GONADAL, INSENSIBILIDAD A ANDROGENOS
Y DESORDEN DE LA DIFERENCIACION SEXUAL OVOTESTICULAR)

T R A B A J O D E T E S I S

Q U E P R E S E N T A :

DRA. YADIRA EUGENIA PASTRANA FERNANDEZ

P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E :

SUBESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA

TUTOR DE TESIS: DRA. GABRIELA BRAUN-ROTH

COTUTORES DE TESIS: DRA. MARIA DE LA LUZ RUIZ REYES

DR. RAUL CALZADA LEON



MEXICO, D.F.

JULIO DE 2008

T E S I S

**ESTUDIO DE MARCADORES PARA NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR
(PLAP Y C-KIT) EN NIÑOS CON ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL
(DISGENESIA GONADAL, INSENSIBILIDAD A ANDROGENOS
Y DESORDEN DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL OVOTESTICULAR)**

DIRECTOR DE ENSEÑANZA:

DR. JOSÉ N. REYNES MANZUR

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO:

DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

DR. CARLOS ROBLES VALDÉS

TUTOR DE TESIS:

DRA. GABRIELA BRAUN-ROTH

COTUTORES DE TESIS

DRA. MARÍA DE LA LUZ RUIZ REYES

DR. RAÚL CALZADA LEÓN

MÉXICO, D.F. A JULIO 2008

ÍNDICE

	Página No.
1. Resumen	1
2. Marco Teórico	4
2. Justificación	12
3. Pregunta de Investigación	12
4. Objetivos	12
5. Hipótesis	12
6. Tipo de Estudio	12
7. Material y Métodos	13
8. Variables de Estudio	13
9. Operacionalización de Variables	14
10. Criterios de Inclusión y Exclusión	15
11. Plan de Análisis	15
12. Aspectos Éticos	15
13. Resultados	16
16. Discusión de Resultados	21
17. Conclusiones	23
18. Referencias Bibliográficas	25

ESTUDIO DE MARCADORES PARA NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR (PLAP Y C-KIT) EN NIÑOS CON ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (DISGENESIA GONADAL, INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS Y DESORDEN DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL OVOTESTICULAR).

Pastrana Fernández YE**, Braun-Roth G*, Ruiz Reyes ML **, Calzada León R**, De León Bojorge B*. Departamentos de Patología* y Endocrinología** Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud México, D.F.

CONTEXTO: La neoplasia germinal Intratubular (NGIT) es una lesión precursora y preinvasiva de la mayor parte de los tumores germinales. Aparece predominantemente en testículos con condiciones asociadas con un riesgo elevado para presentar tumores de células germinales tales como: gónadas disgenéticas, testículos contralaterales de pacientes con CA testicular, testículos criptorquídicos y en algunas alteraciones en la diferenciación sexual. El potencial maligno de la gónada disgenética es frecuente con una incidencia de neoplasia entre el 17 al 35%. La morfología de NGIT en el niño es difícil de interpretar, al contrario del adulto en el cual el diagnóstico de NGIT es obvio. El diagnóstico de NGIT se basa en hallazgos tanto morfológicos como inmunohistoquímicos. Existen algunas tinciones de inmunohistoquímica que son útiles para su diagnóstico entre algunas de ellas encontramos a la Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP) que es un marcador para células germinales, en ocasiones puede expresar células inmaduras normales durante el primer año de vida. El proto-oncogene C-KIT es también un marcador de NGIT, parece involucrarse con la migración y diferenciación de las células germinales primordiales y es también expresado en células germinales fetales tempranas. Se sugiere que tanto PLAP como C-KIT pueden ser indicadores útiles de NGIT en niños mayores de un año de edad, tanto en niños con testículos criptorquídicos como en gónadas disgenéticas, debido a que estos antígenos parecen disminuir en los testículos normales al incrementar la edad posnatal.

OBJETIVOS: 1) Determinar la frecuencia de positividad para PLAP y C-KIT en tejido gonadal de niños con alteración en la diferenciación sexual (Disgenesia Gonadal, Insensibilidad a los Andrógenos y Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular), 2) Evaluar la expresión de PLAP y C-KIT en gónadas de niños con alteración en la diferenciación sexual (Disgenesia Gonadal, Insensibilidad a los Andrógenos y Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular), con su cariotipo, la respuesta a estímulo hormonal con Hormona Gonadotropina Coriónica (HGC) y su presentación clínica y 3) Determinar si la expresión de PLAP y C-KIT son marcadores de neoplasia germinal intratubular en gónadas disgenéticas infantiles.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se estudiaron 15 casos del archivo el Departamento de Patología de pacientes con seguimiento en el Instituto Nacional de Pediatría a los que se les tomó biopsia gonadal o que fueron gonadectomizados, con los diagnósticos de Disgenesia Gonadal Mixta, Insensibilidad Parcial o Total a los Andrógenos y Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular. Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica (PLAP y C-KIT) en el tejido gonadal obtenido por gonadectomía o biopsia de pacientes con diagnóstico de alteración de la diferenciación sexual (Disgenesia Gonadal, Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular e Insensibilidad a los Andrógenos). Los hallazgos de inmunohistoquímica se analizaron por dos patólogos, la frecuencia y distribución de PLAP y C-KIT en el tejido gonadal, sin conocimiento de los datos clínicos. Se realizaron las correlaciones de los hallazgos con el diagnóstico integral del paciente, el cariotipo y la respuesta a estímulo hormonal en los casos en que se contaba con estos datos.

RESULTADOS: Se estudiaron 15 casos completos de pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual, de los cuales un caso fue de Disgenesia Gonadal Pura (6.66%), 5 casos de Disgenesia Gonadal Mixta (33.33%), 6 casos de Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular (40%) y 3 casos de Insensibilidad a los Andrógenos (20%), de los cuales se observaron que cuatro pacientes fueron

diagnosticados con presencia de gonadoblastoma (26.6%), tres de ellos con Disgenesia Gonadal Mixta (DGM) y uno con Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular (DDSOT). La edad promedio de los pacientes diagnosticados con gonadoblastoma fue de 45.75 meses (3.8 años) encontrándose en rango de edad desde los 5 hasta 146 meses de edad (5 meses-12 años 1 mes). Tres pacientes con Disgenesia Gonadal Mixta desarrollaron Gonadoblastoma, de los cuales dos tuvieron características de Neoplasia Germinal Intratubular en el estudio anatomopatológico. Sin embargo la positividad con PLAP fue muy leve en DGM, mientras que el C-KIT se observó con mayor positividad. En los pacientes con Insensibilidad a los Andrógenos la tinción con PLAP fue negativa en todas las gónadas y solo levemente positivas con C-KIT. La positividad con PLAP fue leve en pacientes con DDSOT y se observó solamente en tres pacientes.

CONCLUSIONES: Los resultados sugieren que la presencia de células positivas para PLAP y C-KIT en pacientes menores de un año, y de acuerdo a la dismadurez esperada para este grupo de edad es insuficiente para el diagnóstico de NGIT en pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual, ya que PLAP y C-KIT muestran expresión prolongada en gónadas disgenéticas y se expresan de manera normal en niños después del nacimiento.

PALABRAS CLAVE: Neoplasia Germinal Intratubular, PLAP, C-KIT, Disgenesia Gonadal, Insensibilidad a Andrógenos, Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular

MARKERS FOR INTRATUBULAR GERM CELL NEOPLASIA (PLAP AND C-KIT) IN CHILDREN WITH ABNORMAL SEXUAL DIFFERENTIATION (GONADAL DYSGENESIS, ANDROGEN INSENSIBILITY AND OVOTESTICULAR DSD)

CONTEXT: The Intratubular Germ Cell Neoplasia (ITGCN) is a precursor and preinvasive lesion of germinal tumors. It appears predominantly in testicles with associated conditions of elevated risk to present germinal cells tumors such as: dysgenetic gonads, contralateral testicles of patients with testicular carcinoma, cryptorchidic testicles and in some sexual differentiation abnormalities. The malignant potential of dysgenetic gonads is frequent with an incidence of neoplasia between 17 to 35%. The morphology of ITGCN in children is difficult to interpret unlike in the adult the diagnosis is obvious. The ITGCN diagnosis is based as much on morphologic findings as in immunohistochemical analysis. There are some immunohistochemical analyses that are useful for diagnosis of ITGCN as the placental alkaline phosphatase (PLAP) that is a marker for germinal cells, which some times can express normal immature cells during the first year of life. C-KIT proto-oncogene is also an ITGCN marker; it seems to detect cells in the process of migration and differentiation mainly in germinal cells and also in early fetal germinal cells. It is suggested that PLAP and C-KIT can be express in ITGCN in greater children than one year of age, in children with cryptorchidic gonads as in dysgenetic gonads, because these antigens seem to diminish in the normal testicles when increasing the postnatal age.

OBJECTIVES: 1) To determine the frequency of positivity of PLAP and C-KIT in gonads of children with abnormalities in sexual differentiation (Gonadal Dysgenesis, Androgen Insensibility and Ovotesticular DSD), 2) To correlate the expression of PLAP and C-KIT in gonads of children with abnormalities in the sexual differentiation (Gonadal Dysgenesis, Androgen Insensibility and Ovotesticular DSD), with caryotype, and with hormonal stimulus with Gonadotropin Chorionic Hormone (GCH) and the clinical presentation. 3) To determine if the expression of PLAP and C-KIT in infantile gonads are good immunohistochemical markers to diagnose ITGCN.

MATERIAL AND METHODS: Fifteen cases of children with diagnoses of Pure Gonadal Dysgenesis, Mixed Gonadal Dysgenesis, Partial or Total Androgen Insensibility and Ovotesticular DSD to whom gonadectomy or gonadal biopsy was taken, were studied at the Instituto Nacional de Pediatría. Immunohistochemical markers (PLAP and C-KIT)

were done to those gonadal samples, Immunohistochemical findings (frequency and distribution) of PLAP and C-KIT were described by two pathologists without knowing the clinical data. There were made correlations of the findings with the integral diagnosis of the patient, the karyotype and the answer to hormonal stimulus.

RESULTS: Fifteen complete cases of patients with abnormalities in sexual differentiation were studied, of which one case had Pure Gonadal Dysgenesis (6.66%), five cases of Mixed Gonadal Dysgenesis (33.33%), six cases of Ovotesticular DSD (40%) and three cases of Androgen Insensitivity (20%), of which three of them with Mixed Gonadal Dysgenesis (MGD) and one with Ovotesticular DSD (OTDDS) had gonadoblastoma (26.7%). The mean age of patients diagnosed with gonadoblastoma was of 3.8 years. Of the three patients with Dysgenesis Mixed Gonadal who developed Gonadoblastoma, two had ITGCN. The expression of PLAP was very slight in MGD, whereas the expression of C-KIT was greater. In patients with Androgen Insensitivity PLAP was negative in all and slightly positive with C-KIT. The positivity with PLAP in cases of OTDDS was slight.

CONCLUSIONS: These results suggest that the presence of positive cells for PLAP and C-KIT in children smaller than a year and because of the immaturity of gonadal cells are insufficient to diagnose ITGCN in patients with alterations in the sexual differentiation, since PLAP and C-KIT show prolonged expression in dysgenetic gonads and these immunohistochemical markers are expressed in a normal way in children after the birth.

KEYWORDS: Intratubular Germ Cell Neoplasia (ITGCN), PLAP, C-KIT, Gonadal Dysgenesis, Androgen Insensitivity, Ovotesticular DSD.

ESTUDIO DE MARCADORES PARA NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR (PLAP Y C-KIT) EN NIÑOS CON ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (DISGENESIA GONADAL, INSENSIBILIDAD A ANDROGENOS Y DESORDEN DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL OVOTESTICULAR).

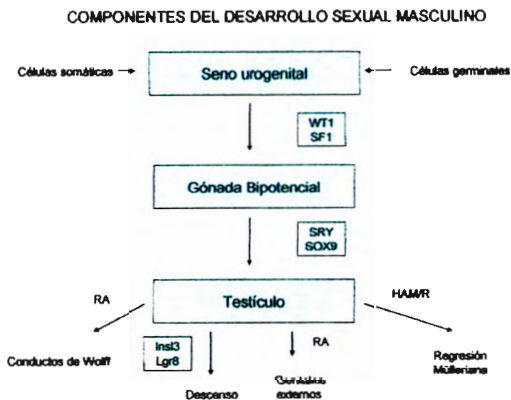
MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES SOBRE DESORDENES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Los componentes del desarrollo sexual fetal masculino y femenino desde una perspectiva genética y embriológica incluyen la migración de células primordiales germinales del saco embrionario endodérmico hasta el seno urogenital, mientras que el mesonefros es el origen somático de las células de Sertoli y de Leydig. El principal determinante del testículo es el gen SRY (sex-related gene, Y chromosome). Una vez formadas las células de Leydig en el testículo se producen andrógenos en elevadas concentraciones, que estabilizan a los conductos de Wolf y virilizan a los genitales externos. Las células de Sertoli producen la hormona antimülleriana que causa la regresión de los conductos Müllerianos y previene la formación de útero y trompas de Falopio en el hombre. (Figura1)

Para el desarrollo femenino también existen genes y factores determinantes para el fenotipo femenino durante el desarrollo fetal y prepuberal. Existen genes como DAX1 y WNT4 que funcionan como "antitestículo", también se ha observado que la transcripción del factor FOXL2 es la llave para el desarrollo folicular en el ovario y para la supresión del desarrollo testicular en mujeres determinadas genéticamente. (Figura1)

La producción de andrógenos es regulada por genes que cuando se encuentran sujetos a mutaciones de inactivación, pueden producir una insensibilidad parcial o total a la acción de los andrógenos, causando ambigüedad genital al nacimiento. ^(1,2,3,4)



COMPONENTES DEL DESARROLLO SEXUAL FEMENINO

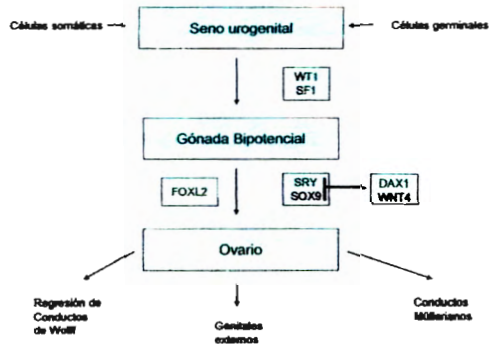


Figura 1. Genes involucrados en el desarrollo sexual. Adaptado de Hughes IA. Disorders of Sexual Differentiation. Horm Res.2007; 67(suppl 1):91-95.

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES CON TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA A TUMORES GERMINALES

El origen de los tumores germinales testiculares que ocurren durante la infancia es pobremente entendido, en cambio en adultos los tumores testiculares clásicos (seminomatosos o no seminomatosos) se originan del carcinoma in situ o neoplasia germinal intratubular (NGIT) de los testículos, que puede ser detectado en los túbulos seminíferos de manera adyacente a los tumores.⁽¹⁾ Los tumores de células germinales son un grupo heterogéneo de neoplasias que inician de manera primaria en gónadas y raramente de manera extragonadal, estos tumores son la neoplasia maligna más común en hombres desde los 15 a los 35 años edad.^(5,6,7,8)

Más del 95% de los tumores testiculares son de origen de células germinales y comprenden un grupo heterogéneo de tumores. La morfología de las células de la NGIT es muy similar a las células de las células germinales fetales.^(6,7,8)

La infertilidad se ha asociado con un incremento en el riesgo de tumores de células germinales (TCG) habiendo identificado a la neoplasia germinal intratubular (NGIT) en 1-2% de estos casos, sin embargo la infertilidad también se ha asociado con la presencia de criptorquidia y de disgenesias gonadales. El mayor riesgo de TCG se ha asociado a la presencia de criptorquidia, observando esta asociación hasta en el 10 % de los casos habiendo corregido o no la criptorquidia. Los pacientes con esta neoplasia incrementan la incidencia de enfermedad contralateral, siendo mayor la incidencia también si el testículo contralateral es atrófico o no ha descendido. La incidencia de esta neoplasia en el periodo prepuberal es más baja y poco estimada debido a las pocas células presentes en los testículos infantiles.^(7,8)

Algunos pacientes con trastornos en la diferenciación sexual tiene alto riesgo de desarrollo de tumores como el gonadoblastoma que se presenta hasta en el 50% de los pacientes con disgenesia gonadal, la frecuencia de la neoplasia germinal intratubular (NGIT) en algunas series de pacientes con estados intersexuales es del

6%, mientras que en otras la frecuencia va del 9 al 25%. En disgenesia gonadal mixta la expectativa para la aparición de tumores es del 10% a la edad de 20 años e incrementa a 19% a la edad de 30 años.⁽⁹⁾ Es bien sabido que las gónadas disgenéticas con una línea celular "Y" tienden a malignizarse, por lo que la gonadectomía profiláctica se practica en pacientes que tienen alto riesgo, sobre todo pacientes con disgenesia gonadal pura (XY) o disgenesia gonadal mixta (DGM).⁽¹⁰⁾ Los pacientes con insensibilidad a andrógenos tienen un 5 a 10% de desarrollo de tumores de células germinales^(11,12), usualmente después de haber desarrollado los caracteres sexuales secundarios fenotípicamente femeninos. La frecuencia de tumores en hermafroditismo verdadero es del 2.6 al 10%.^(4,9) En los pacientes con disgenesias gonadales que tienen un cariotipo con un cromosoma Y, tienen un factor de riesgo significativamente más elevado para desarrollo de tumores germinales, siendo el gonadoblastoma un precursor "in situ" en estos pacientes. Las biopsias testiculares en pacientes de intersexo pueden ayudar a la detección de NGIT.^(7,13)

La neoplasia germinal intratubular (NGIT) se refiere a una lesión inicialmente descrita por Skakkebaek como carcinoma in situ en 1972. La lesión original descrita es precursora de todos los tipos de tumores de células germinales, al menos en aquellos que se originan el periodo postpuberal. La NGIT se puede observar adyacente a las células tumorales invasivas a células germinales. Se presenta en el 4% en pacientes con criptorquidia, en 5% de las gónadas contralaterales de pacientes con TCG y en el 1% de los pacientes biopsiados por infertilidad con oligospermia.^(6,7,14)

La NGIT se caracteriza morfológicamente por la presencia de células germinales alargadas, atípicas, localizadas inmediatamente sobre una membrana basal adelgazada de manera irregular. Las células atípicas son aisladas en una sola fila sobre la membrana basal, típicamente más grandes que las espermatogonias. Las células de NGIT tienen citoplasma claro, núcleo de contornos irregulares, cromatina compacta y nucleolo alargado, el cual puede ser único o múltiple. (Figura 2) Las células de NGIT son inmunoreactivas con Fosfatasa Alcalina tipo placentaria (PLAP), otra tinción de inmunohistoquímica que expresa en un gran porcentaje de células de NGIT es la de C-KIT.⁽⁷⁾

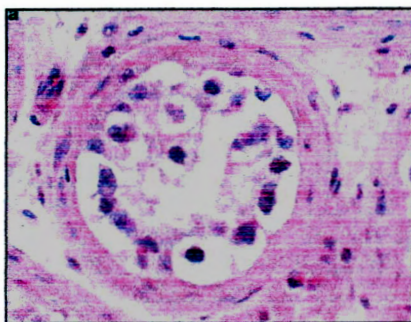


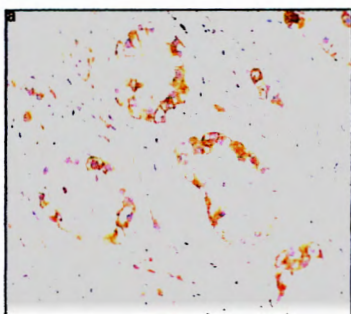
Figura 2. Neoplasia germinal intratubular(NGIT), las células malignas se encuentran en la periferia del lumen. Adaptado de Reuter, V. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* (2005)18, S51-S60.

El paso más temprano de la espermatogénesis se inicia al término de la vida fetal y consiste en la diferenciación de gonocitos y de las células germinales fetales a espermatogonias. La presencia posnatal de células germinales anormales similares en apariencia a gonocitos se considera patológica y algunos lo consideran como carcinoma testicular in situ (CIS) también llamado neoplasia germinal intratubular (NGIT). Los gonocitos, el carcinoma testicular y la NGIT expresan en

inmunohistoquímica PLAP (Placental-Like Alkaline Phosphatase- Fosfatasa Alcalina Tipo Placentaria), ^(6,15) este marcador no se presenta de manera normal en células germinales normales de adultos, sin embargo se pueden expresar en células germinales inmaduras durante la vida fetal hasta el primer año de vida. ^(6,16) Se ha hipotetizado que la NGIT se origina de los gonocitos durante el desarrollo fetal de los testículos, permanece silente durante la infancia y se transforma en tumor después de la etapa puberal. La prevalencia de tumores de células germinales en pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual es elevada y que en caso de disgenesia gonadal mixta y de insensibilidad a andrógenos estos se pueden presentar desde la infancia. ⁽¹⁵⁾ Existe evidencia que sugiere que elevados niveles de estrógenos incrementan el riesgo de desarrollo de TCG, mientras que elevados niveles de testosterona disminuyen ese riesgo. Cerca del 2% de los pacientes con TCG tienen el antecedente de un familiar afectado, lo que también indica un componente genético en el desarrollo de cáncer. La única aberración estructural cromosómica consistente en TCG es la presencia de alteraciones en el cromosoma 12, como por ejemplo la aparición de un isocromosoma i (12p), aunque esta alteración no es específica de TCG. ⁽¹⁷⁾

MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Las primeras investigaciones se enfocaron en encontrar un marcador útil que pudiera facilitar el diagnóstico de NGIT en las biopsias testiculares. Uno de los marcadores más comúnmente usados en la práctica clínica es una tinción de inmunohistoquímica denominada PLAP (Placental-Like Alkaline Phosphatase - Fosfatasa Alcalina Tipo Placentaria), que es una fosfatasa específica de algunos tejidos con funciones biológicas desconocidas que se expresan en células germinales primordiales y en gonocitos. La fosfatasa alcalina es un marcador de células germinales que ha sido reconocido desde 1953, cuando McKay y cols. lo reportaron como un marcador confiable para la identificación de células germinales en adultos, aunque pocos estudios han demostrado su efectividad en niños para diagnosticar NGIT. ⁽¹⁸⁾ Específicamente esta isoenzima también se ha detectado en el suero de pacientes con tumores de células germinales. La inmunoreactividad del PLAP reportada en varias series para el diagnóstico de NGIT es del 90 al 100%. ^(14,19, 20)



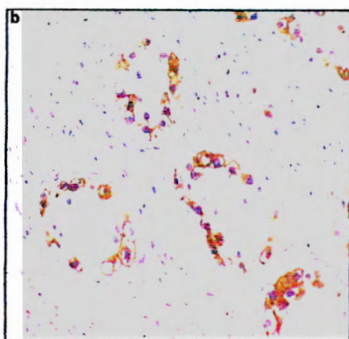


Figura 3. a) Inmunoreactividad de NGIT con PLAP (Fosfatasa Alcalina Tipo Placentaria), b) CD117(C-KIT). Adaptado de Reuter, V. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* (2005)18, S51-S60.

Existe otro marcador que evidencia la presencia de NGIT, el proto-oncogene C-KIT, un receptor de membrana de tirosin - cinasa para factor de células madre. El C-KIT se involucra en la migración y en la diferenciación de células primordiales germinales y también se expresa fuertemente en células primordiales fetales y en gonocitos infantiles pero no en espermatogonias adultas. Se ha propuesto que la expresión prolongada de C-KIT es un potente factor antiapoptótico en células germinales indiferenciadas, lo cual puede ser un mecanismo que produce la transformación neoplásica, prolongando su supervivencia de este proto-oncogen. ^(8,21,22,23) (Figura 3)

Los eventos genéticos que producen NGIT y posterior aparición de NGIT, aun tienen que dilucidarse. Se ha pensado y aceptado que la NGIT se produce de gonocitos durante el desarrollo fetal de los testículos, permanece silente durante la infancia y durante el periodo de la adolescencia se transforma en tumor, luego del estímulo hormonal. ⁽¹⁵⁾ Hasta el momento existen dos teorías definidas: la primera de Chaganti y Houldsworth, postula que la transformación de células de cigoteno a paquiteno en los espermatocitos, es en donde aparece el "punto de recombinación". En esta etapa se replica el DNA regulado por el gen p53, lo que de manera tardía permite la prolongación y la fase de recombinación. Si esto no se realiza, las cadenas de DNA se rompen y p53 puede ser un gatillo de inicio de apoptosis. En este modelo los eventos asociados con el intercambio aberrante de la cromátida, puede asociarse con el entrecruzamiento que incrementa el número de copias del gen 12p. Posiblemente de esta manera los efectos oncogénicos de la ciclina D2 y las células genómicamente inestables pueden escapar a los efectos apoptóticos de p53 y reentrar al ciclo celular ahora como células neoplásicas.

La segunda teoría de Skakkebaek y cols. es la más aceptada. En este modelo se sugiere que los gonocitos fetales (células germinales primordiales) pueden llegar a una división celular anormal (poliploidización) debido a factores ambientales in útero que pueden originar la NGIT. La poliploidización precede la formación de i (12p). (Figura 4) Estas células son susceptibles de la estimulación posnatal y puberal con gonadotropinas y el desarrollo de tumores invasivos. Esta hipótesis se basa en los datos inmunohistoquímicos que relacionan a los gonocitos con la NGIT, el desarrollo de los TCG y los datos epidemiológicos. ^(7,8)

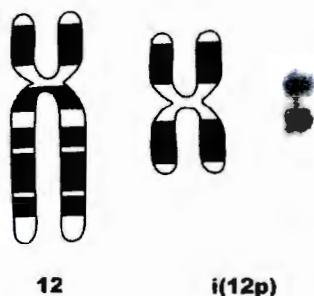


Figura 4. Cromosoma 12. Adaptado de Reuter, V. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* (2005)18, S51-S60.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR

El diagnóstico de carcinoma in situ en niños con alteraciones en la diferenciación sexual es difícil. Morfológicamente se observan comúnmente células germinales atípicas en sus gónadas, y parecen corresponder a un retraso en la maduración en lugar de transformación maligna.

Los criterios para el diagnóstico de NGIT de acuerdo a la clasificación de la OMS son: ^(9,14,24)

- Espermatogonias más grandes que lo normal
- Citoplasma claro o vacuolado, rico en glucógeno
- Núcleo: Largo, irregular e hiper cromático
- Nucleolo: Uno o más grandes e irregulares
- Mitosis (Anormales)
- Células localizadas en la membrana basal
- Espermatogénesis comúnmente ausente
- Involucro segmentario en los túbulos

El retraso en la maduración de células germinales y su progresión a carcinoma in situ (CIS) ocurre de manera frecuente en pacientes con estados intersexuales. Un retraso en el desarrollo de células germinales asemeja a CIS y evidencia una expresión prolongada de marcadores inmunohistoquímicos usados para el diagnóstico de CIS. ⁽²⁴⁾

Actualmente existe firme evidencia que los TCG del adulto joven provienen de las células de la NGIT. Aunque el origen de la NGIT aún no se encuentra claro, los datos disponibles soportan la hipótesis que la NGIT se origina de células germinales fetales que son detenidas en su diferenciación antes de alcanzar el estadio de espermatogonia. Algunos modelos de testículos disgenéticos se asocian con disrupción endócrina severa, y alto riesgo para cáncer testicular, por lo que se debe sospechar que existen factores endócrinos que se involucran en el origen de las células de la NGIT. ⁽⁸⁾

Existen algunos factores de riesgo que se han propuesto para el desarrollo de tumores testiculares germinales. (Figura 5) La exposición perinatal de hormonas sexuales o "disrupción hormonal" se propone como un factor que influencia el riesgo de cambios malignos, también se sugiere que las aberraciones en la estructura testicular, la disminución en la secreción de la testosterona y el incremento en la secreción de

gonadotropinas puede crear un medio que es favorable para aparición de lesiones neoplásicas preinvasivas de tumores germinales en la infancia.⁽¹⁵⁾

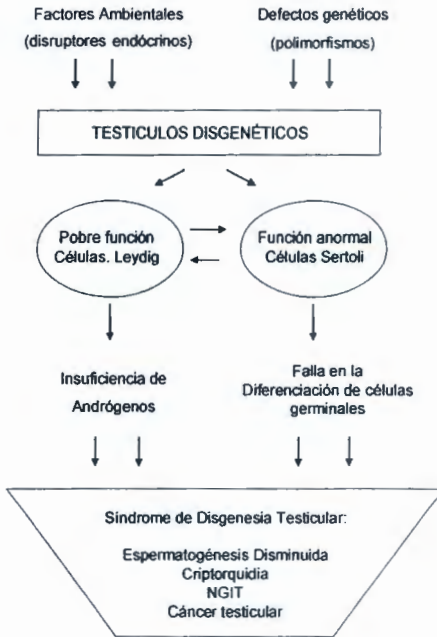


Figura 5.

Representación esquemática de la probable patogénesis del Síndrome de Disgenesia Testicular. Tomado de Hoi-Hansen CE, Meys ER, Skakkebaek NE. Germ cell tumours of the testis: how do they start? *Histopathology* 2002;41(Suppl. 2) 382-388

Poco se conoce sobre las aberraciones genéticas en el genoma de la NGIT. Los estudios citogenéticos muestran aberraciones en la constitución cromosómica de la NGIT, con alteraciones en el cromosoma 1, 12 y 15, observando de manera frecuente un isocromosoma en el brazo corto del cromosoma 12, i (12p).⁽⁸⁾

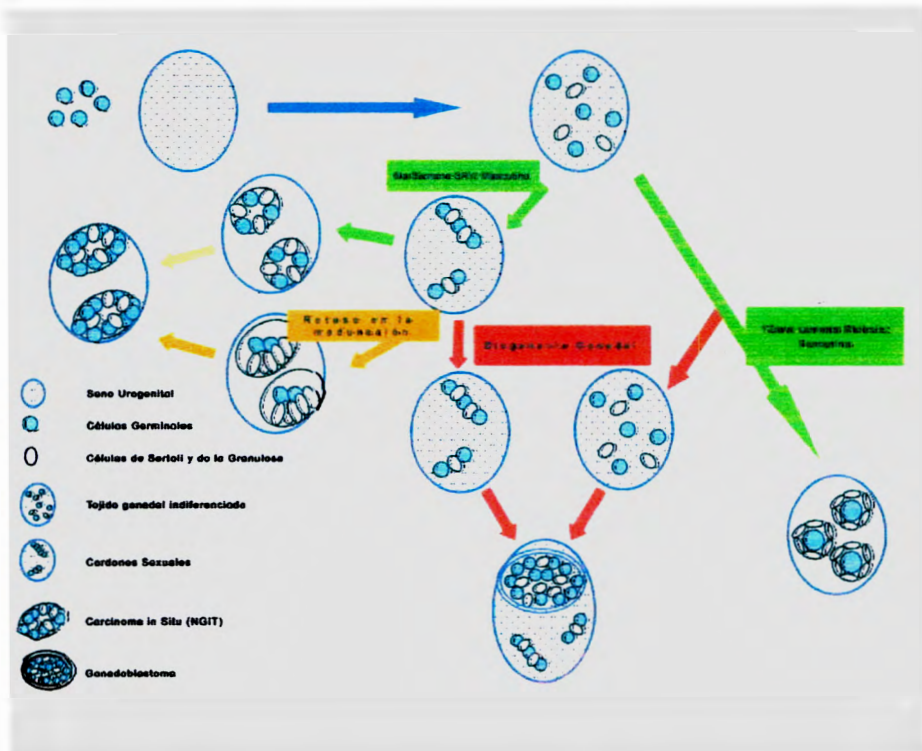
El diagnóstico de NGIT en niños con alteraciones en la diferenciación sexual es difícil. Las células germinales morfológicamente atípicas se observan comúnmente en sus gónadas y parece corresponder a retraso en la maduración gonadal en lugar de transformación maligna.⁽²⁴⁾

El retraso en la maduración de las células germinales y su progresión a neoplasia germinal intratubular (NGIT) frecuentemente ocurre en pacientes con estados intersexuales. Un desarrollo retrasado en las células germinales asemeja datos de células de NGIT y desarrolla una expresión prolongada de marcadores de inmunohistoquímica usado para el diagnóstico de ésta neoplasia.⁽²⁴⁾

Esquema modelo para el desarrollo de tejido gonadal indiferenciado (UTG) y carcinoma in situ (CIS) dentro de la gónada disgenética. *Panel Superior*, en el desarrollo del embrión las células germinales migran del saco vitelino dentro de la gónada bipotencial y se mezclan con la pre-células de Sertoli y de la granulosa. *Panel Medio* (de derecha a izquierda), en el hombre, la expresión de SRY en la sexta semana induce la organización de pre-células de Sertoli y de células germinales en los cordones sexuales (SC). Bajo la influencia de otros genes determinantes

del sexo como el SRY, estos cordones sexuales se diferencian en túbulos seminíferos. Condiciones patológicas pueden causar un bloqueo o retraso en el desarrollo normal de las células germinales, incrementando el riesgo de formación de neoplasia germinal intratubular no clasificada. **Panel Inferior.** En gónadas disgenéticas, expresión inapropiada o ausente de SRY o expresión alterada de otros genes determinantes masculinos, prohíben la formación de cordones sexuales o la diferenciación posterior de los cordones sexuales, mientras que la progresión en la vía de la meiosis se encuentra bloqueada (*panel bajo, derecha*), resultando en la persistencia de tejido gonadal indiferenciado (UTG). Las células germinales sobrevivientes en el UTG (incluyendo los cordones sexuales inmaduros) confieren un riesgo elevado para el desarrollo de gonadoblastoma (GB) (*panel intermedio y bajo*).

Figura 6. Adaptada de Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, Drop SL, Wolfenbuttel KP, Bourguignon JP, Slowikowska-Hilczner J, Kula K, Faradz SM, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2404-13. Epub 2006 Apr 11.



La prueba de estimulación con hormona gonadotropina coriónica humana (HCG) es ampliamente utilizada para evaluar la presencia de tejido testicular funcional, sobre todo en aquellos pacientes con criptorquidia uni o bilateral o bien en aquellos pacientes con trastornos en la diferenciación sexual. Esta prueba puede variar ya que no existe un consenso en la aplicación de la misma. Algunos autores manejan dosis intramusculares durante tres días dependientes de la edad del paciente <1 año 500 Unidades, de 1 a 10 años 1000 Unidades y aquellos de más de 10 años 1500 Unidades, tomándose muestras antes de la primera dosis y 24 horas después de la última dosis para determinación de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT). Esta prueba ha demostrado un valor predictivo positivo del 89% y un valor predictivo negativo del 100%. Por lo que se considera esta prueba como un indicador válido para

evaluar la existencia de tejido testicular funcionante. Una pobre respuesta a la prueba puede determinar anorquia y una buena respuesta sugiere la presencia de testículos funcionantes. Existen dos métodos para definir una respuesta anormal a esta prueba, que la testosterona plasmática no se duplique luego de la última aplicación de HCG o bien que el pico de testosterona no alcance al cuarto día de la prueba 5 ng/mL. Con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96%.⁽²⁵⁾

JUSTIFICACIÓN

El potencial maligno de gónadas disgenéticas tiene una incidencia de neoplasia entre el 17 al 35%. La detección oportuna de neoplasia germinal intratubular (NGIT) sugeriría la realización de gonadectomía profiláctica, una vez que el diagnóstico se encuentra establecido con certeza. En adultos se utilizan marcadores de NGIT, como PLAP y C-KIT, sin embargo no sabemos su utilidad en niños.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de positividad para los marcadores de inmunohistoquímica para neoplasia germinal intratubular PLAP (Placental-Like Alkaline Phosphatase - Fosfatasa Alcalina Tipo Placentaria) y del proto-oncogene C-KIT en pacientes en edad pediátrica con alteraciones en la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular)?

OBJETIVOS

General

-Determinar la frecuencia de positividad para PLAP y C-KIT en tejido gonadal de niños con alteración en la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a los andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular).

Específicos

1) Evaluar la expresión de PLAP y C-KIT gónadas de niños con alteración en la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular), con su cariotipo, la respuesta a estímulo hormonal con Hormona Gonadotropha Coriónica (HCG) y su presentación clínica.

2) Determinar si la expresión de PLAP y C-KIT son marcadores de neoplasia germinal intratubular en gónadas disgenéticas infantiles

HIPÓTESIS

La expresión de los marcadores de inmunohistoquímica PLAP y C-KIT será positiva en niños con gónadas con alteraciones en la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a los andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular) como marcador de neoplasia germinal intratubular (NGIT).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio Transversal, Descriptivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los casos se obtuvieron tanto de los archivos del Departamento de Patología como del Servicio de Endocrinología de pacientes con seguimiento en el Instituto Nacional de Pediatría a los que se les tomó biopsia gonadal o que fueron gonadectomizados, con los diagnósticos de disgenesia gonadal pura o mixta, insensibilidad a los andrógenos parcial o total y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular.

Los datos clínicos incluyendo el cariotipo, respuesta a estímulo hormonal con HCG (para evaluar producción de testosterona y conversión a dihidrotestosterona) y el diagnóstico integral fueron obtenidos de los expedientes clínicos.

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica (PLAP y C-KIT) en el tejido gonadal obtenido por gonadectomía o biopsia de pacientes con diagnóstico de alteración de la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a los andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular) con anticuerpo monoclonal de ratón antihumano Placental Alkaline Phosphatase (PLAP) [Marca Dako, Cat. M7191, Clona (A9, Dilución 1:50, incubación 45 min.)] y anticuerpo policlonal de ratón antihumano CD117, C-KIT [Marca Dako, Cat. A4502, Dilución 1:50, incubación 45 min.]

Los casos se revisaron por dos patólogos del Departamento de Patología corrigiendo cuando fue necesario el diagnóstico histopatológico y excluyendo aquellos casos en que no se contaba con tejido gonadal. Se describió por ambos patólogos la frecuencia y distribución de PLAP y C-KIT en el tejido gonadal, sin conocimiento de los datos clínicos.

Se realizaron las correlaciones de los hallazgos con el diagnóstico integral del paciente, el cariotipo y la respuesta a estímulo hormonal en los casos en que se contaba con estos datos.

Dado que este proyecto fue un estudio descriptivo, retrospectivo, tipo serie de casos, no se realizó cálculo de tamaño de la muestra.

Es un estudio que tiene riesgo menor al mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud, por lo que no se solicitó firma de consentimiento informado. Se llevó a cabo previa autorización del Comité de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

VARIABLES DE ESTUDIO:

Independiente: Marcadores inmunohistoquímicos para neoplasia germinal intratubular C-KIT y PLAP

Dependiente: Alteraciones en la diferenciación sexual (disgenesia gonadal, insensibilidad a andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular).

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

- **TRANSTORNO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL OVOTESTICULAR (TDSOT)**

Definición Conceptual. Presencia en un mismo individuo de los dos tipos de gónada, testículo y ovario, cuyas estructuras deben de estar bien diferenciadas y cuya función debiera ser normal. El genotipo más frecuente es 46, XX, pero también puede contener un cromosoma Y, pudiendo entonces ser 46, XY o mosaico 46, XX/46, XY. Las gónadas pueden ser asimétricas (un testículo y un ovario, o una gónada masculina o femenina y un ovoteste, o simétrica, dos ovotestes, siendo la más frecuente la asimétrica). El fenotipo y el genotipo son variables.

Definición Operacional. Diagnóstico anatomopatológico de trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular (TDSOT).

Escala: Cualitativa nominal dicotómica.

- **DISGENESIA GONADAL MIXTA (DGM)**

Definición Conceptual. Pacientes con ambigüedad de los genitales externos y cuyas gónadas asimétricas contienen un testículo con grados variables de disgenesia en un lado y una gónada fibrosa indiferenciada en el otro. La gónada diferenciada en testículo aunque sea disgenética ha producido testosterona durante la vida fetal y ha virilizado parcialmente los genitales. Muchos presentan anomalías gonosómicas, predominando el cariotipo 45, XO/46, XY, pero el cariotipo puede ser 45, XO y 46, XY. El estudio bioquímico de la capacidad secretora de las gónadas proporciona resultados muy variables, que pueden ir desde respuestas mínimas de la testosterona a HCG, hasta respuestas dentro del límite de la normalidad.

Definición Operacional. Diagnóstico anatomopatológico de disgenesia gonadal.

Escala: Cualitativa nominal dicotómica.

- **INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS (IA)**

Definición Conceptual. Falta de respuesta a andrógenos (tanto de testosterona como de dihidrotestosterona), por alguna anomalía en el gen que codifica el receptor de los andrógenos. De la acción de los andrógenos durante la fase fetal crítica de diferenciación de genitales externos e internos depende la diferenciación de los conductos de Wolff en el epidídimo, deferente y vesículas seminales por acción directa de la testosterona, mientras que la diferenciación de la próstata y de los genitales externos depende de la DHT. La anomalía génica o mutación del receptor de andrógenos puede provocar una falta total o parcial de respuesta a los andrógenos.

Definición Operacional. Diagnóstico anatomopatológico de testículo normal con falta total o parcial de respuesta a andrógenos, cariotipo 46, XY y fenotipo femenino.

Escala: Cualitativa nominal dicotómica.

- **POSITIVIDAD C-KIT Y PLAP**

Definición Conceptual. Número de células germinales positivas en tinción de inmunohistoquímica en gónadas.

Definición Operacional. En túbulos se clasificará de manera cualitativa, de la siguiente manera: 0, ninguna; +, algunas; ++, número moderado; +++, virtualmente todas las células se tiñen.

Escala: Cualitativa nominal.

- **NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR (NGIT)**

Definición Conceptual. Las células del carcinoma in situ tienen un diámetro mayor que las espermatogonias normales y los grandes núcleos usualmente contienen múltiples nucleolos. De manera común se presenta infiltración intersticial de linfocitos. El parénquima testicular es frecuentemente atrófico y puede contener signos de disgenesia con túbulos con diferenciación incompleta y microcalcificaciones.

Definición Operacional. Diagnóstico anatomopatológico de neoplasia germinal intratubular (NGIT) basada tanto en hallazgos morfológicos como inmunohistoquímicos.

Escala: Cualitativa nominal dicotómica.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Muestras de tejido gonadal del archivo de patología de pacientes pediátricos del INP.
- Biopsias gonadales o gónadas resecadas de pacientes pediátricos.
- Diagnóstico anatomopatológico de disgenesia gonadal, insensibilidad a andrógenos y desorden de la diferenciación sexual ovotesticular.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Ausencia de tejido gonadal para el estudio de inmunohistoquímica.

ASPECTOS ÉTICOS

Debido a que las muestras están en parafina no se requirió de consentimiento informado por escrito. Los procedimientos propuestos estuvieron de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la Declaración de Helsinki y sus enmiendas, así como los códigos y normas Internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Además se procedió con toda la seguridad y bienestar de los pacientes, respetando cabalmente los principios contenidos en el Código de Núremberg, la Declaración de Helsinki y sus enmiendas, el Informe Belmont, el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos.

PLAN DE ANÁLISIS:

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se colectó la información de los expedientes clínicos en una hoja de recolección de datos elaborada para tal fin. Se concentraron los mismos y se realizó análisis estadístico descriptivo, con tablas y graficas de distribución de frecuencias relativas y absolutas debido a las variables cualitativas nominales, observando las asociaciones de los objetivos planteados. Se empleó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y de dispersión acordes a la distribución de cada una de las variables comparándose con lo publicado en la literatura. No se pudo realizar un análisis estadístico muy extenso dado que el número de muestras para el estudio es pequeño y se trata principalmente de un estudio descriptivo tipo serie de casos.

RESULTADOS:

- Características Demográficas

Se estudiaron 15 casos completos de pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual, de los cuales un caso fue de disgenesia gonadal pura (6.66%), 5 casos de disgenesia gonadal mixta (33.33%), 6 casos de desorden de la diferenciación sexual ovotesticular (40%) y 3 casos de insensibilidad a los andrógenos (20%). Se observó que cuatro pacientes fueron diagnosticados con presencia de gonadoblastoma (26.6%), tres de ellos con disgenesia gonadal mixta (DGM) y uno con desorden de la diferenciación sexual ovotesticular (DDSOT).

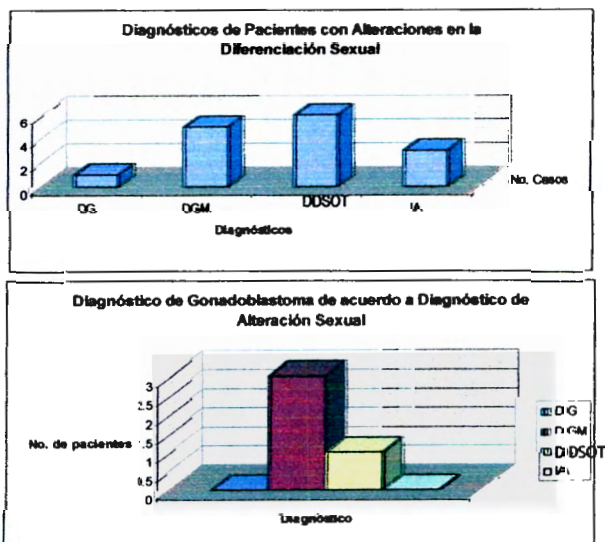


Figura 7. Diagnóstico de Gonadoblastoma en pacientes con alteración en la diferenciación sexual.

DG - Disgenesia Gonadal Pura
DGM - Disgenesia Gonadal Mixta
DDSOT - Desorden de la Diferenciación Sexual Ovotesticular.
IA - Insensibilidad a los Andrógenos

El promedio de edad de los pacientes al momento de la biopsia o de la gonadectomía, con un intervalo de edad de 3 a 146 meses, fue a los 26.21 meses, por lo que si todos los pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual tuvieran la misma edad al momento de la exploración quirúrgica esta sería de 2 años y un mes de edad, mientras que la mediana de la edad fue de 7.5 meses en los pacientes, se encontró que al 68.27% de los pacientes a los que se les realizó biopsia o gonadectomía la edad de estos procedimientos fue entre el nacimiento y los de 68.81 meses, es decir 5.73 años, considerando la desviación estándar de ± 42.6 meses, la cual se afecta dado que existen al menos dos valores extremos en edad.

Gráfico de cajas para evaluar edad de los pacientes al momento de la biopsia o gonadectomía

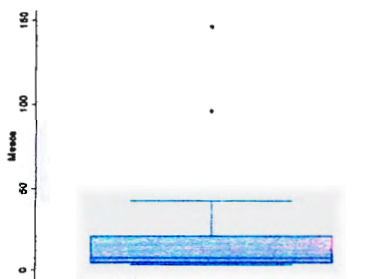


Figura 8. Edad de pacientes con alteraciones de la diferenciación sexual.

La edad promedio de los pacientes diagnosticados con gonadoblastoma fue de 45.75 meses (3.8 años) encontrándose en rango de edad desde 5 a 146 meses de edad (12 años 1 mes).

- Características Clínicas:

Los pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal presentaron las mismas características clínicas de criptorquidia unilateral e hipospadias, se puede observar en los cuadros 1 y 2 tanto el cariotipo como la respuesta hormonal a Hormona Gonadotropina Coriónica, que parece no mostrar ninguna relación con la positividad de las tinciones de inmunohistoquímica (PLAP y C-KIT). Tres pacientes con disgenesia gonadal mixta desarrollaron gonadoblastoma, de los cuales dos tenían características de neoplasia germinal intratubular en el estudio anatomopatológico. Sin embargo la positividad con PLAP fue muy leve en DGM, mientras que el C-KIT se observó mayor positividad en aquellos casos diagnosticados con gonadoblastoma.

Cuadro 1. Características clínicas de pacientes con Disgenesia Gonadal

Diagnóstico	Edad Px en meses	Presentación clínica	Cariotipo	Respuesta Hormonal HCG	Positividad PLAP (%)	Positividad C-KIT (%)	Observaciones
DG	4	Criptorquidia unilateral e hipospadia	46 XY	Negativa	Negativa	+++	Sin evidencia de neoplasia

Cuadro 2. Características clínicas de pacientes con Disgenesia Gonadal Mixta

Diagnóstico	Edad Px en meses	Presentación clínica	Cariotipo	Respuesta Hormonal HCG	Positividad PLAP (%)	Positividad C-KIT (%)	Observaciones
DGM	7	Criptorquidia unilateral, hipospadia y escroto en chal	46XY/45XO	Negativa	+	+	Sin evidencia de neoplasia
DGM	4	Criptorquidia unilateral e hipospadia	45 XO	Negativa	Negativa	+ en estroma	Sin evidencia de neoplasia
DGM	21	Criptorquidia unilateral e hipospadia	46XY/45XO	Positivo	+	+	NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR, GONADOBLASTOMA
DGM	11	Criptorquidia unilateral e hipospadia	46XY/45XO	Positiva	+	++	GONADOBLASTOMA
DGM	146	Criptorquidia unilateral	46XY/45XO	Positivo	Negativa	+++	NEOPLASIA GERMINAL INTRATUBULAR, GONADOBLASTOMA

En su mayoría los pacientes con diagnóstico de trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular presentaron criptorquidia unilateral e hipospadia, así como crecimiento de falo y escrotalización de labios en algunos casos, lo que se puede observar en el cuadro 3. El cariotipo fue variable en pacientes con este diagnóstico y la respuesta hormonal a Hormona Gonadotropina Coriónica, no parece tener ninguna relación con la positividad de las tinciones de inmunohistoquímica (PLAP y C-KIT). Se evidenció la presencia de un paciente con TDSOT que desarrollo Gonadoblastoma sin datos de NGIT. Llama la atención que en estos pacientes las tinciones con PLAP fueron poco positivas, mientras que con C-KIT estas fueron más positivas, sobre todo en las zonas con ovotestes y como se ha mencionado en la literatura en niños menores de un año de edad.

Cuadro 3. Características clínicas de pacientes con Trastorno de la Diferenciación Sexual Ovotesticular

Diagnóstico	Edad Px en meses	Presentación clínica	Cariotipo	Respuesta Hormonal HCG	Respuesta Hormonal con Pergonal	Positividad PLAP (%)	Positividad C-KIT (%)	Observaciones
TDSOT	12	Criptorquidia unilateral, hipospadía y falo con cuerda	46,XX;47XXY; 46XY	Negativa	Sin datos en el expediente	+	+	Sin evidencia de neoplasia
TDSOT	5	Labios hiperpigmentados, escrotalizados	46XX	Negativa	Negativa	-	+ en óvulos	GONADOBLASTOMA
TDSOT	3	Criptorquidia unilateral, hipospadía y falo (2cm)	46XX/47XXY	T = Negativa DHT = Positiva	Negativa	++	++	Sin evidencia de neoplasia
TDSOT	8	Criptorquidia unilateral e hipospadía	46XY/45XO	T = Negativa DHT = Positiva	Sin datos	+	+	Sin evidencia de neoplasia
TDSOT	6	Criptorquidia unilateral, hipospadía y falo (3cm)	46 XX	Negativa	Positiva	-	++	Sin evidencia de neoplasia
TDSOT	3	Criptorquidia bilateral e hipospadias	46XY/45XO	Negativa	Sin datos	+	+++	Sin evidencia de neoplasia

Los pacientes con insensibilidad a los andrógenos presentaron un fenotipo femenino con leve escrotalización de labios y solo en un caso presencia de falo pequeño, lo que pudo deberse a una insensibilidad parcial a los andrógenos. En el cuadro 4 se puede observar que tanto el cariotipo y la respuesta hormonal no parecen tener ninguna relación con la positividad de las tinciones de inmunohistoquímica (PLAP y C-KIT), notando que la tinción con PLAP fue negativa en todas las gónadas y solo levemente positivas con C-KIT.

Cuadro 4. Características clínicas de pacientes con Insensibilidad a los Andrógenos

Diagnóstico	Edad Px en meses	Presentación clínica	Cariotipo	Respuesta Hormonal HCG	Positividad PLAP (%)	Positividad C-KIT (%)	Marcador de severidad del defecto
IA	42	Labios escrotalizados, falo 3 cm.	46 XY	T= Positiva DHT= Negativa	-	+	Sin evidencia de neoplasia
IA	96	Fenotipo femenino	46 XY	Negativa	-	+ en intersticio	Sin evidencia de neoplasia
IA	3	Fenotipo femenino, gónadas en labios escrotalizados	46 XY	T =Negativa DHT= Positiva	-	-	Sin evidencia de neoplasia

- Características anatomopatológicas

Observamos que en las diferentes alteraciones en la diferenciación sexual la tinción de inmunohistoquímica que más frecuentemente fue positiva fue el C-KIT, sobretodo en aquellos pacientes con diagnóstico de trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular (TDSOT) entre los tres a los doce meses de edad, observando que en aquel paciente en el que se diagnosticó gonadoblastoma la edad al diagnóstico fue de 5 meses. La positividad con PLAP fue leve y se observó solamente en tres pacientes con TDSOT.

Tinción de PLAP

Cuadro 5. Evaluación de positividad de tinción de inmunohistoquímica con PLAP de acuerdo Diagnóstico: [DG (Disgenesia Gonadal), DGM (Disgenesia Gonadal Mixta), TDSOT (Trastorno de la Diferenciación Sexual Ovotesticular), IA (Insensibilidad a los Andrógenos)]

Diagnóstico	Tinción Negativa	Positiva +	Positiva ++	Positiva +++	Total Biopsias
DG	1	0	0	0	1
DGM	2	3	0	0	5
TDSOT	2	3	1	0	6
IA	3	0	0	0	3

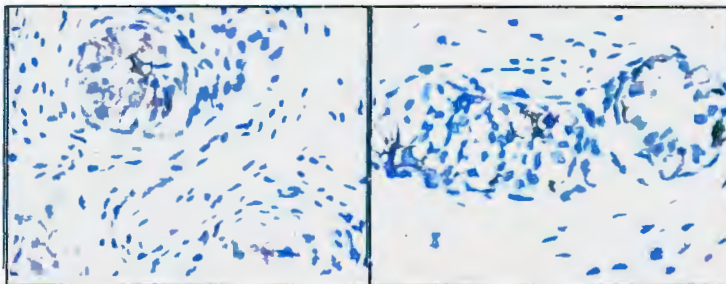
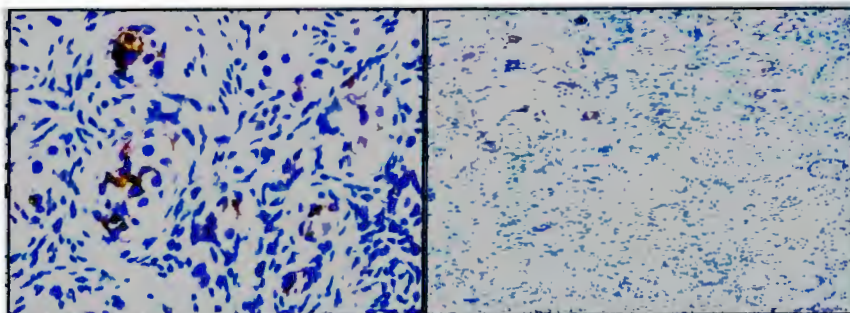


Figura 8. PLAP. Túbulos pequeños e irregulares en DGM 40X

Tinción de C-KIT

Diagnóstico	Tinción Negativa	Positiva +	Positiva ++	Positiva+++	Total Biopsias
DG	0	0	0	1	1
DGM	0	3	1	1	5
TDSOT	0	3	2	1	6
IA	2	1	0	0	3

Cuadro 6. Evaluación de positividad de tinción de inmunohistoquímica con C-KIT de acuerdo Diagnóstico: [DG (Disgenesia Gonadal), DGM (Disgenesia Gonadal Mixta), TDSOT (Trastorno de la Diferenciación Sexual Ovotesticular), IA (Insensibilidad a los Andrógenos)]



C-KIT Túbulos pequeños y tortuosos

C-KIT + en ovario, - en túbulos (40X) en DDSOT

DISCUSIÓN RESULTADOS:

Se ha observado una asociación entre tumores gonadales y trastornos de la diferenciación sexual. La anomalía más frecuente que produce tumores de células germinales es la disgenesia gonadal con la presencia de cromosoma Y, sin embargo otros trastornos se han relacionado con presencia de neoplasia germinal intratubular que incluyen al trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos.

El diagnóstico de neoplasia germinal intratubular en niños con trastornos de la diferenciación sexual es difícil, ya que de manera común se observan en sus gónadas células germinales con morfología atípica que parecen corresponder a un retraso en la maduración gonadal en lugar de una transformación maligna, la cual puede presentarse con expresión prolongada en gónadas disgenéticas. En adultos es fácil hacer el diagnóstico de tumores invasivos, ya que existen marcadores de inmunohistoquímica como el PLAP (Fosfatasa Alcalina Tipo Placentaria), C-KIT que es un gen que codifica al factor receptor de células madre dependiente de actividad de tirosin-cinasa y de OCT3/4 que es un factor de transcripción que se involucra en la regulación de la pluripotencialidad, que de manera normal se expresan en células germinales embrionarias que está bien establecido que diagnostican NGIT y algunos tumores germinales invasivos.

Recientemente se ha demostrado un rol específico de OCT3/4 para la supervivencia de células germinales primordiales previniendo la apoptosis prematura. OCT3/4 es un factor de transcripción, que normalmente es expresado en células madre y células germinales embrionarias, es esencial en la regulación de la diferenciación y la pluripotencialidad. Además OCT3/4 se encuentra presente de manera consistente en varios tumores germinales, incluyendo la NGIT y el gonadoblastoma. En algunas series se encuentra presente y con mayor expresión en pacientes menores de 9 meses de edad, nunca más allá de esta edad. OCT3/4 se encuentra presente y limitada a la región central de la gónada, de manera que las células germinales se tiñen de manera homogénea y positiva para este marcador, por lo que se ha sugerido que las células germinales que se tiñen a nivel central con este marcador tienen una maduración retrasada, una vez que estas células se mueven a la membrana basal, pierden su pluripotencialidad y comienzan a diferenciarse, si esto no ocurre en células positivas para OCT3/4, y si esta célula no se elimina a través de apoptosis, la expresión clonal de esta célula pluripotencial puede originar una NGIT. Se expresa de manera consistente en tumores de células germinales y puede jugar un rol importante en la patogenia de su desarrollo. ⁽¹⁹⁾ Además se han desarrollado nuevas tinciones de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la Proteína Y Testicular Específica (TSPY) en gonadoblastomas, esta proteína es codificada por el gen TSPY que se piensa actualmente que es el gen responsable para el desarrollo del gonadoblastoma, observando que se expresa con mayor intensidad en células germinales de testículos disgenéticos y en tejido condal indiferenciado, al ser comparado contra gónadas fetales y normales. Se piensa que TSPY se relaciona con la proliferación premeiótica de las espermatogonias, aunque su función no está clarificada. Existe evidencia creciente de que TSPY es el gen candidato de cromosoma Y que lleva al desarrollo de gonadoblastoma. ⁽⁴⁾

Cuadro 7. Resumen de resultados de tinciones en diferentes patrones de diferenciación gonadal y en gonadoblastoma (GB) / disgerminoma (DG)*

	Testículo	Tejido Gonadal No Diferenciado	Ovario	Estría	GB	DG
OCT3/4	+	+	-	-	+	+
PLAP	+	+	-	-	+	+
C-KIT	+	+	+	-	+	+
TSPY	+++	+++	-	-	+++	+/-

*Tabla adaptada de Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Bourguignon JP, Slowikowska-Hilczek J, Kula K, Faradz SM, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Jun;91(6):2404-13. Epub 2006 Apr 11.

La diferencia en el patrón de expresión de C-KIT durante las etapas tempranas de la gestación entre las células germinales normales y las células de las alteraciones en la diferenciación sexual puede sugerir que el C-KIT es regulado por factores que se involucran en la diferenciación sexual. ⁽¹⁸⁾ La expresión prolongada de C-KIT puede reflejar un retraso en el desarrollo en las células germinales de trastornos en la diferenciación sexual. La persistencia de una expresión elevada de C-KIT en células germinales puede ser un marcador de su falta de diferenciación o dismaturidad.

Los resultados sugieren que la presencia de células positivas para PLAP y C-KIT en pacientes menores de un año, y de acuerdo a la dismaturidad esperada para este grupo de edad es insuficiente para el diagnóstico de NGIT en pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual, ya que PLAP y C-KIT muestran expresión prolongada en gónadas disgenéticas y se expresan de manera normal en niños después del nacimiento. Las tinciones de PLAP y C-KIT son similares a OCT3/4 aunque muestran menos consistencia. Por lo que se piensa que actualmente OCT3/4 es un buen marcador para describir retraso en la maduración y NGIT en pacientes con estados intersexuales. Por lo que se deberán realizar mayor número de estudios prospectivos para dar seguimiento a estos pacientes con trastornos de la diferenciación sexual.

CONCLUSIONES:

- 1) El C-KIT como marcador de inmunohistoquímica fue más específico para diagnóstico de neoplasia germinal intratubular en aquellos pacientes con gonadoblastoma con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta, no siendo así en el caso del trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular, en tanto que el marcador de PLAP no fue específico en ambos diagnósticos.
- 2) No parece observarse ninguna relación entre los marcadores de inmunohistoquímica PLAP y C-KIT con la respuesta hormonal a Hormona Gonadotropina Coriónica (HGC) y el cariotipo en las diferentes anomalías de la diferenciación sexual estudiadas, sin embargo quizá al incrementar el tamaño de la muestra y hacer una valoración cuantitativa de la respuesta al test de HCG esta relación pudiera resultar significativa.
- 3) La tinción que se observó presente en la mayoría de los diagnósticos (disgenesia gonadal mixta, trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular e insensibilidad a los andrógenos) fue el C-KIT, inclusive predominando en el diagnóstico de trastorno de la diferenciación sexual ovotesticular en presencia de ovotestes y en pacientes menores de un año de edad.
- 4) La presencia de células positivas para PLAP y C-KIT en pacientes menores de un año y de acuerdo a la inmadurez esperada para este grupo de edad es insuficiente para el diagnóstico de NGIT en pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual, ya que PLAP y C-KIT muestran expresión prolongada en gónadas disgenéticas y se expresan de manera normal en niños después del nacimiento hasta en el primer año de edad posnatal.

5) El diagnóstico de NGIT en niños con alteraciones en la diferenciación sexual es difícil sobre todo en el primer año de vida debido a que las células germinales en pacientes con estos diagnósticos pueden parecer retraso en la maduración gonadal en lugar de transformación maligna, por lo que se debe considerar el uso de otros marcadores de inmunohistoquímica como el OCT3/4, de reciente aparición, que es un factor de transcripción normalmente expresado en células madres y células germinales embrionarias y que tiene mayor especificidad para el diagnóstico de tumores germinales incluyendo la NGIT y el gonadoblastoma, ya que la gonadectomía profiláctica y la detección oportuna pueden ser de gran beneficio para los pacientes con anomalías en la diferenciación sexual.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Hughes IA. Disorders of Sexual Differentiation. *Horm Res.* 2007; 67(suppl 1):91-95.
- 2) Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, Cohen-Kettenis PT. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;21(3):351-65.
- 3) Olesen IA, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Rajpert-DeMeyts E, Skakkebaek NE. Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;21(3):462-78.
- 4) Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, Drop SL, Wolffebuttel KP, Bourguignon JP, Slowikowska-Hilczler J, Kula K, Faradz SM, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2404-13. Epub 2006 Apr 11.
- 5) Cools M, Drop SL, Wolffebuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev.* 2006 Aug;27(5):468-84. Epub 2006 May 30.
- 6) Jorgensen N, Muller J, Giwercman A, Visfeldt J, Moller H, Skakkebaek NE. DNA content and expression of tumour markers in germ cells adjacent to germ cell tumours in childhood: probably a different origin for infantile and adolescent germ cell tumours. *J Pathol.* 1995 Jul;176(3):269-78.
- 7) Reuter V. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* 2005; 18: S51-S60
- 8) Hoi-Hansen CE, Meyts ER, Skakkebaek NE. Germ cell tumours of the testis: how do they start? *Histopathology* 2002;41(Suppl. 2): 382-388
- 9) Ramani P, Yeung CK, Habeebu SS. Testicular intratubular germ cell neoplasia in children and adolescents with intersex. *Am J Surg Pathol.* 1993 Nov;17(11):1124-33.
- 10) Beheshti M, Hardy BE, Mancier K, McLorie G, Churchill BM. Neoplastic potential in patients with disorders of sexual differentiation. *Urology.* 1987 Apr;29(4):404-7.
- 11) Olsen MM, Caldamone AA, Jackson CL, Zinn A. Gonadoblastoma in infancy: indications for early gonadectomy in 46XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg.* 1988 Mar;23(3):270-1.
- 12) Müller J, Skakkebaek N. Testicular carcinoma in situ in children with the androgen insensitivity(testicular feminization) syndrome. *BMJ.* 1984 May;288:1419-20
- 13) Krasna IH, Lee ML, Smilow P, Sciorra L, Eierman L. Risk of malignancy in bilateral streak gonads: the role of the Y chromosome. *J Pediatr Surg.* 1992 Nov;27(11):1376-80.
- 14) Chevillet JC. Classification and pathology of testicular germ cell and sex cord-stromal tumors. *Urol Clin North Am.* 1999 Aug;26(3):595-609.
- 15) Slowikowska-Hilczler J, Szarras-Czapnik M, Kula K. Testicular pathology in 46,XY dysgenetic male pseudohermaphroditism: An approach to pathogenesis of testis cancer. *J Androl* 2001; 22:781-792

- 16) Parkinson MC, Ramani P .Intratubular germ cell neoplasia in an infantile testis. *Histopathology*. 1993 Jul;23(1):99-100.
- 17) Oosterhuis JW, Looijenga LH. Pathobiology of testicular germ cell tumours: an update. *Histopathology* 2002; 41(Suppl. 2): 388-396
- 18) Renedo DE, Trainer TD. Intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) with p53 and PCNA expression and adjacent mature teratoma in an infant testis. An immunohistochemical and morphologic study with a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 1994 Sep;18(9):947-52.
- 19) Loftus BM, Gilmartin LG, O'Brien MJ, Carney DN, Dervan PA. Intratubular germ cell neoplasia of the testis: identification by placental alkaline phosphatase immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region quantification. *Hum Pathol*. 1990 Sep;21(9):941-8.
- 20) Bartlett NL, Freiha FS, Torti FM. Serum markers in germ cell neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991 Dec;5(6):1245-60.
- 21) Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update*. 1999 Sep-Oct;5(5):535-45.
- 22) Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1643-7.
- 23) Meyts ER, Jørgensen N, Müller J, Skakkebaek NE. Prolonged expression of the c-kit receptor in germ cells of intersex fetal testes. *J Pathol*. 1996 Feb;178(2):166-9.
- 24) Cools M, Van Aerde K, Kersemaekers AM, Boter M, Drop SLS, Wolffenbuttel K, Steyerberg EW, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5295-5303
- 25) Davenport M, Brain C, Vandenberg C, Zappala S, Duffy P, Ransley PG, Grant D. The use of the hCG stimulation test in the endocrine evaluation of cryptorchidism. *Br J Urol*. 1995 Dec;76(6):790-4.