

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Biomedicina



**EVOLUCIÓN Y ORIGEN DE TUMORES DE
CÉLULAS GERMINALES DESARROLLADOS SOBRE
NEOPLASIAS SOMÁTICAS EN EL TRACTO
GENITAL FEMENINO**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Maolly Lucette Schuldt Cruz

Bajo la dirección de:

Prof. Dr. Francisco Nogales Fernández

Prof. Dr. Miguel Cecilio Botella López

Granada, enero de 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Maolly Lucette Schuldt Cruz
ISBN: 978-84-1306-160-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55497>

Dedicatoria

A la mejor persona que conozco: Fabián.

Agradecimiento

A todos los que me han brindado su aliento y apoyo “más allá del deber”.

He contado con grandes amigos e inesperados confidentes, pero sobre todo con profesores sabios y generosos a ambos lados del océano. Gracias por su inmensa confianza en mí, porque ha sido precisamente esa confianza la que me sostuvo cuando dudé.

Contenido

Abreviaturas utilizadas en esta tesis.....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	16
Marco Teórico.....	18
Tumores de células germinales	18
Fundamentos y antecedentes.....	18
Clasificación de los tumores de Células Germinales.....	20
Clasificación de los Tumores de Células Germinales Testiculares.....	20
Clasificación de los Tumores de Células Germinales Ováricos	23
Las células madre en relación con la histogénesis de los tumores de células germinales	27
<i>Célula Madre Omnipotente</i>	28
<i>Células Madre Totipotentes</i>	29
<i>Células Madre Pluripotentes</i>	30
<i>Células Madre Multipotentes</i>	31
Los Tumores de Células Germinales en función del potencial de desarrollo de su célula de origen	33
<i>Tipo 0 de tumores de células germinales</i>	33
<i>Tipo I de tumores de células germinales</i>	34
<i>Tipo II de tumores de células germinales</i>	34
<i>Tipo III de tumores de células germinales</i>	36
<i>Tipo IV de tumores de células germinales</i>	36
<i>Tipo V de tumores de células germinales</i>	37
<i>Tipo VI de tumores de células germinales</i>	38
Formas especiales: Tumores de tipo VI. Tumores de Células Germinales desarrollados sobre Tumores Somáticos Müllerianos (TCG-TSM) en el Tracto Genital Femenino	41
Tumores de Tipo VI de acuerdo a la asociación del componente somático y germinal ...	44
<i>Neoplasias endometrioides asociadas a tumor endodérmico primitivo</i>	44
<i>Carcinoma de células claras asociado a tumor endodérmico primitivo</i>	46
<i>Carcinoma endometrioide o CCC asociados a TEP/YST y otro tipo de TCG (Tumores polidiferenciados)</i>	48
Inmunohistocaracterización de los tumores germinales de tipo VI	49
Marcadores utilizados en el diagnóstico del componente germinal	49
Marcadores empleados en el diagnóstico del componente somático.....	52
Marcadores de pluripotencialidad	54

Objetivos	56
Hipótesis	57
Metodología	58
Materiales y métodos	58
Resultados.....	65
Resultados datos clínicos	68
Discusión	76
Conclusiones	86
Anexos	90
Publicaciones originales relacionadas con la presente tesis doctoral.....	90
GATA3 expression is present in primitive patterns of Yolk Sac Tumors but is not expressed by differentiated variants.....	90
Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma	97
Germ cell tumor growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favoring their origin from somatic stem cells	116
Bibliografía	147

Abreviaturas utilizadas en esta tesis

TCG: Tumor de células germinales

CGP: Célula germinal primordial

IHQ: Inmunohistoquímica

CM: Célula madre

OMS: Organización Mundial de la Salud

TSM: Tumor somático mülleriano

TCG-TSM: Tumores de Células Germinales desarrollados sobre Tumores Somáticos Müllerianos.

IG: Impronta genética

ADN: Acido desoxirribonucleico

TEP: tumor endodérmico primitivo

TGF: Tracto genital femenino

CE: Carcinoma endometrial

CCC: Carcinoma de células claras

Resumen

Introducción: Los tumores de células germinales constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias con histología, epidemiología y biología diversas entre sí. La clasificación más reciente considerando estas diferencias, cataloga a los tumores de células germinales no solo por su aspecto morfológico, sino a partir del potencial de desarrollo de la célula madre que da origen a cada tipo tumoral. Las categorías que se desarrollan en el ovario son: I, II, IV y VI.

Los tumores de células germinales de Tipo VI, objeto de estudio del presente trabajo, se desarrollan sobre tumores somáticos müllerianos en el tracto genital femenino. La célula que los origina es una célula madre somática, habitualmente maligna, que ha recuperado características de pluripotencialidad.

Debido a que su identificación desde el punto de vista patológico es difícil por la similitud citológica y arquitectural de los elementos somáticos y germinales, se requiere el empleo de un amplio panel de marcadores inmunohistoquímicos para un correcto discrimen. En este trabajo hemos evaluado la utilidad de diversos marcadores y su aplicabilidad.

Así, encontramos que SALL4, Villina, GATA3, AFP, HepPar 1 y GPC3 son útiles en la detección del componente germinal, que invariablemente incluye tumor endodérmico primitivo. Por otra parte, citoqueratina 7, EMA, Napsin A, HNF-1 β y

PAX8 orientan en la identificación de la neoplasia somática. Se incorporó además OCT4 para detectar nichos de células que hayan recuperado la expresión de marcadores de pluripotencialidad.

Comprobar la existencia de dichas células sustenta la hipótesis del origen de la segunda estirpe tumoral germinal en el contexto de una neoplasia somática, a partir de células madres malignas originadas en el mismo tumor.

Objetivo:

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral es:

Caracterizar histopatológica e inmunopatológicamente, así como mediante estudios citogenéticos, la rara asociación existente en mujeres postmenopáusicas, de tumores somáticos müllerianos con patrones tumorales de tumor de células germinales habituales en pacientes jóvenes.

Materiales y métodos:

Debido a la rareza de estas neoplasias, este estudio es el resultado de una colaboración entre nuestro departamento y distintos centros europeos de excelencia que contribuyeron con casos para su análisis, entre ellos: Barcelona (Hospitales de San Pablo y Belvitge), Belfast (Queens University) (RU), Londres (Hammersmith Hospital) (RU), Rotterdam (Universidad Erasmus) (Países Bajos) y Universidad de

l'Aquila (Italia), lo que dio lugar a la mayor serie publicada hasta el momento respecto a este tipo de tumores.

En cuanto a las técnicas de inmunohistoquímica, se siguieron los procedimientos recomendados por el proveedor de los anticuerpos empleados (Master Diagnóstica), realizándose cortes de 3-4 *um* de muestras de tejido tumoral previamente fijado en formalina tamponada al 10% e incluido en parafina. Todas las pruebas se realizaron con el mismo coloreador automático ThermoScientific Autostainer 480S. La lectura de los resultados la realizó la doctoranda en una primera instancia y en una segunda, el director supervisó y aprobó los resultados.

En el caso de los tumores polidiferenciados que presentaron además de tumor endodérmico primitivo otro tipo de tumor de célula germinal, se investigaron alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma 12p mediante técnica de hibridación in situ (FISH). La lectura y el reporte se efectuaron en el Hospital Belvitge de Barcelona

Resultados

El desarrollo de nuestros planteamientos nos permitió publicar 3 artículos originales y colaborar en el capítulo de un libro de alto impacto en el área de tumores germinales:

1. **Schuldt M**, Rubio A, Preda O, Nogales FF. GATA binding protein 3 expression is present in primitive patterns of yolk sac tumours but is not expressed by differentiated variants. Histopathology. 2016 Mar;68(4):613-5

IF: 3.523 Q1

2. Retamero, JA. **Schuldt, M.D**, Nogales, F.F. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Carcinoma. AJSP: reviews & reports. 2016 Jul/Aug 21(4): 189-94

IF:4.592

3. Nogales FF, Prat J, **Schuldt M**, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Histopathology. 2018 Mar;72(4):634-647

IF:3.523 Q1

4. Nogales FF and **Schuldt M**. Germ Cell Tumours in the Female Genital Tract en Nogales, FF and Jimenez R (Editor). Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. Springer Verlag, Heidelberg and New York 2017. (**8222** descargas desde su publicación según bookmetrix team de Springer)

Concretamente, los resultados de la primera fase del estudio demostraron que GATA3 se expresa en los patrones primitivos clásicos de TEP/YST. Sin embargo,

es negativo en las menos frecuentes áreas diferenciadas somáticas, tanto glandulares como hepatoides y en las formas sólidas. Estos datos modifican lo que se conocía hasta el momento respecto a la utilidad de este marcador en el diagnóstico diferencial de neoplasias somáticas y germinales.

En las fases posteriores de este trabajo científico, producto de las cuales se publicaron el segundo y tercer artículo, los resultados demostraron lo siguiente: la edad de las pacientes osciló entre 37-94 años. Exceptuando a dos pacientes, todas eran postmenopáusicas, y la localización más común fue el ovario, involucrando más raramente el endometrio.

El estadio de la enfermedad se estableció de acuerdo a las recomendaciones de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Determinándose que estaban presentes estadios avanzados, pues entre las pacientes cuatro se hallaban en estadio III y una en estadio IV.

A nivel macroscópico, los tumores fueron voluminosos con medidas de entre 2 a 20 cm. Predominaron las áreas sólidas, aunque con presencia de zonas quísticas, hemorragia y necrosis.

Microscópicamente, en cuanto al componente somático los casos estudiados incluían carcinoma de células claras y/o carcinoma endometriode. Dentro de las

condiciones somáticas no malignas, destacó la frecuente vinculación con endometriosis.

Por su parte el componente germinal incluyó invariablemente tumor endodérmico primitivo, siendo el patrón diferenciado glandular el más común. Los otros tipos de tumores de células germinales se presentaron en combinación con este, exceptuando al disgerminoma, que no forma parte de estas asociaciones.

El análisis de las pruebas de inmunohistoquímica demostró que varios marcadores tradicionalmente empleados para el diagnóstico diferencial de tumores endodérmicos primitivos y carcinoma de células claras, son coexpresados por ambas formas tumorales. Es el caso de HNF1- β , CK7 y EMA, expresados en carcinomas y en las áreas glandulares de los tumores endodérmicos primitivos. Cabe recalcar, sin embargo, que el patrón de tinción fue distinto, siendo intenso y difuso en los primeros, mientras que los segundos presentaron una tinción focal.

La expresión de marcadores endodérmicos también se observó simultáneamente en ambos tipos de neoplasias. GLP3 y Gata3 fueron positivos en algunas áreas somáticas, si bien en las áreas clásicas del tumor endodérmico primitivo hubo una inmunomarcación más intensa.

Por otra parte, ciertos marcadores mostraron gran especificidad para uno de los componentes. Es el caso de Napsin-A y PAX8 que se expresaron únicamente en los carcinomas, mientras que los marcadores endodérmicos SALL4, villina, AFP y HepPar-1, fueron consistentemente negativos en todos los CCCs y positivos en casi la totalidad de los tumores endodérmicos primitivos de patrón glandular.

Conclusiones:

1. Los tumores germinales desarrollados sobre neoplasias somáticas müllerianas en el tracto genital femenino, son neoplasias agresivas, frecuentemente diagnosticadas en estadios clínicos avanzados y ocurren tanto en ovario como en endometrio. La asociación más frecuente es carcinoma endometriode y tumor endodérmico primitivo, pero también pueden ocurrir en relación con carcinoma de células claras.
2. Hay una considerable superposición morfológica entre los componentes germinales y somáticos, lo que hace necesario el empleo de un panel de marcadores inmunohistoquímicos que permita diferenciarlos. Los marcadores tradicionalmente utilizados para ello, tales como CK7, EMA y HNF1, no son útiles debido a la coexpresión que se observa en los epitelios somáticos y el componente glandular diferenciado de los tumores endodérmicos primitivos. No obstante, hemos demostrado que pueden usarse otros anticuerpos. Así, la expresión de Napsin-A se limita a los componentes somáticos y está ausente en todos los tumores endodérmicos.

Adicionalmente, PAX8 un marcador mülleriano por excelencia, mostró la misma consistencia en sus resultados.

3. En el caso del componente germinal, el panel de marcadores inmunohistoquímicos endodérmicos es amplio e incluye: SALL4, villina, GATA3, AFP y GPC3. Sin embargo, debemos tener presente que la mayoría de tumores endodérmicos primitivos podrán ser reconocidos empleando un panel reducido formado únicamente por SALL4 y villina
4. Los tumores de células germinales de tipo VI presentan en el componente somático una población celular de apariencia indiferenciada con una peculiar expresión de anticuerpos asociados a pluripotencia como OCT4. Proponemos que estas células representan iPSCs generadas espontáneamente por factores epigenéticos y que a partir de ellas se desarrolla el componente germinal.

Estas neoplasias tienen características de tumores germinales prepuberales, pero carecen de ganancia 12p. Se observaron componentes de tumor endodérmico primitivo asociado a neuroectodermo inmaduro. Y puede verse que en otras áreas, estas células indiferenciadas dan lugar a formaciones embrioides similares a las que ocurren en los tumores testiculares pospuberales, pero sin llegar a presentar un inmunofenotipo completo de carcinoma embrionario.

En suma, los tumores tipo VI no tienen un perfil único, sino que reproducen de un modo incompleto y aberrante, características presentes tanto en tumores germinales pediátricos de Tipo I, como testiculares pospuberales.

Introducción

Los tumores de células germinales (TCGs) constituyen uno de los grupos más diversos de neoplasias y tanto a nivel histológico como clínico, muestran una amplia diversidad que vuelve apasionante su estudio.

Tradicionalmente los TCGs han sido clasificados atendiendo sobre todo a su aspecto morfológico y no a sus características biológicas, evolución o pronóstico. Su mayor prevalencia ha permanecido asociada a edades tempranas, sin embargo, todo esto está cambiando.

Recientes clasificaciones toman en cuenta aspectos más relevantes que la apariencia macroscópica o microscópica de estas lesiones y se centran en la potencialidad de desarrollo de la célula que da origen a cada tumor, lo cual permite explicar su comportamiento biológico y singular epidemiología. A la par de estos avances, las técnicas de inmunohistoquímica han aumentado en número y especificidad, permitiendo reconocer de manera objetiva y reproducible las variedades de TCGs, así como la presencia de componentes asociados.

Dentro de este contexto se desarrolla el presente trabajo científico, el cual profundiza en el menos conocido de los tipos de TCGs, los tumores de tipo VI. Estos tumores representan una asociación en la cual un TCG se desarrolla junto a

un componente neoplásico somático. Existen grandes diferencias entre este grupo de TCG y otras variantes, destacando su epidemiología. Específicamente, en el tracto genital femenino aparecen más frecuentemente en mujeres postmenopáusicas, un grupo etario en el cual son excepcionales otras formas de TCGs.

El estadio clínico al momento del diagnóstico y el pronóstico de estas neoplasias son ominosos. Además, la complejidad de su histología hace más difícil su correcta identificación, lo que obliga a emplear un panel inmunohistoquímico amplio, que permita reconocer los componentes tanto germinales como somáticos; los cuales como veremos en el desarrollo de este documento, muestran semejanzas histológicas significativas que complican aún más el escenario histopatológico.

Marco Teórico

Tumores de células germinales

Fundamentos y antecedentes

Los tumores de células germinales (TCGs) constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo de neoplasias cuyo origen ha sido atribuido a la célula germinal primordial (CGP). Esta célula posee capacidad para diferenciarse en una amplia variedad de tejidos en sus diversos estadios, pudiendo alcanzar diferenciación y maduración completa, como ocurre en los teratomas maduros.

No obstante, esta posibilidad de origen no explica el por qué estos tumores se pueden localizar a veces en sitios alejados de las zonas habituales de presencia de dichas células (gónadas y línea media) o bien, en personas ancianas donde la posibilidad de su existencia es nula. Por ello, hoy se tiende a pensar que se producen a partir de células que poseen distintos niveles de potencia de diferenciación, independientemente de que sean de línea germinal o células madre somáticas (1).

Dadas sus curiosas características los TCGs han sido reseñados desde épocas muy tempranas (2) por figuras tales como la del padre de la Anatomía Patológica, Giovanni Battista Morgagni (3). Los teratomas fueron los que concitaron la mayor

atención, probablemente debido a su diverso y peculiar aspecto macroscópico y a sus inesperados síntomas, como la tricóptisis (4) o la pilimicción (5).

Sin embargo, la mayor parte de estos reportes se limitaban a comunicar casos anecdóticos, ya que el vago entendimiento de la enfermedad y los procesos neoplásicos por aquel entonces, limitaba los avances de estos pioneros.

Respecto a las localizaciones más frecuentes de los TCGs, estas son las gónadas, tanto femeninas (ovarios), como masculinas (testículos). Pero también ocurren en diversos sitios extragonadales, comunicándose casos en mediastino (6), sistema nervioso central (7), orbita (8), cavidad oral, nasal y senos paranasales (9, 10), glándula tiroides (11), parótida (12), pulmón (4), estómago (13), bazo (14), páncreas (15), hígado (16), glándula adrenal (17), riñón (18), próstata, vesículas seminales (19) y vejiga (20). Otras localizaciones más infrecuentes incluyen apéndice cecal (21), vesícula biliar (22), intestino delgado (23) , colon (24) y otras muchas (25-28).

Aunque la mayor parte de estos tumores sigue ocurriendo en niños y adultos jóvenes de ambos sexos (29, 30), en el caso de los TCGs femeninos se observan dos picos de incidencia adicionales en edades más avanzadas. Esto demuestra que conforme evolucionen la sociedad y su demografía, también lo hará la epidemiología de los TCGs.

El primer pico adicional, que aparece alrededor de la quinta década de la vida, podría explicarse como resultado de la degeneración maligna de teratomas maduros

de larga data. Mientras el segundo, que ocurre en la sexta-séptima década correspondería a una nueva categoría de tumores de células germinales desarrollados sobre tumores somáticos Mülllerianos (TCG-TSM), un tipo de tumor recientemente reconocido como entidad particular y tema principal de este trabajo

Clasificación de los tumores de Células Germinales

Clasificación de los Tumores de Células Germinales Testiculares

Los primeros intentos modernos de clasificación histológica de los TCGs no se iniciaron hasta mediados del siglo pasado y se llevaron a cabo a partir del estudio de pacientes masculinos (31). Friedman y Moore realizaron el examen de 900 testículos operados durante el período de la Segunda Guerra Mundial dando lugar a una contribución decisiva (31, 32). En aquella investigación afirmaban que el 96% de los tumores testiculares podían ser clasificados dentro de los siguientes 4 grupos: seminoma, carcinoma embrionario (con el subgrupo coriocarcinoma), teratoma y teratocarcinoma (32).

Uno de sus aportes más significativos fue identificar al carcinoma embrionario como una entidad distinta del seminoma y como recalca Damjanov, reconocer su capacidad de diferenciarse, dando lugar a coriocarcinomas, teratomas y tumores mixtos (31).

Acogiendo este pensamiento, Barry Pierce propuso una idea revolucionaria: que los TCGs representan una caricatura del desarrollo embrionario normal y tienen su origen en una sola célula con características de célula madre (CM) (33). Posteriormente, el mismo investigador demostró de manera experimental que las células del carcinoma embrionario se comportan individualmente como CM originando los demás componentes tisulares presentes en los TCGs (34).

Pese a estos descubrimientos, continuó empleándose la clasificación de Friedman y Nixon que fue modificada por primera vez en 1952 (31) por Dixon y Moore (35) al proponer dos vías histológicas: la primera, la constituían los tumores seminomatosos sin capacidad de diferenciación posterior y la segunda, el carcinoma embrionario como precursor de los teratomas y coriocarcinomas. Esta clasificación se mantuvo vigente durante décadas, aunque con sucesivos cambios (31, 36).

Más adelante, Skakkebaek (37, 38) tras reconocer espermatogonias anormales en biopsias testiculares de hombres investigados por esterilidad, y que luego desarrollaron TCGs, introdujo la noción de lo que actualmente denominamos Neoplasia In Situ de Células Germinales, la cual se incorporó como lesión precursora en la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los TCGs del testículo (Tabla 1) (39).

En 2005 Oosterhuis y Looijenga (40) plantearon una nueva propuesta basada en el potencial de desarrollo de la célula a partir de la cual se originan los TCGs, separándolos en 5 categorías. Hay que destacar que esta clasificación fue la primera

que tomó en cuenta no solo las características morfológicas, sino también la biología, diferencias clínicas y epidemiológicas existentes dentro de este grupo de tumores. Se retoma así la idea del profesor Pierce respecto al papel de las CM en el desarrollo de los TCGs.

Tabla 1

Clasificación de los Tumores de Células Germinales Testiculares, OMS 2016

Tumores de Células Germinales derivados de neoplasia In Situ de Células Germinales

Neoplasia de células germinales no invasiva

Neoplasia de células germinales In Situ

Formas específicas de neoplasias de células germinales intratubulares

Tumores de un solo tipo histológico (formas puras)

Seminoma

Seminoma con células sincitiotrofoblásticas

Tumores de células germinales no seminomatosos

Carcinoma embrionario

Tumor endodérmico primitivo tipo postpuberal

Tumores que contienen elementos de células germinales y de cordones sexuales

Gonadoblastoma

Tumores misceláneos del testículo

Tumores epiteliales de tipo ovárico.

Fuente: Moch H, Humphrey P, Ubright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Bosman FT, Jaffe ES, Lkhani SR, Ohgaki H, editors. Lyon: IARC; 2016.

Clasificación de los Tumores de Células Germinales Ováricos

Desde el punto de vista morfológico y en términos de su clasificación, los tumores de ovario se han considerado equivalentes a sus homólogos testiculares. No obstante, existen importantes variaciones clínicas y biológicas (41) que han sugerido siempre una histogénesis distinta.

Durante los últimos años el avance en los conocimientos sobre la regulación celular y el desarrollo tisular, han permitido una mejor comprensión del origen de los TCGs, fortaleciendo el concepto de la CM como progenitora tumoral. A pesar de ello, la clasificación vigente de acuerdo a la OMS (Tabla 2) aún se basa en el modelo hipotético de histogénesis propuesto por Teillum en la década de los setenta (42), el cual no contempla el origen celular o biología y por ello es de limitada utilidad clínico-patológica.

Recientemente en 2017, la clasificación de los TCGs ováricos de Oosterhuis (Tabla 3), basada en el potencial de desarrollo de la CM de origen (40) fue publicada con una importante modificación (1); pues reconoce un nuevo tipo de TCG, el tipo VI. Este grupo de tumores aparece con mayor frecuencia en el ovario de mujeres postmenopáusicas y representa TCGs desarrollados sobre tumores somáticos müllerianos (TSM), a partir de células madre que han recuperado su potencial de desarrollo en diversos grados.

Tabla 2

Clasificación de los Tumores de Células Germinales Ováricos, OMS 2014

Tumores de células germinales

Disgerminoma

Tumor del seno endodérmico

Carcinoma embrionario

Coriocarcinoma no gestacional

Teratoma maduro

Teratoma

Tumores germinales mixtos

Fuente: FemPrat J, Cao D, Carinelli SG, Nogales FF, Vang R, Zaloudek CJ. Germ Cell Tumours. WHO classification of Tumours oale Reproductive Organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.

Tabla 3

Clasificación de los tumores de células germinales de acuerdo al potencial de desarrollo de la célula de origen								
Type GCT	Edad (años)	Sexo	Sitio Anatómico	Fenotipo/potencial de desarrollo	Estado de desarrollo	Célula precursora	Impronta genética: metilación	Cariotipo
0	Neonatos	F/M	Retroperitoneo, sacro, cráneo, paladar duro	Epignatus, gemelos parasíticos	Omnipotente	Blastomero	Biparental	Diploide
I	Neonatos y niños <6; raros después de la infancia	F/M	Testículos, ovario, sacro, retroperitoneo, mediastino anterior, cerebro, otras localizaciones de la línea media	Teratoma inmaduro, tumor endodérmico primitivo (TEP/YST)	Pluripotente	CGP/Gonocito metilado	Biparental o parcialmente borrada	Teratoma (diploide) TEP/YST aneuploide. Ganancia: 1q,12 (p13),20q Pérdida: 1p, 4, 6q
II	Después de la pubertad. En relación con disgenesias gonadales, Sd de Klinefelter y Sd de Down, raros casos antes de la pubertad.	Predominantemente M	Gónadas disgenéticas, ovario, testículo, mediastino anterior, timo, cerebro (glándula pineal)	Seminoma/disgerminoma/germinoma Reprogramaciones no seminomatosas	Naïve cell. Totipotente	CGP/Gonocito hipometilado	Borrada	Aneuloide(+/- triploide) Ganancia: X,7,8,12p,21 Pérdida: Y,1p,11,13,18 En mediastino diploide y en línea media de cerebro tetraploide con ganancia de 12p
III	Hombres usualmente mayores de 55 años	M	Testículo	Tumor espermatocítico	Espermatogonia a espermatocito premeiotico	Espermatogonia /espermatocito	Parcial o completamente paterna	Ganancia:9

IV	Después de la pubertad	F	Ovario	Teratoma maduro	Maternalmente improntado. Estadio 2C	Oogonia/ocito	Parcial o completamente materna	Diploide/tetraploide/peritriploide Ganancia: X, 7, 12, 15
V	Después de la pubertad	F	Útero/ placenta	Mola hidatidiforme	Paternalmente improntado. Estadio 2C	Huevo vacío/espermatozoo	Completamente paterna	Diploide (XX y XY)
VI	Pacientes usualmente sobre los 60 años	F/M	Ovario y sitios atípicos para TCG	Semejantes a los tumores tipo I y componentes no seminomatosos del tipo II		Célula somática pluripotente inducida	Patrón de la célula de origen	Depende de la célula precursora

Fuente: Oosterhuis JWal, L. Germ Cell Tumors from a Developmental Perspective: Cell origin, Pathogenesis, and Molecular Biology (Emerging Patterns). In: F N, editor. Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. Germany: Springer; 2017.

Las células madre en relación con la histogénesis de los tumores de células germinales

Las CM son células indiferenciadas (1, 43, 44) que tienen la capacidad de autorrenovarse por mitosis dando origen a otras CM, pero que también son capaces de diferenciarse, es decir, originar células distintas y más maduras. Según su fuente de origen, las CM son consideradas como embrionarias o adultas. Mientras que se clasifican y denominan de acuerdo a su potencial de desarrollo (45, 46).

Y ha sido precisamente el rápido avance en el campo del estudio de las CM, el que ha propiciado el surgimiento de una variedad de términos que no solo crean confusión, si no que pueden tener implicaciones en los campos ético y legal (47). Diversos autores utilizan como intercambiables los términos: omnipotente, totipotente, pluripotente y multipotente. Sin embargo, más allá de las connotaciones lingüísticas, cada uno de ellos representa a una CM con un potencial de desarrollo diferente.

Es necesario tener presente que, para poder comprender, comparar y evaluar apropiadamente investigaciones científicas, debemos tener claro el tipo de CM a la que se refiere cada estudio en concreto, siendo esta quizás la razón más importante para impulsar la homologación de la terminología en el ambiente académico.

En este momento en el que se alienta la especificidad en la nomenclatura, la mayoría de los autores están de acuerdo con clasificar a las CM según su potencial de

diferenciación (1, 47). A continuación, haremos una breve revisión de la terminología vigente.

Célula Madre Omnipotente: Este término se reserva exclusivamente para aquellas células que tienen el potencial de diferenciarse en todos los tipos celulares, pero que carecen de la capacidad para orquestar el desarrollo de un organismo autónomo o embrión (47).

Únicamente el cigoto y los blastómeros resultantes de sus primeras divisiones (1), (hasta ocho células en los humanos y dos en el caso de los ratones), previamente a que ocurra el “borramiento” de la impronta genética (IG) de los padres y expresen marcadores como OCT4 y SOX2 (1, 48), son auténticas CM omnipotentes.

La IG es un fenómeno que aunque infrecuente en mamíferos, es responsable de ciertas enfermedades (49) y desarrollos tumorales en los humanos (47, 50). Este proceso determina la expresión monoparental de un gen, de manera que el otro alelo queda silenciado y en cuanto a su funcionalidad se comporta como un gen haploide (51). Puede ocurrir por dos mecanismos: bien por la metilación del ADN o por la modificación de las histonas (51).

La metilación del ADN es un proceso por el cual se añaden grupos metilo al ADN, modificando la función del gen. Generalmente, la metilación busca reprimir una expresión génica y es fundamental en la gametogénesis (52). Sin embargo, es un proceso dinámico y la expresión de ciertos genes “improntados” puede recuperarse

en la descendencia. Tal como ocurre con la impronta materna y paterna en las células de la línea germinal durante oogénesis y espermatogénesis respectivamente (1).

En cuanto a la modificación de las histonas, proteínas que condensan el ADN en los cromosomas, esta desempeña un papel relevante en la expresión génica, pudiendo ocurrir tres fenómenos que produzcan cambios: metilación, acetilación y fosforilación (53) .

Posteriormente al estadio de blastómero, las CM embrionarias van sufriendo restricciones sucesivas de potencialidad que conducen finalmente a su especialización.

Células Madre Totipotentes: La totipotencia indica la capacidad de producir todos los linajes celulares: embrionarios, adultos y componentes extraembrionarios, tales como la placenta. (47).

Son totipotentes las células madre embrionarias del macizo celular interno (47), posteriormente a la desaparición de las improntas paterna y materna. La diferencia clave de las CM totipotentes, radica en que además de ser capaces de dar origen a todos los tipos celulares, han adquirido las competencias necesarias para organizar el desarrollo de un embrión con potencial para convertirse en un organismo autónomo (1, 47).

Células Madre Pluripotentes: El término pluripotente es el más empleado para referirse a las CM y por lo tanto el que más ha contribuido a la disparidad de conceptos. Las CM pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula derivada de una de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (47). Sin embargo, por si solas no pueden dirigir el desarrollo de un embrión potencialmente autónomo. Además, si bien contribuyen a todos los linajes somáticos, no dan origen a tejidos extraembrionarios (1).

Mención aparte merecen las células madre pluripotentes inducidas, conocidas por sus siglas en inglés: iPSC (induced Pluripotent Stem Cell), que pueden ocurrir de modo espontáneo o bien artificialmente a partir de células somáticas ya diferenciadas, mediante la inducción de factores de pluripotencia (1).

Los primeros comunicados sobre iPSC se realizaron en el año 2006, cuando introduciendo y forzando la expresión de los factores de transcripción de pluripotencialidad tales como OCT4, SOX2, KLF4 y c-Myc (54), se logró inducir la pluripotencia en cultivos de células fibroblásticas adultas de ratón. Demostrándose que estas recuperaban el potencial de desarrollo de las CM embrionarias, así como la expresión de los genes correspondientes y la capacidad para formar tejidos derivados de las tres capas tisulares primitivas.

Este adelanto enriqueció el terreno de la investigación médica al proporcionar una fuente de CM generadas artificialmente a partir de células somáticas adultas

reprogramadas. Las iPSC fueron recibidas al mismo tiempo con entusiasmo y preocupación por la comunidad científica, sobre todo por la posibilidad de que retuvieran características epigenéticas no deseables provenientes de la célula de origen, así como por las dudas relativas a su maleabilidad (55).

En la actualidad, más de 10 años después de ocurrido este hito, la expectativa sigue creciendo y las iPSCs han demostrado ser más maleables de lo que en un inicio se creía. Continúan siendo empleadas en los estudios de modelos de enfermedad (56), desarrollo de drogas y terapias (57, 58), medicina regenerativa y sobre todo, son una valiosa herramienta para el entendimiento de la regulación de los genes.

Células Madre Multipotentes: Las CM multipotentes representan un estadio de diferenciación posterior, en el cual el potencial del desarrollo se haya aún más restringido. Corresponden a las células progenitoras capaces de dar origen a múltiples, pero limitados, tipos celulares. Tal es el caso de la CM multipotente hematopoyética, que da lugar precursores de las series blanca, roja y megacariocitos (59). Se han descrito ocasionalmente CM multipotentes que pueden en determinadas condiciones, dar origen a células distintas a sus descendientes naturales, tales como neuronas que han sido obtenidas a partir de CM estromales mesenquimales (60).

Las CM multipotentes se encuentran en una diversidad de tejidos, entre ellos: tejido adiposo (61, 62), médula ósea (59, 63), cordón umbilical (64), pulpa dental (65), dermis fetal (66) y tejido linfoide (67).

Finalmente, con un potencial de desarrollo mucho menor, están las CM *oligopotentes y unipotentes* capaces de dar origen a pocos tipos celulares y a uno solo, respectivamente.

Cabe recalcar que estas definiciones se refieren a la capacidad celular en el medio ambiente adecuado, pues diversas causas epigenéticas (68, 69) pueden conducir a alteraciones que modifiquen el potencial de desarrollo y que experimentalmente han desembocado en la formación de TCGs (70).

En la actualidad, existen estudios que sugieren que pronósticos más pobres en la evolución de ciertos tumores de tipo adulto, podrían explicarse debido a la presencia de células en estadio primitivo que conservan la expresión de genes de pluripotencialidad (71). Este hecho confirma la plasticidad celular y la posibilidad de reprogramación mediante cambios de la matriz extracelular (72), lo cual está conduciendo a una nueva visión de las clasificaciones tumorales, basada en la perspectiva genética, más que en la morfología (73, 74) .

Por lo tanto, es preciso recordar que el producto de una célula y su potencial de desarrollo no dependen exclusivamente de la secuencia genética, sino también de la influencia de condiciones ambientales y distintos factores, algunos probablemente autónomos y otros resultado del impacto epigenético (75, 76).

Los Tumores de Células Germinales en función del potencial de desarrollo de su célula de origen

La heterogeneidad tanto macroscópica como microscópica de los TCGs ha desconcertado a los estudiosos durante siglos, convirtiendo en un desafío los intentos para categorizarlos. Pese a ello, las clasificaciones más conocidas y empleadas hasta el presente, han sido realizadas precisamente en base a la morfología y no alcanzan a explicar las importantes diferencias que existen entre los distintos grupos de TCGs.

Como contrapartida, la clasificación propuesta por Oosterhuis (1, 40) se fundamenta en la célula que da origen a cada tipo de tumor y su potencial de desarrollo, explicando a partir de ello la razón de sus diferencias epidemiológicas, topográficas, pronósticas, etc. En esta clasificación actualmente se reconocen siete categorías:

Tipo 0 de tumores de células germinales: Se trata de tumores excepcionalmente infrecuentes, que incluyen entidades como gemelos parásitos (foetus in foeto) y epignatus (1, 77, 78). Ocurren en neonatos y aunque se localizan más a menudo en el retroperitoneo (79-81), han sido comunicados casos en cráneo (82), saco escrotal (83) y boca (84). Derivan de una *célula omnipotente*, por lo que su precursor es equivalente al blastómero antes de que sean borradas las improntas genéticas biparentales. El cariotipo es diploide (1).

Tipo I de tumores de células germinales: Este tipo de TCGs se diagnóstica en neonatos y niños menores de dos años. Los casos por encima de los seis años son infrecuentes (85). La mayoría se localizan en ovario, testículo, región sacra, retroperitoneo, mediastino y otras localizaciones de la línea media (41, 86).

Histológicamente corresponden a teratomas inmaduros y tumores endodérmicos primitivos (TEP) (53), habitualmente conocidos en razón a su difícil traducción al español (53), por su nombre en inglés: Yolk Sac Tumor (YST). Su célula precursora es *pluripotente*, equivalente a un gonocito metilado en el cual la impronta biparental está presente o parcialmente borrada. El cariotipo es diploide en el teratoma inmaduro y haploide en los TEP/YST (1). Los casos observados después de la etapa pospuberal, se solapan en el ovario con los correspondientes a tumores de tipo II y IV.

Tipo II de tumores de células germinales: Los TCGs de tipo II son tumores malignos que se presentan después de la pubertad y ocurren mucho más frecuentemente en hombres. Se originan a partir de *células germinales primitivas/gonocitos* neoplásicos (1).

A nivel cromosómico estos tumores presentan una vasta gama de alteraciones cariotípicas (1), que incluyen aneuploidía, diploidía, ganancias en el cromosoma X (7, 8,12p, 21) o pérdidas en el cromosoma Y (1p, 11, 13,18) (87). En el mediastino y el cerebro los TCGs tipo II pueden ser tetraploides. En tanto que las formas

invasivas muestran consistentemente ganancia en el cromosoma 12p, típicamente, isocromosoma 12p (88).

Este tipo de tumores es excepcional en mujeres con cariotipo normal 46XX, por lo que los casos reportados, requieren investigar posibles desordenes de la diferenciación sexual y excluir la presencia de material del cromosoma Y (41, 89). Histologicamente exhiben dos variantes: La primera la constituye el seminoma, neoplasia de células homogéneas, compuesta por elementos germinales primordiales/gonocitos, sin ningún otro potencial de desarrollo. Este tumor se localiza habitualmente en testículo (87), mediastino (90) y cerebro (91), donde se denomina germinoma; mientras que su semejante en el ovario se conoce como disgerminoma.

Por definición el tumor seminomatoso debe ser puro, pudiendo hasta en el 20% de los casos, contener focos de sincitiotrofoblasto (92), sin que ello cambie su carácter.

La segunda variedad de TCGs de tipo II ocurre cuando la CGP es reprogramada (*naive cell*) y adquiere el potencial de desarrollo de una CM totipotente. Esto hace posible el surgimiento de tumores que caricaturizan el desarrollo embrionario normal (93), dando lugar a TEP/YSTs, coriocarcinomas y teratomas.

El mecanismo de reprogramación de la CGP es aún desconocido, pero ocurre incluso en las localizaciones metastásicas de un tumor seminomatoso. Por esta

razón en un 40% de los sitios de extensión de la enfermedad se pueden detectar componentes no seminomatosos (1) ausentes en el tumor primario.

A menudo el componente no seminomatoso muestra una combinación de varios tipos histológicos de TCGs (1). El carcinoma embrionario está casi siempre presente, siendo sus derivados el TEP/YST y el coriocarcinoma. El hecho de que estos tejidos puedan ser a su vez reprogramados originando neoplasias de tipo somático (94), complica aún más el escenario de su ya difícil aspecto histológico.

Tipo III de tumores de células germinales: Esta neoplasia fue conocida como seminoma espermatocítico y es denominada en la actualidad, de acuerdo a la cuarta edición de la clasificación de la OMS como tumor espermatocítico (39).

Está constituida por elementos que morfológicamente recuerdan a las células germinales pospuberales masculinas y ocurre exclusivamente en el testículo, donde representa el 1-2% de los tumores (87). Su pico de incidencia se sitúa alrededor de los 55 años (95), no observándose asociaciones con ningún otro tipo de TCG (87). Deriva de la *espermatogonia/espermatocito premeióticos* con impronta genética parcial o completamente paterna y su cariotipo exhibe ganancia del cromosoma 9 (1).

Tipo IV de tumores de células germinales: Los TCGs de tipo IV se localizan exclusivamente en el ovario, derivando de *oocitos premeióticos*. Característicamente ocurren en la etapa pospuberal e histologicamente

corresponden a teratomas maduros. La IG de estos tumores es total o parcialmente materna y debido al potencial de desarrollo de la célula de origen (omnipotente/2C) (1), son capaces de producir elementos de cualquier linaje celular derivado de una de las capas tisulares primitivas. Se ha observado en teratomas maduros virtualmente todos los tipos de células adultas, al igual que sus contrapartes malignas, que se presentan en 1.5 a 3% de los casos (41).

La gran plasticidad de la célula precursora, determina que habitualmente estos tumores se hallen compuestos por una mezcla de tejidos. Las estructuras más frecuentemente descritas son la piel y los anexos cutáneos, pero es común observar además tejido adiposo, tiroideo, glial, músculo liso, cartílago y dientes, entre otros (41). Esporádicamente se ha comunicado la presencia de pituitaria (96-98), tejido mamario (99, 100), grasa parda (101), tejido prostático (102), glándulas sexuales masculinas accesorias (103), timo (104), estómago (105-107), segmentos intestinales (108, 109), células de Cajal (110, 111) y cerebelo (112, 113). El cariotipo puede ser diploide, diploide/tetraploide, o triploide (1).

Tipo V de tumores de células germinales: Los TCGs de tipo V ocurren invariablemente en el sexo femenino y después de la pubertad. A nivel histológico corresponden a la mola hidatiforme completa, que está constituida por tejido trofoblástico sin tejido embrionario (114). Se origina bien de un “huevo huero” o de un *espermatozoo*. La impronta genética de este tumor es solo paterna y presenta generalmente cariotipo diploide pudiendo raramente, ser tetraploide (1).

Es importante señalar que la hipótesis de identidad de tumor germinal de molas completas/incompletas/coriocarcinoma, no está aceptada por gran parte de la comunidad científica, ya que muchos interpretan estas lesiones como malformativas. Sería pues, un punto más de encuentro entre los TCGs y las malformaciones, cuyos límites pueden ser difusos.

Tipo VI de tumores de células germinales: Los TCGs de tipo VI han sido recientemente incluidos en la clasificación de Oosterhuis y Looijenga (1) y por definición, son TCGs desarrollados en asociación o sobre neoplasias somáticas. Su componente germinal corresponde a TCGs de tipos I y II, no existiendo nunca seminoma/germinoma (115). El componente somático es de derivación mülleriana y suele ser maligno (115).

La localización más frecuente es el tracto genital femenino (ovario y endometrio), (89) si bien se han comunicado casos en cabeza y cuello (116), estómago (117) y tracto urinario (118), generalmente localizaciones de la línea media o paramediales.

La célula que origina este tipo de TCG, es una *célula madre somática mutada* habitualmente maligna que ha recuperado su pluripotencialidad (41), es decir, una *célula madre pluripotente inducida (iPSC)*. Los mecanismos involucrados en la inducción de la pluripotencia en una célula somática adulta, parecen estar en relación con genes normalmente expresados en el desarrollo embrionario temprano, tales como SOX2, OCT4, NANOG (1) y con la sobreexpresión de genes reguladores como c-Myc (119).

Como se ha mencionado antes, la hipometilación o la pérdida de la metilación del ADN pueden resultar en la activación aberrante de algunos genes e inducción de pluripotencialidad (120). Por otra parte, la pérdida de la impronta genética es un fenómeno temprano y frecuente en una gran variedad de tumores humanos incluyendo el cáncer de ovario (1, 121-123), lo que podría explicar la aparición de estirpes tumorales germinales en tumores somáticos en esta localización.

Además, el daño cromosómico durante la reprogramación, la selección clonal, la expansión de colonias de iPSC, la acumulación de daños en el ADN, una regulación alterada de la impronta genética, es decir, cada uno de los pasos necesarios en el proceso de inducir la pluripotencialidad, intervienen también en la carcinogénesis. Por lo que las iPSC así originadas pueden contener aberraciones que resulten en una capacidad exagerada de renovación, que conlleve al desarrollo tumoral (1).

Este tipo de tumor germinal que tiene una particular relevancia en el tracto genital femenino, es el objeto de esta tesis, por lo que hemos desarrollado al respecto tres trabajos científicos:

1. El primero de ellos (124), publicado en *Histopathology* (IF 3.523) representa una aportación original en la valoración del *anticuerpo GATA3* de gran valor en el diagnóstico del componente de células germinales de los tumores de tipo VI.

Los siguientes trabajos, comprenden las mayores series publicadas de tumores de tipo VI:

2. Una aportación sobre su *asociación con carcinoma endometriode* (89) ha sido publicado en la sección de Case Reports del American Journal of Surgical Pathology, la revista original con un IF 5.878
3. El segundo (115), corresponde al material más extenso de la literatura de *asociación de carcinoma de células claras y tumores de células germinales* y representa una colaboración entre nuestro departamento y distintos centros europeos de excelencia en Barcelona (Hospitales de San Pablo y Belvitge), Belfast (Queens University) (RU), Londres (Hammersmith Hospital) (RU), Rotterdam (Universidad Erasmus) (Países Bajos), Universidad de l'Aquila (Italia), habiendo sido publicado este año en Histopathology (IF 3.523).
4. Base para la realización de esta tesis también ha sido el *capítulo de un libro de alto impacto*): Nogales FF and Schuldt M. *Germ Cell Tumours in the Female Genital Tract* en Nogales, FF and Jimenez R (Editor). Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. Springer Verlag, Heidelberg and New York 2017. ISBN: 978-3-662-53773-2 (Print) 978-3-662-53775-6 (Online) (**8222 descargas** desde su publicación en marzo del año pasado según **bookmetrix team** de Springer: <https://www.springer.com/gp/myspringer/book-publications>).

A continuación, profundizaremos en lo relativo a los tumores de células germinales de tipo VI.

Formas especiales: Tumores de tipo VI. Tumores de Células Germinales desarrollados sobre Tumores Somáticos Müllerianos (TCG-TSM) en el Tracto Genital Femenino

Los TCG-TSMs son un grupo infrecuente de neoplasias que se desarrollan secundariamente sobre tumores somáticos. En el tracto genital femenino los TCG-TSMs se localizan principalmente en el ovario (41, 89, 125), pero pueden encontrarse también en el endometrio (126).

Las entidades con las que se asocian son de derivación mülleriana, entre ellas, endometriosis (127), carcinoma endometrial (CE) bien diferenciado (89, 125), o de alto grado (128, 129), carcinoma de células claras (CCC) (115) y carcinosarcoma (130). Más raramente, pueden asociarse a carcinomas serosos (131) o mucinosos (132).

Aunque en la actualidad las comunicaciones sobre esta entidad son infrecuentes, esta situación podría cambiar al ser una neoplasia que afecta principalmente a mujeres alrededor de la séptima década de la vida. El envejecimiento progresivo de la población, particularmente en los países desarrollados, conllevará al incremento en la incidencia de los tumores relacionados con la edad, como los TCG-TSMs o los carcinomas endometriales de tipo II.

En términos demográficos, se espera que para el año 2030 casi el 30% de la población europea supere los 65 años y para 2080, que la pirámide poblacional se haya invertido, lo que resultará en un sustancial incremento en el número de personas sobre los 85 años (133). Esto implica que el escenario epidemiológico cambiará dentro del mediano plazo.

Otro factor a tomar en cuenta, es que probablemente muchos de estos tumores no estén siendo diagnosticados como tales, por una parte, debido a su rareza y por otra a causa de la dificultad que plantean para su identificación anatomopatológica. En algunos casos el sobrecrecimiento del componente germinal puede llegar a oscurecer la histología del componente somático y volverlo poco detectable en las preparaciones histológicas rutinarias.

Este infradiagnóstico repercute por supuesto en los campos clínico y terapéutico, lo que se torna especialmente grave debido a que se trata de lesiones con conducta agresiva, que suelen ser detectadas en estadios avanzados de la enfermedad (41).

Como se señaló previamente, estos tumores se originan a expensas de una CM somática reprogramada que adquiere el potencial de una iPSC. Para que esta reprogramación, que también ha sido referida con los términos *neometaplasia* (128) y “*retrodiferenciación*”(128, 134) tenga lugar, es necesario además de la activación de los marcadores de inmadurez y expresión de los oncogenes, un ambiente celular propicio para el desarrollo de esta célula mutada.

Cabe recordar que las mutaciones celulares ocurren frecuentemente en los tejidos humanos, pero la mayoría de estas células alteradas mueren y solo un pequeño porcentaje sobrevive alcanzando estadios de célula madre pluripotente (CMP) (134).

Cuando estas iPSCs tienen perturbadas las funciones de renovación y programación de la muerte celular (apoptosis) prosperan anormalmente, ocurriendo el desarrollo tumoral, de manera habitual en el contexto de un ambiente inflamatorio. Aún no se conocen con certeza los mecanismos que seleccionan a estas células, ni la forma exacta de como la inflamación induce la formación de una CMP somática tumoral. Los factores que desembocan en esta pluripotencia inducida, probablemente sean de origen epigenético.

Tomando en cuenta la avanzada edad de la mayoría de las pacientes, la pérdida progresiva de la metilación del ADN (135) podría conducir a activaciones genéticas aberrantes. Concretamente, en el ovario la pérdida de la impronta genética, particularmente de H19 y IGF-II, ha sido relacionada con tumores epiteliales (136). A esto se suman la probable contribución de los cambios en el microambiente celular producidos por la propia neoplasia somática (137).

Lo que es un hecho, es que la presencia de elementos con características de CMP ha sido demostrada con anterioridad en el tracto genital femenino en tumores somáticos malignos como carcinosarcoma (138), carcinoma endometriode (139),

carcinoma de células claras (140) y en ciertas condiciones como la endometriosis (141).

Por otra parte, experimentalmente se ha podido llegar aún más lejos, consiguiendo células capaces de dar lugar a estructuras semejantes a cuerpos embrioides y blastocistos, a partir de células de la superficie ovárica de mujeres postmenopáusicas (142, 143).

Tumores de Tipo VI de acuerdo a la asociación del componente somático y germinal

Para su clasificación los TCG-TSMs se agrupan en base a las asociaciones que ocurren en el tracto genital femenino, entre componentes müllerianos y germinales (53, 115, 144). Las categorías más importantes son:

1. Neoplasias endometrioides, asociadas a tumor endodérmico primitivo.
2. Carcinoma de células claras, asociado a tumor endodérmico primitivo
3. Neoplasia endometrioide o carcinoma de células claras, asociados a tumor endodérmico primitivo y a otro patrón de TCG.

Neoplasias endometrioides asociadas a tumor endodérmico primitivo

Constituyen el grupo más numeroso de TCGs de tipo VI (41, 115, 128). En el tracto genital femenino su localización habitual es el ovario, pero ocurren también a nivel

del endometrio (89). La edad promedio de presentación se encuentra entre la sexta/séptima década de la vida, considerablemente mayor que la edad de aparición de otros TCGs (30, 31). Nuestra serie incluyó pacientes entre 30-80 años. El estadio al momento del diagnóstico es a menudo avanzado y el pronóstico en consecuencia es desfavorable.

Al examen macroscópico se trata de tumores generalmente unilaterales y voluminosos, con un tamaño promedio de 15 cm (41). El examen microscópico revela dos componentes neoplásicos: el somático de derivación mülleriana constituido por carcinoma endometriode (CE) y el germinal representado por TEP/YST. Ambos pueden ocurrir en cualquiera de sus variantes.

A nivel histopatológico, la morfología del CE oscila desde tumores bien diferenciados, incluso con presencia de mórulas de epitelio escamoso, hasta tumores poco o nada diferenciados. Una asociación que se observa a menudo es la endometriosis (41). Por su parte, el componente de TEP/YST aunque incluye las formas clásicas, suele ser de tipo glandular (89).

Es precisamente la presencia de la variante glandular del TEP/YST lo que puede complicar la identificación del componente germinal secundario. La similitud morfológica que existe entre esta variante de TEP/YST y el CE, queda en evidencia a través del hecho de que en su descripción inicial se le dio el nombre de “Yolk Sac Tumor de tipo endometriode” (145).

El revestimiento epitelial cilíndrico presente en el TEP/YST de tipo glandular, puede ser muy similar al que se observa en el CE, siendo la presencia de vacuolas basales o apicales probablemente la única característica histológica que contribuya a diferenciarlos con un grado razonable de certeza en las preparaciones patológicas rutinarias. Por lo general, para ello se debe recurrir al uso de un panel de estudios inmunohistoquímicos que permitan discriminar cada componente.

En lo referente al inmunofenotipo del componente somático, el CE es típicamente positivo frente a citoqueratina 7 (CK7) (146, 147), antígeno epitelial de membrana (EMA) (146), receptores estrogénicos (RE) (148) y PAX8 (149).

Para la detección del componente germinal se recomienda aplicar el panel de diagnóstico desarrollado en nuestro grupo de investigación (150) el cual incorpora marcadores que identifican el endodermo en sus diferentes estadios de maduración.

Carcinoma de células claras asociado a tumor endodérmico primitivo

En cuanto a sus características clínicas y epidemiológicas, este grupo de tumores no difiere significativamente del grupo anterior (115). Ocurre principalmente en el ovario de mujeres post-menopáusicas y la edad promedio de presentación es 62 años. En nuestro trabajo la edad osciló entre 37-94 años. Su tamaño es también considerable, con un promedio de 12 cm y variaciones de entre 2 a 20 cm (41). Los estadios clínicos son con frecuencia avanzados.

Histológicamente, el carcinoma de células claras (CCC) corresponde al patrón túbulo-papilar y el TEP/YST es casi invariablemente de tipo glandular. Al igual que en el grupo de las neoplasias endometrioides asociadas a TEP/YST, la endometriosis es un hallazgo concomitante habitual.

La asociación de entre TEP/YST y CCC, ha sido reportada con menor frecuencia que la que ocurre con CE (115). Posiblemente la razón de esta menor frecuencia reside en que los patrones de crecimiento y las características celulares del CCC y TEP/YST pueden superponerse de manera importante, haciendo así difícil dilucidar si estamos frente a una mezcla de dos neoplasias, o bien ante una sola. Este hecho condiciona que el estudio rutinario de las preparaciones histológicas sea insuficiente, siendo necesario realizar pruebas adicionales que permitan delimitar características propias de cada componente.

Por lo tanto, hay que recordar que para llegar a un correcto diagnóstico debemos tener presente esta entidad, sospecharla cuando corresponda y realizar un panel inmunohistoquímico apropiado. El uso de uno o pocos anticuerpos se desaconseja, pues las pruebas tradicionalmente recomendadas para discriminar CCC de TEP/YST pueden presentar co-expresiones variables en ambos tumores, particularmente cuando se trata del patrón glandular (41, 115, 146).

Una vez más, el patrón glandular del TEP/YST constituye un reto desde el punto de vista del diagnóstico anatomopatológico, porque además de compartir la expresión de algunos anticuerpos, puede tener arquitectura papilar y presentar

vacuolas que simulen auténticos CCCs (151). Las sutiles diferencias histológicas, entre ellas: núcleos más regulares, vacuolas polarizadas y rarefacción del estroma sub-epitelial (115) no tienen la contundencia necesaria para sustituir el empleo de la inmunohistoquímica. En este tipo de tumores, además de los marcadores utilizados frente a CE, se deben realizar pruebas adicionales como Napsin-A y HNF1- β , destinadas a reconocer específicamente CCC.

Carcinoma endometriode o CCC asociados a TEP/YST y otro tipo de TCG (Tumores polidiferenciados)

Este tercer grupo de TCG-TSMs, es el menos frecuente y los casos reportados en la literatura médica previamente a nuestro trabajo, son escasos (152). No puede descartarse que se trate de un infradiagnóstico como consecuencia de la llamativa mezcla de componentes tisulares, que puede ser interpretada como teratoma inmaduro de localización extra-ovárica (153). La epidemiología, estadio clínico y la localización de estos tumores en el tracto genital femenino, es similar a las de los dos tipos anteriores.

Pero en este intrigante grupo se observan asociaciones neoplásicas más complejas (115), en las que el componente somático puede ser: CCC, CE o una mezcla de ambos. En tanto que, en el componente germinal, la presencia de TEP/YST es constante, pero en combinación con otra variedad de TCG que puede ser coriocarcinoma o teratoma.

También se han identificado estructuras neurales primitivas semejantes a las que se encuentran en teratomas inmaduros o elementos histológicamente parecidos a los cuerpos embriodes del carcinoma embrionario (115). El único tipo de TCG que no ha sido observado como parte de esta neoplasia compuesta, es el disgerminoma.

A continuación, haremos una breve revisión de los anticuerpos inmunohistoquímicos empleados durante el desarrollo de este estudio para identificar y estimar los componentes tanto somáticos, como germinales, así como la presencia de una población de CM. La elección de los anticuerpos empleados en la identificación de TEP/YST es resultado, como señalamos previamente, de un trabajo de nuestro grupo de investigación en el cual se caracterizó inmunohistoquímicamente a estos tumores y al saco vitelino humano.

Inmunohistocaracterización de los tumores germinales de tipo VI

Marcadores utilizados en el diagnóstico del componente germinal

La inmunohistoquímica ha sido empleada exitosamente en el diagnóstico de los TCGs, identificando la expresión de proteínas relacionadas al tipo de tumor y a su etapa de desarrollo. Los anticuerpos disponibles son numerosos, pero algunos se emplean casi exclusivamente con fines de investigación. Sin embargo, los marcadores a los cuales nos referiremos constituyen una herramienta útil en la práctica de la anatomía patológica, al ayudar a distinguir el endodermo en sus diversos estadios de maduración y tipos de diferenciación.

Alfa-fetoproteína (AFP): La alfafetoproteína es una proteína cuyo gen se encuentra en el cromosoma 4, en la región q11-q22, y es parte de una gran familia de proteínas albuminoides (154).

Durante mucho tiempo ha sido el marcador endodérmico por excelencia y se lo considera pilar en el diagnóstico de TEP/YST. No obstante, su expresión se limita al saco vitelino y al hígado, por lo que otras diferenciaciones endodérmicas somáticas pueden pasar desapercibidas.

El patrón de tinción de AFP suele ser focal y heterogéneo aún en los tipos clásicos de TEP/YST y es constantemente negativo en las formas diferenciadas (150). Pese a ello, un resultado positivo dentro del contexto clínico-histológico apropiado, apoya fuertemente el diagnóstico de TEP/YST.

Glipican-3 (GPC3): Otro marcador del endodermo primitivo es GPC3, que fue conocido previamente como OCI-5 o MRX-7. Es un proteoglicano de superficie celular, parte de una familia de seis miembros (155, 156). GPC3 tiñe a nivel de membrana y citoplasma. Comparte el patrón de tinción focal y heterogéneo de AFP pero, carece de su especificidad (157).

GATA binding protein 3 (GATA3): Este marcador es un factor de transcripción importante en la diferenciación de varios epitelios y un subgrupo de linfocitos T (158). Es parte de la familia GATA constituida por seis miembros que juegan un rol fundamental en la regulación del desarrollo embrionario (154).

En lo concerniente a los TCGs, GATA3 es un buen marcador para las formas primitivas de TEP/YST, mientras que su expresión en los patrones somáticos diferenciados es consistentemente negativa (124, 154). En el caso de tumores con componente germinal mixto (154), GATA3 es positivo en las áreas de coriocarcinoma y en los elementos endodérmicos que pueden estar focalmente presentes en los cuerpos embriodes del carcinoma embrionario.

Villina: La villina es una proteína de unión que regula la dinámica de la actina, así como la morfología y migración celular, entre otras funciones (154). El endodermo durante las etapas embrionarias muestra una fuerte tinción con villina que persiste en las formas diferenciadas intestinales de TEP/YST. Por esta razón es un buen marcador en la identificación de componentes endodérmicos en una neoplasia (159). Los componentes müllerianos por su parte carecen de esta expresión, lo que convierte a este anticuerpo en una excelente herramienta en el diagnóstico diferencial de los componentes somático y germinal de los TCG-TSMs.

Hepatocyte paraffin 1 (Hep Par 1): Es un anticuerpo monoclonal que se utiliza en los casos de TCGs principalmente para identificar las áreas endodérmicas altamente diferenciadas de tipo hepatoide (154). Aunque también se puede encontrar positividad en las formas somáticas glandulares de TEP/YSTs y en células aisladas de las variantes clásicas. Su patrón de tinción es característicamente granular debido a su localización mitocondrial.

Caudal-type homeobox transcription factor (CDX 2): Es un factor de transcripción nuclear de la familia de los CDX, a nivel cromosómico se localiza la región 13q12.2. Se expresa en las áreas endodérmicas con diferenciación intestinal de los TEP/YSTs de manera constante, intensa y difusa (154, 159).

Para evitar sobreestimar el CDX2 debemos tener presente que este anticuerpo también tiene inmunomarcación positiva intensa en el componente mülleriano si existen focos de metaplasia morular (160, 161).

Marcadores empleados en el diagnóstico del componente somático

Al igual que ocurre con el componente germinal, el componente somático puede requerir el uso de técnicas de inmunohistoquímica para establecer correctamente su identidad. Para ello empleamos marcadores de estirpe epitelial (CK7/EMA), derivación mülleriana (PAX8) y aquellos habitualmente utilizados para el reconocimiento de CCC (Napsin-A/HNF1- β)

Citoqueratina 7 (CK 7): Al igual que las demás queratinas, es un filamento intermedio que constituye parte del citoesqueleto de los epitelocitos. (154). Es una prueba muy difundida por sus numerosas aplicaciones, particularmente en el estudio de tumores de primario desconocido.

En los TCGs de tipo VI del tracto genital femenino ayuda a discriminar las áreas clásicas del TEP/YST de las zonas epiteliales somáticas, puesto que las primeras no expresan CK7. Sin embargo, para una correcta valoración debemos tener

presente que esta queratina puede ser positiva en los TEP/YSTs en las zonas altamente diferenciadas hacia la línea intestinal (115).

Antígeno epitelial de membrana (EMA): Es una proteína que se encuentra presente en la mayoría de las células epiteliales. Usada conjuntamente con CK7 su negatividad se utiliza para el diagnóstico diferencial entre las formas clásicas de TEP/YST y el CCC (154). Al igual que ocurre con la citoqueratina 7, EMA puede expresarse en las áreas de diferenciación intestinal de los TEP/YSTs, aunque a menudo la tinción es heterogénea. (115).

Paired-box gene 8 (PAX 8): Es un factor de transcripción esencial para el desarrollo del tracto urogenital por lo que es un marcador de derivación mülleriana (149). Se expresa difusamente en casi todos los CE y CCC de ovario y endometrio, mientras es consistentemente negativo en los TEP/YST, lo que lo convierte en una prueba de gran utilidad en su diagnóstico diferencial. En nuestra experiencia, todos los CCC expresaron PAX8, frente a ningún TEP/YST independientemente de su patrón histológico.

Napsin A aspartic peptidase (Napsin A): Es una proteinasa funcional expresada en los neumocitos tipo II y los túbulos renales, por lo que sus usos más extendidos están en relación con los tumores de pulmón y riñón. Una aplicación más reciente es la investigación de CCCs en ovario y endometrio (162). Napsin-A demostró en nuestro estudio ser un marcador sensible para la determinación de las áreas de CCC,

al mismo tiempo que específico, como lo evidencia su negatividad en todos los casos de TEP/YST (115).

Hepatocyte nuclear factor-1-beta (HNF1-β): Es un marcador considerado tradicional en la evaluación de los CCCs ováricos. Sin embargo, estudios previos han cuestionado su especificidad y su valor en comparación con Napsin-A (163). En nuestros casos a pesar de que HNF1-β identificó la mayoría de CCCs, también se expresó en la mitad de los TEP/YSTs de patrón glandular.

Marcadores de pluripotencialidad

Sal-like transcription factor 4 (SALL4): SALL4 es miembro de la familia de los genes SALL. Se codifica a nivel cromosómico en la región 20q13.2 (154). Conjuntamente con otros factores como Lin28, OCT4 y SOX2, participa en el mantenimiento de las características de pluripotencialidad en las CM (164).

Los TEP/YST retienen un grado de pluripotencialidad que se evidencia por la expresión de proteínas como el SALL4, con excepción de las áreas somáticas altamente diferenciadas que reproducen el epitelio intestinal, las cuales son negativas (89).

Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4): También conocido como OCT3, POU5 y OTF3, es el marcador de pluripotencia por excelencia. Es un factor de transcripción expresado por los elementos del macizo celular interno, codificado en

los humanos en la región 6p21.3 (154). Junto con SALL4 y NANOG tiene un rol fundamental en la inducción y mantenimiento de la pluripotencialidad. A nivel experimental su introducción ha conseguido recuperar la pluripotencia en células somáticas adultas (fibroblastos de ratón), generando una población de células pluripotentes semejantes a las CM embrionarias. Entre los TCGs es de gran utilidad para el diagnóstico de seminoma/disgerminoma, permitiendo su diagnóstico diferencial en casos de dificultad histológica. A nivel somático se ha demostrado su expresión focal en algunos tumores de alto grado como carcinosarcomas (130).

En los TCGs de tipo VI la existencia de una población de iPSCs explica que sea posible el desarrollo de una segunda estirpe tumoral de tipo germinal sobre una neoplasia somática maligna de elementos adultos (1). Estas células han sido demostradas mediante el empleo de OCT4 (115).

Para concluir esta breve mención de los marcadores inmunohistoquímicos empleados, hay que recalcar que anticuerpos tradicionalmente utilizados para el diagnóstico de neoplasias somáticas como CE y CCCs pueden ser coexpresados por los TEP/YSTs. Es el caso de CK7, EMA y HNF-1 β (115, 128), los cuales pueden ser positivos en las áreas glandulares del TEP/YST como consecuencia de su alta diferenciación hacia la línea intestinal.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es:

Caracterizar histopatológica e inmunopatológicamente, así como mediante estudios citogenéticos, la rara asociación existente en mujeres postmenopáusicas de tumores somáticos müllerianos con patrones tumorales de tumor de células germinales habituales en jóvenes.

Los objetivos específicos son:

Demostrar la existencia de una población de células madre pluripotentes con expresión de sus marcadores correspondientes, como probable origen del componente secundario de tumor de células germinales

Identificar una combinación tumoral habitualmente sub-diagnosticada y de progresiva importancia en una población en aumento de mujeres ancianas.

Establecer la identidad inmunohistoquímica de cada componente como ayuda al diagnóstico histopatológico.

Hipótesis

Los TCGs de tipo VI, es decir TCG-TSMs que ocurren en el tracto genital femenino, se originan a partir de células somáticas, habitualmente malignas, que han recuperado la pluripotencialidad. Reflejo de lo cual es su expresión inmunohistoquímica de marcadores de pluripotencia.

Esta CM originada en el tumor somático se comporta como una iPSC obtenida artificialmente y da origen a una segunda estirpe tumoral de tipo germinal. La variedad de TCG que surja, dependerá del potencial de desarrollo de la célula progenitora.

Estos tumores, aunque comparten morfología con tumores pediátricos (Tipo I) y testiculares postpuberales (Tipo II), tienen un escenario epidemiológico y un curso clínico diferentes.

Para sustentar esta hipótesis se investigó la presencia de células con un alto potencial de desarrollo. La detección de marcadores de pluripotencialidad se realizó mediante inmunohistoquímica dirigida a identificar focos OCT4 positivos.

Metodología

Materiales y métodos

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, que constituye un estudio de tipo descriptivo y transversal, realizamos en fases sucesivas evaluaciones morfológicas, inmunohistoquímicas y citogenéticas conducentes a responder nuestra hipótesis y cumplir los objetivos planteados. Paralelamente, los datos obtenidos permitieron la publicación de tres artículos originales vinculados de forma directa con el tema de estudio.

En una primera etapa complementando la inmunocaracterización de los tumores endodérmicos primitivos, previamente realizada por nuestro grupo de trabajo (159) y contrastando los resultados de otros investigadores (158), se analizó el papel del marcador GATA3 en el diagnóstico de las formas clásicas y diferenciadas de estos tumores (124).

Para ello, procedentes de casos de rutina y material de consulta internacional, se seleccionaron 22 casos de tumores endodérmicos primitivos de diferentes localizaciones (13 ováricos, 6 testiculares, 2 gástricos y 1 renal) y de diversas variantes histológicas (microquístico, polivesicular, sólido, glandular y hepatoide). Además 4 sacos vitelinos humanos de gestaciones uterinas y ectópicas y con edades comprendidas entre 5 y 8 semanas, fueron estudiados simultáneamente. Con la finalidad de determinar la marcación de GATA3 en los componentes endodérmicos de los cuerpos embriodes, se incluyó también un caso de poliembrioma ovárico.

La inmunohistoquímica fue realizada en un coloreador automático ThermoScientific Autostainer Lab Vision 480S (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Por cada caso, dos secciones histológicas, fijadas en formalina tamponada al 10%, cortadas a 3-4 *um* y embebidas en parafina, fueron incubadas durante 20 minutos con pH8, utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-GATA3 (dilución 1:500, clona L50-823, Biocare, Concord, CA, USA).

Las secciones se sometieron a la reacción antígeno-anticuerpo responsable del proceso de IHQ, utilizando como sistema de visualización: Micropolímero Ultravisión Quanto. El revelado se realizó con diaminobencidina.

La lectura de los resultados la realizó la doctoranda en una primera instancia y en una segunda, el director supervisó y aprobó los resultados.

El artículo original escrito en esta fase de la investigación es el siguiente:

GATA binding protein 3 expression is present in primitive patterns of yolk sac tumours but is not expressed by differentiated variants. Schuldt M, Rubio A, Preda O, Nogales FF. *Histopathology*. 2016 Mar;68(4):613-5. doi: 10.1111/his.12776. Epub 2015 Sep 6.

Indicios de calidad relativos:

Histopathology: IF 3.523

ISI Journal Citation Reports @ Ranking: 2017:18/79 (Pathology)

Posteriormente, y una vez reconocido el papel del anticuerpo GATA3 en la detección de las distintas formas de tumor endodérmico primitivo, se procedió a la caracterización inmunohistoquímica de tumores localizados en el tracto genital femenino, que mostraran asociación entre patrones histológicos de tipo germinal y condiciones somáticas müllerianas.

Procedentes al igual que los casos anteriores, del material de rutina y de consulta nacional e internacional, se recolectaron 12 tumores que mostraban *asociación de carcinoma de células claras y patrones histológicos de tumores de células germinales*. Debido a la rareza de estas neoplasias, este estudio es el resultado de una colaboración entre nuestro departamento y distintos centros europeos de excelencia en: Barcelona (Hospitales de San Pablo y Belvitge), Belfast (Queens University) (RU), Londres (Hammersmith Hospital) (RU), Rotterdam (Universidad Erasmus) (Países Bajos) y Universidad de l'Aquila (Italia) y dio lugar a la mayor serie publicada hasta el momento respecto a este tipo de tumores:

Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Nogales FF, Prat J, Schuldt M, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. *Histopathology*. 2018 Mar;72(4):634-647. doi: 10.1111/his.13426. Epub 2017 Dec 21.

Indicios de calidad relativos:

Histopathology IF: 3.523

ISI Journal Citation Reports @ Ranking: 2017:18/79 (Pathology)

Los datos clínicos y macroscópicos estuvieron disponibles en todos los casos, así como material histológico (bloques de parafina) para la realización de las pruebas de inmunohistoquímica (IHQ), excepto en un caso, del cual se recibieron preparaciones teñidas con hematoxilina/eosina y pruebas de IHQ listas para su revisión

Posteriormente a la evaluación del material histológico y a la selección de las áreas tumorales representativas, se realizó el siguiente panel de IHQ: AFP, SALL4, Villina, GLP3, GATA3 y HepPar1 como marcadores de TEP/YST. Para la identificación del componente somático se utilizó: HNF1, Napsin-A, CK7, PAX8 y EMA. Para demostrar la existencia de nichos de células con potencial de desarrollo pluripotente se empleó OCT4. Clonas y origen de estos anticuerpos se detallan en la tabla 4.

Tabla 4

Anticuerpos	Clona
HNF1-β	Policlonal
CK7	OVTL
EMA	E-29
Napsin-A	MRQ 60
PAX8	PAX8/1492
AFP	EP 209
SALL4	EE 30
Villin	CWWB1
HepPar1	OCH1E5
GPC-3	SP86
GATA3	L50-823
OCT4	C10

En cuanto a la técnica de IHQ, se siguieron los procedimientos recomendados por el proveedor de los anticuerpos empleados (Master Diagnóstica), realizándose cortes de 3-4 *um* de muestras de tejido tumoral previamente fijado en formalina tamponada al 10% e incluido en parafina.

Todas las pruebas se realizaron con el mismo coloreador automático ThermoScientific Autostainer 480S, utilizado en la fase previa de nuestro estudio con el anticuerpo GATA3. De manera semejante, la lectura de los resultados la realizó la doctoranda en una primera instancia y en una segunda, el director supervisó y aprobó los resultados.

Análisis citogenético de 12p

En los casos que presentaron además de TEP otro tipo de TCG se investigaron alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma 12p, mediante técnica de hibridación in situ (FISH). Para lo cual se utilizó una sonda centromérica para la detección de alteraciones numéricas y una sonda de locus específico para detectar alteraciones estructurales, mediante la localización de secuencias específicas de ADN.

La interpretación se realizó de acuerdo al siguiente criterio: la presencia de sendas señales individuales, rojas y verdes, representan un cromosoma 12 estructuralmente normal. La primera corresponde a un centrómero del cromosoma 12 y la segunda a una región 12p. Si a consecuencia de un reordenamiento genético, existiera un isocromosoma 12p el patrón FISH resultante mostraría dos regiones 12p, entre las cuales estaría dispuesta, una sola región centromérica.

La lectura y el reporte de los resultados se efectuaron en el Hospital Belvitge de Barcelona.

Empleando el mismo panel inmunohistoquímico y con la misma técnica y equipo descritos, se estudió un caso en el que la condición somática maligna asociada no era carcinoma de células claras. En su lugar, se identificó un caso de carcinoma endometriode, mientras el componente de tumor germinal, estuvo representado por tumor endodérmico primitivo de patrón glandular. Los hallazgos correspondientes

se publicaron como reporte de caso debido a su representatividad como una forma particular de TCGs de tipo VI.

Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma. Juan A. Retamero, MD, Maolly Schuldt, MD, and Francisco F. Nogales, MD, PhD. AJSP: Reviews & Reports • Volume 21, Number 4: 189-194 July/August 2016.

Indicios relativos de calidad:

AJSP IF: 5.878

Ranking: Pathology 8/76

Resultados

A continuación, se presentan los resultados del estudio en el orden en que fueron obtenidos y en relación con la publicación a la cual se vinculan:

1. GATA binding protein 3 expression is present in primitive patterns of yolk sac

tumours but is not expressed by differentiated variants. Schuldt M, Rubio A, Preda O, Nogales FF. Histopathology. 2016 Mar;68(4):613-5. doi: 10.1111/his.12776. Epub 2015 Sep 6.

Histologicamente, 13 de los TEP/YST mostraron una mezcla de los patrones clásicos reticulares y microquísticos primitivos, algunos asociados además con otra variante histológica: polivesicular vitelina (3 casos) y seno endodérmico (1 caso). En 16 casos se identificaron áreas de diferenciación somática glandulares y hepatoideas, en 9 de estos casos, se presentaron como formas puras o predominantes. En los siete restantes se asociaron a patrones primitivos. 12 de los casos de tumor endodérmico primitivo de patrón glandular se encontraron asociados a componentes neoplásicos de tipo somático, carcinoma endometriode (2 casos), carcinoma de células claras (6), adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (2), carcinosarcoma uterino (1) y carcinoma de células transicionales de la pelvis renal (1). Uno de los casos de poliembriomas mostró embriodes incluso con focos de diferenciación hepatoide. Finalmente, ninguno de los 2 TEP/YST testiculares de patrón sólido, expresó marcadores de carcinoma embrionario, como CD30 o SOX2. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 5.

TABLA 5				
CASO	DIAGNÓSTICO	ORGANO	PATRÓN YST	GATA3
1	CCC+TEP	Ovario	Glandular Puro	-
2	CCC+ TEP	Ovario	Microquístico	+
			Glandular Puro	-
3	Cistadenofibroma endometriode+CCC+TEP + semejante CE+Coriocarcinoma	Ovario	Microquístico	+ focal
			Glandular	-
4	CCC+ TEP	Ovario	Microquístico	+
			Hepatoide	-
5	CCC+ TEP	Ovario	Microquístico	+
			Glandular	Débil y focal
6	TEP	Testículo	Polivesicular	Focal (endodermo no vacuolado)
			Sólido	-
7	TEP	Ovario	Microquístico	+
			Polivesicular	Focal (endodermo no vacuolado)
8	TCG mixto : CE+ TEP	Testículo	Microquístico y seno endodérmico	+
			Glandular y sólido	-
9	TEP	Testículo	Microquístico	+
			Polivesicular y glandular	Focal (endodermo no vacuolado)
10	TEP	Testículo	Microquístico	+
			Glandular	-
11	TCG mixto: TEP + TQM	Testículo	Microquístico	+
12	TCG mixto: CE+ TEP +Coriocarcinoma	Testículo	Microquístico	+
			Hepatoide	-
13	ADK endometriode+ TEP	Ovario	Microquístico	+
			Glandular	Débil y focal
14	Carcinosarcoma teratoide	Ovario	Embrioides	+
			Hígado (heterólogos elementos)	-
15	ADK endometriode+ TEP	Ovario	Glandular Puro	-
16	Carcinoma urotelial + TEP	Riñón	Glandular Puro	-
17	CCC+ TEP	Ovario	Glandular Puro	-
18	TEP	Ovario	Glandular Puro	-
19	ADK intestinal productor de AFP	Estómago	Glandular Puro	-
20	ADK intestinal productor de AFP	Estómago	Glandular Puro	-
21	Metástasis (carcinoma gástrico)	Ovario	Glandular Puro	-
22	TEP	Ovario	Glandular Puro	-

Clave: CCC: carcinoma de células claras, TEP: tumor endodérmico primitivo, CE: carcinoma embrionario, TCG: tumor de células germinales, TQM: teratoma quístico maduro, ADK: adenocarcinoma, AFP: alfa-feto proteína

En cuanto a nuestro análisis inmunohistoquímico, este reveló que GATA3 se expresa siempre en el endodermo primitivo de los embrioides y en las formas primitivas de TEP/YST. 11/11 tumores de patrón reticular microquístico fueron positivos, 1/1 de tipo seno endodérmico y 3/3 polivesiculares, así como en las estructuras endodérmicas primitivas de los embrioides de los poliembrionas.

En contraste, las formas somáticas diferenciadas tanto de tipo glandular (9/9) como hepatoide (2/2), fueron consistentemente negativas. Lo mismo ocurrió con los focos de diferenciación hepatoide presentes en los cuerpos embrioides. Sin embargo, pese a la negatividad frente a GATA3, en todos los casos el fenotipo de TEP/YST fue confirmado por la positividad frente a AFP, GPC3, villina, SALL4 y HepPar1. Se observó positividad focal frente a GATA3 en las áreas glandulares de tres TEP/YSTs, uno testicular y dos ováricos. La positividad ocurrió en la interfase entre las áreas diferenciadas y las zonas primitivas del patrón polivesicular. En los cuatro casos restantes, en los que coexistían patrones primitivos clásicos junto a patrones diferenciados, las áreas glandulares fueron negativas y las zonas primitivas aledañas, positivas para GATA3. En los dos TEP/YST testiculares de patrón sólido, este anticuerpo tampoco se expresó. Ninguno de los sacos vitelinos humanos fue positivo.

Estos resultados demuestran que GATA3 se expresa en los patrones primitivos clásicos de TEP/YST, pero no en las menos frecuentes, áreas diferenciadas somáticas tanto glandulares como hepatoideas, ni en las formas sólidas.

En forma conjunta se exponen a continuación los resultados desprendidos del segundo y tercer trabajo científico original, debido a las semejanzas clínicas, epidemiológicas, macroscópicas, histológicas y de condiciones asociadas a los casos estudiados en ellos.

2. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma. Juan A. Retamero, MD, Maolly Schuldt, MD, and Francisco F. Nogales, MD, PhD. AJSP: Reviews & Reports • Volume 21, Number 4, July/August 2016

3. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Schuldt M, Rubio A, Preda O, Nogales FF. Histopathology. 2016 Mar;68(4):613-5. doi: 10.1111/his.12776. Epub 2015 Sep 6.

Resultados: datos clínicos

Los resultados clínico-patológicos se encuentran resumidos en la Tabla 6. La edad de las pacientes osciló entre 37-94 años con un promedio de 62 años. Exceptuando a dos pacientes, todas eran postmenopáusicas. La mayoría de los tumores (11/12) se localizaron en el ovario, el restante ocurrió en endometrio.

El estadio clínico-patológico se estableció de acuerdo a las recomendaciones de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique / Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Se determinó que cuatro pacientes estaban en estadio I, tres en estadio II, cuatro en estadio III y una en estadio IV. Todas las pacientes excepto dos, recibieron un régimen de quimioterapia.

Se realizó seguimiento de todos los casos. Cuatro pacientes estaban libres de enfermedad, después de periodos de seguimiento que iban de 15 meses a 4 años. Una paciente murió debido a complicaciones postoperatorias y 7 murieron debido al tumor en el plazo de 16 meses a 3 años de realizada la cirugía.

Tabla 6
Datos clínico-patológicos

	AÑOS (edad)	Sitio/Tamaño	Componentes Histológicos		Lesión asociada	Estadío	Tratamiento	Seguimiento
			Tumor somático	Tumor de células germinales				
1	76	Ovario izquierdo/ 2cm	CCC	TEPG Puro		III	HAT-SOB, Omentectomía , Quimioterapia	MDE 1 año
2	94	Ovario izquierdo/ 19cm	CE+CCC	TEPG+TEPMQ	CAF-END	I	HAT-SOB, Omentectomía , Quimioterapia	Diseminación metastásica, MDE 1 año
3	79	Ovario izquierdo/ 8cm	CAD-CC límitrofe	TEPG Puro		I	HAT-SOB	VLE 21 meses
4	48	Ovario izquierdo/ 18cm	CCC	TEPG+TEPMQ		III	SOI, Omentectomía , Quimioterapia	MDE 16 meses después del diagnóstico
5	37	Ovario izquierdo/ tamaño desconocido	CE+CCC	TEPG+TEPMQ	Endometriosis	I	SOI, Quimioterapia.	MDE 18 meses después del diagnóstico. Recurrencias tempranas.
6	57	Ovario derecho/ 15cm	CE+ CCC	TEPG+COC+SCE+ EMBROID	CAF-END	II	SOB, Quimioterapia	MDE 2 años después del diagnóstico. Recurrencia 7 meses. Elevación hCG.

7	49	Ovario (lateralidad desconocida)/ 8cm	CE+CCC	TEPG+TEPMQ	Endometriosis+ CAF-END	II	HAT-SOB, Omentectomía, DNL, Quimioterapia	VLE 2 años con marcadores negativos
8	69	Ovario (lateralidad desconocida)/ 10cm	CCC	TEPG (predominante)+TE PMQ+ EEM (benigno)		III	Cirugía cito-reductora, Omentectomía, Quimioterapia	MDE
9	40	Ovario izquierdo/ 4cm	CE+CCC	TEPG+NEURO+ME E+ EEM (benigno)	Endometriosis	I	SOI, Quimioterapia	VLE 4 años
10	58	Ovario derecho/ 20cm	CCC	TEPG (predominante)+TE PMQ (focal)+ NEURO+EEM+ME +CART(benigno)	Endometriosis	II	HAT-SOB, Quimioterapia	VLE 15 meses
11	72	Ovario derecho/ 17cm	CE+CCC	TEPG+TEPMQ+N EURO+EMBROID	Endometriosis	III	HAT, Quimioterapia	Recurrencias tempranas. MD 3 años
12	69	Útero/ 11 cm	CS+CCC	TEPG+NEURO+C OC+SCE		IV	HAT-SOB	MDE en periodo postoperativo

Hallazgos clínico-patológicos. Claves: TEPG: Tumor endodérmico primitivo glandular. TEPMQ: Tumor endodérmico primitivo microquístico. SCE: Semejante a carcinoma embrionario. EMBROID: Embrioides. CCC: Carcinoma de células claras. CE: Carcinoma endometriode. CS: Carcinosarcoma CAF-CC: Cistadenofibroma de células claras. CAF-END: Cistadenofibroma endometriode. COC: coriocarcinoma. NEURO: Neuroepitelio inmaduro o maligno. ME: músculo estriado EEM: Epitelio escamoso maduro CART: cartilago. HAT-SOB: Total: Histerectomía abdominal total y salpingo-ooforectomía bilateral. SOI: Salpingo-ooforectomía izquierda. DNL: Disección de nódulos linfáticos. MDE: Muerta debido a la enfermedad. VLE: Viva libre de enfermedad. VCE: Viva con enfermedad

Resultados: características anatomopatológicas

Hallazgos macroscópicos

A nivel macroscópico los tumores fueron voluminosos con un tamaño promedio de 12 cm y medidas que fueron de 2 a 20 cm. Predominaron las áreas sólidas, aunque con presencia de zonas quísticas, hemorragia y necrosis.

Hallazgos microscópicos

Hemos analizado las categorías correspondientes de asociaciones de tumores somáticos y de células germinales. El componente de carcinoma de células claras estuvo presente en todos los casos, si bien se asociaba a patrones tanto de endometriosis como de carcinoma endometriode ocasionalmente. El TEP/YST también estuvo presente en todos los casos como componente de tumor de células germinales y en cuatro de ellos, coexistió con patrones de tumores de células germinales de tipo teratomatoso.

Coexistencia de CCC con TEP/YST: el componente somático en 4 casos fue CCC puro, de patrón papilar, tubuloquístico y sólido. En 7 casos además de CCC se identificó otra forma de neoplasia mülleriana maligna (6 carcinomas endometriodes-1 carcinosarcoma). Finalmente, uno de los casos presentó un adenofibroma borderline de células claras.

El componente germinal incluyó de manera constante TEP/YST de patrón glandular. En dos de los casos el patrón glandular se presentó puro y en dos fue el patrón predominante. Los casos restantes mostraron mezclas del patrón glandular con los patrones clásicos de TEP/YST.

Coexistencia de CCC con TEP/YST y teratoma: En cuatro casos el CCC se asoció a TEP/YST y otro componente germinal. El componente más frecuentemente observado, fue una mezcla de tejidos inmaduros de tipo neuroectodérmico y endodérmico. Cada uno de los cuales expresó su inmunofenotipo característico: villina en las áreas endodérmicas y SOX2 en las neurales.

Dos de los casos presentaron además estructuras parecidas a los cuerpos embrioides, con su zona neuroectodérmica (SOX2 positiva), rodeando al saco vitelino. Incluso, se observó tejido hepático con expresión positiva frente a Villina y HepPar1.

Se evidenciaron componentes teratoides adicionales tales como: epitelio escamoso, músculo, cartílago inmaduro, pigmento melánico. Un caso presentó coriocarcinoma y en otros dos se detectaron focos de sincitiotrofoblasto.

Asociación con endometriosis o cistoadenofibromas: En 5 casos hubo asociación con endometriosis, la cual fue más evidente en las pacientes premenopáusicas. En

4 casos se identificaron además cistoadenofibromas, tres de tipo endometrioides y un borderline de células claras.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica fue realizada con la finalidad de diferenciar los componentes somáticos de los de células germinales y establecer la identidad de una población de células con expresión de marcadores de pluripotencialidad.

Como ya ha sido señalado, los CCCs y TEP/YSTs tienen patrones inmunohistoquímicos característicos. Los cuales no siempre resultan útiles para su diagnóstico diferencial, pues coexpresan varios marcadores. Es el caso de HNF1- β , CK7 y EMA, expresados en CCC y en las áreas glandulares de los TEP/YSTs. Cabe recalcar, sin embargo, que el patrón de tinción fue diferente, siendo intenso y difuso en CCCs, mientras que los TEP/YSTs presentaron una tinción focal.

La expresión de algunos marcadores endodérmicos fue observada en ambos tipos de neoplasia. GLP3 y Gata3 fueron marcadores coexpresados, en las áreas somáticas, si bien las áreas clásicas del TEP/YST fue donde se expresaron más intensamente.

Por otra parte, algunos marcadores mostraron gran especificidad para uno de los componentes. Es el caso de Napsin-A y PAX8 que se expresaron únicamente en CCCs. Inversamente, los marcadores endodérmicos SALL4, villina, AFP y HepPar-1, fueron consistentemente negativos en todos los CCCs y positivos en casi la totalidad de los TEP/YSTs de tipo glandular.

Los resultados inmunohistoquímicos están resumidos en la Tabla 7.

Resumen de resultados de las pruebas inmunohistoquímicas

Anticuerpos	CC	TEP/YST GLANDULAR
HNF1-β	11/12 Difuso	6/12 Heterogéneo
CK7	12/12 Difuso	5/11 Heterogéneo
EMA	11/12 Difuso	9/12 Heterogéneo
Napsin-A	9/10 Difuso	0/11
PAX8	11/11 Difuso	0/11
AFP	0/12	10/12 Heterogéneo
SALL4	0/12	12/12 Difuso
Villin	0/11	11/11 Difuso
HepPar1	0/11	7/11 Focal
GPC-3	2/12 Focal	10/12 Heterogéneo
GATA3	2/10 Focal	2/10 Focal
OCT4	6/10 Heterogéneo	0/12

Discusión

Los tumores germinales de derivación somática han sido descritos principalmente en asociación con lesiones endometrioides que abarcan un amplio espectro que va desde la endometriosis (127), pasando por CE bien diferenciado (89, 125), hasta CE de alto grado (128) (165) así como carcinosarcomas (130) y carcinomas serosos (166). La asociación con CCC ha sido comunicada con menor frecuencia probablemente debido a las dificultades que entraña su diagnóstico (87); siendo este uno de los motivos de este trabajo de tesis doctoral.

Todos los TCGs de tipo VI comparten un patrón epidemiológico semejante entre sí, pero que difiere radicalmente del de otras categorías de tumores germinales. La edad de presentación es considerablemente mayor, con una media de 62 años. Esta podría ser la explicación de la aparición en los datos de registro de tumores, de un pico adicional en la incidencia de los TCGs, situado alrededor de la séptima década de vida (29, 85).

Tras la identificación de varios tumores ováricos y endometriales con un doble componente tumoral representado por una parte somática (habitualmente CCC o CE) y un componente germinal (prevalentemente TEP/YST de patrón glandular), se planteó la necesidad de implementar un panel de marcadores inmunohistoquímicos que contribuyeran a distinguir cada componente.

La morfología resulta insuficiente en casos como estos, donde los patrones histológicos y las características citológicas tienden a superponerse. Esto hace necesario el uso de técnicas adicionales como la IHQ, siempre que se cuente con anticuerpos con especificidad para cada tipo de neoplasia. Por otra parte, la búsqueda de poblaciones de CMP en la neoplasia somática se realizó con el propósito de sustentar una posible histogénesis del componente germinal.

En nuestra serie, la mayor publicada hasta el momento, todas las formas de TGCs de tipo VI presentaron características clínicas y epidemiológicas semejantes entre sí. A nivel histológico, el componente de TCG prevalente fue TEP/YST de patrón glandular, mientras que el único tipo no identificado fue el disgerminoma, igual que ha ocurrido en observaciones previas (87).

Tradicionalmente el CCC ha representado el principal diagnóstico diferencial del TEP/YST glandular al compartir numerosos rasgos histológicos (167). El hallazgo de vacuolas claras, glóbulos hialinos y patrón túbulo-papilar, en ausencia de patrones clásicos de TEP/YST, no descarta las formas diferenciadas de este tumor que pueden tener morfología similar a CCC. Por otro lado, la presencia de células columnares altas, con vacuolas subnucleares o apicales polarizadas y rarefacción estromal subepitelial, pueden ayudar a identificar el componente de TEP/YST de variante glandular. Pero, al valorar la histología necesitamos mantener en mente que debido a su sutileza e inconstancia, estas características aunque aportan al diagnóstico, no pueden suplir el empleo de las técnicas de inmunohistoquímica.

Para un correcto diagnóstico es necesario realizar un panel de inmunohistoquímica con múltiples marcadores. El uso de anticuerpos aislados no es recomendable debido a la existencia de patrones de tinción aberrantes (124).

La coexpresión de distintos anticuerpos puede ocurrir, incluso en el caso de marcadores que se habían considerado “característicos”. Esto podría explicar los casos comunicados de CCC con expresión de AFP o GPC3 (168), que en realidad se tratarían de TEP/YSTs de patrón glandular, que a nivel histológico reproducen el aspecto de un auténtico CCC.

En nuestro estudio algunos marcadores demostraron resultados consistentes. Es el caso de AFP que se expresó, aunque de forma heterogénea, en casi todos los TEP/YSTs y en ningún CCC. GPC3 tuvo una respuesta similar a AFP frente a los TEP/YSTs, pero también se observó focalmente en dos casos de CCC.

Entre los marcadores habitualmente empleados en el diagnóstico de CCC, HNF1- β si bien estuvo presente en la mayoría de estos carcinomas, fue positiva también en la mitad de los TEP/YSTs de patrón glandular, lo que le resta especificidad y desaconseja su uso de forma aislada.

Los marcadores epiteliales CK7 y EMA han sido probablemente las pruebas más usadas en la distinción de las dos entidades, debido a estudios que afirmaban su

invariable negatividad en los TEP/YSTs (146). Sin embargo, esto es así únicamente en las formas clásicas de la neoplasia. Las formas diferenciadas de TEP/YST pueden expresar fuertemente CK7 y EMA hasta en la mitad de los casos (115).

GATA3 también ha sido propuesto como un marcador para discriminar CCC de TEP/YST (158), basándose en su negatividad frente al primero y positividad ante el segundo. Nuestro estudio puso en evidencia que, aunque infrecuente y focal, la positividad en CCCs existe. Por otra parte, y quizás aún más importante, las formas glandulares de TEP/YST frecuentemente no expresan este marcador (124), de hecho en esta variante tumoral la expresión ocurrió con la misma frecuencia que en los casos de CCCs valorados simultáneamente (2/10).

PAX8 un marcador mülleriano por excelencia (149) y Napsin-A (162), mostraron resultados consistentemente positivos en los CCCs de nuestra serie y negatividad en todos los TEP/YSTs, lo que confirma su utilidad para distinguir estas neoplasias.

En cuanto a los marcadores endodérmicos, villina y SALL4 se expresaron en todos los TEP/YSTs, incluidos aquellos de patrón glandular, pero en ningún CCC. La positividad de SALL4 además de confirmar el carácter endodérmico, demuestra células con capacidad de expresar pluripotencia. El HepPar1, anticuerpo ampliamente utilizado para detectar diferenciación hepática, se expresó en más de la mitad de nuestros casos de TEP/YST de patrón glandular y estuvo ausente en todos los CCCs. Estos hallazgos demuestran el valor combinado de los

tres anticuerpos en los casos que requieran excluir la presencia de TEP/YSTs en un CCC o viceversa.

Además de CCC y TEP/YST se identificaron tejidos teratoides en 4 de nuestros casos, en todos ellos se observó tejido neural. La pigmentación melánica fue hallada en dos de las muestras, al igual que músculo estriado o focos de diferenciación trofoblástica. En tres casos se encontró epitelio escamoso y en uno, focos de cartílago inmaduro.

Una asociación que merece ser señalada, es la coexistencia de tejidos neurales inmaduros (túbulos neurales/blastema) y endodérmicos (patrón microquístico y glandular), presente en tres casos. Cada elemento presentó el inmunofenotipo correspondiente. Así, las áreas endodérmicas expresaron AFP, GPC3, villina y HepPar1. En tanto que las neuroectodérmicas fueron positivas frente a SOX2.

En dos de los casos estudiados esta asociación fue más allá, al formar estructuras de tipo “embrioides”, caricaturas del estadio embrionario de blastocisto. Estas estructuras pueden hallarse en los carcinomas embrionarios, pero no han sido comunicadas con anterioridad en TCGs de pacientes postmenopáusicas o en asociación con neoplasias somáticas.

Previamente a nuestras observaciones, se había informado en los teratomas inmaduros de alto grado de pacientes pediátricos, la asociación entre ectodermo y endodermo primitivos. De hecho, los valores elevados de AFP en correspondencia con las zonas endodérmicas, constituyen un factor de mal pronóstico en estos pacientes (169, 170).

Excepcionalmente estos tumores polidiferenciados han sido comunicados en el útero como teratomas inmaduros (153). En el ovario de una mujer de 72 años se informó un caso de teratoma inmaduro, carcinoide y CE (125). Adicionalmente, se identificó CCC, TEP y zonas semejantes a carcinoma embrionario, coexistiendo en una misma lesión (152).

La fuente de estos componentes teratoides parece ser la neoplasia somática. La ausencia de elementos como pelo y material sebáceo, típicos en los tumores dermoides, reduce la probabilidad de estar frente a remanentes de un teratoma evanescente.

Más aún, la estrecha mezcla entre patrones que se manifestó inclusive por un caso en el cual los quistes estaban revestidos por CCC y TEP/YST de manera simultánea, nos inclina a pensar en neoplasias heterogéneas, más que en tumores de colisión.

La patogénesis de estos componentes tumorales que comparten histología con ciertos tipos de TCGs, aún no está del todo clara. Pero sus características dependen del potencial de desarrollo de la célula a expensas de la cual se originen, así como de aspectos epigenéticos, tales como reprogramación o pérdida de la impronta genética. Estas interacciones están moduladas por factores adicionales como localización, género y edad de presentación.

La avanzada edad de las pacientes de nuestra serie, hace poco probable el origen de estos elementos a partir de verdaderas células germinales en el sentido clásico. Sin embargo, es posible que surjan en el componente somático mülleriano maligno a expensas de células reprogramadas con características de CM, las cuales habrían recuperado la pluripotencialidad, entre otras causas, por mecanismos relacionados con el cáncer.

Estas células, conocidas como iPSC (induced pluripotent stem cells) (1), pueden dar lugar a tumores con un potencial de desarrollo semejante al de los TCGs pediátricos, mostrando focos de células OCT4 positivas, SOX2 y CD30 negativas. Un perfil que demuestra que esta población de CM es equivalente a las células embrionarias en su estadio más temprano.

Una vez más, tomando en cuenta la edad de las pacientes, es factible que esta determine una pérdida progresiva de la metilación del ADN relacionada con el envejecimiento, lo que a su vez puede resultar en la activación aberrante de ciertos

genes (171), disrupción de la programación celular (137) o pérdida de la impronta genética (135).

En el caso concreto de los tumores ováricos epiteliales (136), la pérdida de la impronta de H19 y IGF-II ocurre a menudo debido a hipometilación. Este fenómeno es consistente con la hipótesis según la cual, el componente germinal de los TCG-TSMs resulta a partir de células somáticas con características de CM que han recuperado la expresión de genes vinculados a la pluripotencia, tales como OCT4 y SOX2.

Nuestro estudio apoya esta afirmación a través del hallazgo de células con un gran potencial de desarrollo y expresión nuclear de OCT4 en la mitad de los casos estudiados, bien como células aisladas o en áreas mayores de apariencia blastemal. Previamente, la expresión de OCT4 había sido reportada en teratomas inmaduros ováricos de alto grado (172), pero no en TCG-TSMs.

A estos se suma la detección en dos de los casos, de características histológicas similares a las del carcinoma embrionario, con presencia de grandes células pleomórficas, con nucléolos prominentes, dispuestas en sábanas sólidas o en patrones fenestrados e incluso formaciones semejantes a cuerpos embrioides. A pesar de su morfología, estas células no tenían el inmunofenotipo, ni las características moleculares completas del carcinoma embrionario, ya que no se

pudo demostrar ganancia de 12p y a nivel inmunohistoquímico, solo expresaron SOX2 de forma débil y focal.

Los TCGs desarrollados en asociación con CCCs, son similares a los TCGs pediátricos ováricos que se originan a partir de una célula pluripotente tal y como la célula germinal primordial metilada. Estas semejanzas incluyen además de la ausencia de expresión de 12p y la presencia de TEP/YST que puede coexistir con elementos neuroectodérmicos inmaduros (170). De hecho, la mayoría de los tumores pediátricos que están compuestos casi totalmente por TEP/YST, pueden resultar del sobrecrecimiento de esta forma de tumor germinal, que termina por oscurecer al teratoma sobre el cual se originó (173).

Consistentemente con lo afirmado, en los tumores que forman parte de nuestra serie, el TEP/YST de tipo glandular es el componente más habitual, mientras que con menor frecuencia se observaron las formas clásicas de este tumor, así como combinaciones otros tipos de TCG.

En nuestros casos, la semejanza con los tumores germinales pediátricos es incompleta. La presencia de CM indiferenciadas coexpresando OCT4 y SOX2 no está presente en los TCGs pediátricos, ya que estas áreas corresponderían a una expresión característica de CM embrionarias en estadio de diferenciación básica (ground state). Sin embargo, sí podrían ocurrir en los tumores testiculares

postpuberales no seminomatosos, pero al mismo tiempo, nuestros tumores no presentaron ganancia 12p, una característica usual en este segundo tipo de TCG.

De forma similar a lo que ocurre en los tumores de tipo VI, los TCGs originados a partir de iPSC genéticamente diseñadas pueden contener carcinoma embrionario y/o elementos malignos de tipo somático, que en algunos casos llegan a ser el único componente identificable, particularmente cuando la inducción de la pluripotencialidad incluye genes Myc (174).

En consecuencia, proponemos que en los TCG-TSMs tienen lugar a partir de células madre pluripotentes inducidas, de origen mülleriano, con un potencial de desarrollo equivalente a las iPSC genéticamente manipuladas; las cuales dan origen a los componentes germinales de la neoplasia. Las formas que se presentan pueden incluir tanto TCGs prepuberales pediátricos (teratoma, teratoma inmaduro, estructuras endodérmicas, TEP/YST y trofoblasto), como tumores de tipo testicular pospuberal no seminomatoso, incluido carcinoma embrionario con formación de estructuras organoides que recuerdan los cuerpos embrioides.

Conclusiones

- 1 Los tumores germinales desarrollados sobre neoplasias somáticas müllerianas en el tracto genital femenino son neoplasias agresivas, frecuentemente diagnosticadas en estadios clínicos avanzados y ocurren tanto en ovario como en endometrio. La asociación más frecuente es carcinoma endometriode y tumor endodérmico primitivo, pero estos tumores también pueden ocurrir en asociación con carcinomas de células claras y más raramente, junto a otras neoplasias.

Comunicado en trabajos publicados en:

Retamero, JA. Schuldt, M.D, Nogales, F.F. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Carcinoma. AJSP: reviews & reports. 2016 Jul/Aug 21(4): 189-94

Nogales FF, Prat J, Schuldt M, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Histopathology. 2018 Mar;72(4):634-647

- 2 Hay una considerable superposición morfológica entre los componentes germinales y somáticos que hace necesario el empleo de un panel de

marcadores que permitan diferenciarlos. Los marcadores tradicionalmente utilizados para ello, tales como CK7, EMA y HNF1, no son útiles de forma aislada debido a la coexpresión que se observa en los epitelios somáticos y el componente glandular diferenciado de los TEP/YSTs. Sin embargo, hemos demostrado que pueden emplearse en asociación con otros anticuerpos más fiables. Así, la expresión de Napsin-A se limita a los componentes somáticos y está ausente en todos los tumores endodérmicos, mientras PAX8, un marcador mülleriano, mostró la misma consistencia en sus resultados, al identificar únicamente los componentes somáticos.

Comunicado en trabajo publicado en:

Nogales FF, Prat J, Schuldt M, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Histopathology. 2018 Mar;72(4):634-647

- 3 En el caso del componente germinal, el panel de marcadores inmunohistoquímicos endodérmicos necesario es amplio e incluye: SALL4, villina, GATA3, AFP y GPC3. No obstante, debemos tener presente que la mayoría de tumores endodérmicos primitivos podrán ser reconocidos empleando un panel reducido formado por SALL4 y villina.

Comunicado en trabajos publicados en:

Schuldt M, Rubio A, Preda O, Nogales FF. GATA binding protein 3 expression is present in primitive patterns of yolk sac tumours but is not expressed by differentiated variants. Histopathology. 2016 Mar;68(4):613-5

Retamero, JA. Schuldt, M.D, Nogales, F.F. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Carcinoma. AJSP: reviews & reports. 2016 Jul/Aug 21(4): 189-94

Nogales FF, Prat J, Schuldt M, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Histopathology. 2018 Mar;72(4):634-647

- 4 Los tumores germinales de tipo VI presentan en el componente somático una población celular de apariencia indiferenciada con una peculiar expresión de anticuerpos asociados a pluripotencia como OCT4. Proponemos que estas células representan iPSCs generadas espontáneamente por factores epigenéticos, probablemente relacionados con la neoplasia original y que a partir de ellas se desarrolla el componente germinal.

Estas neoplasias tienen características de tumores germinales prepuberales, pero carecen de ganancia 12p. Predomina el componente de tumor endodérmico primitivo y se observa asociado a neuroectodermo inmaduro.

En otras áreas estas células indiferenciadas dan lugar a formaciones embrioides similares a las que ocurren en los tumores testiculares pospuberales, pero sin llegar a presentar un inmunofenotipo completo de carcinoma embrionario.

En suma, los tumores tipo VI no tienen un perfil único, sino que reproducen de un modo incompleto y aberrante, características presentes tanto en tumores germinales pediátricos de tipo I, como testiculares pospuberales de tipo II.

Comunicado en trabajo publicado en:

*Nogales FF, Prat J, **Schuldt M**, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, Matias-Guiu X, Vidal A, McCluggage WG, Oosterhuis JW. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. Histopathology. 2018 Mar;72(4):634-647*

Apéndices.

Publicaciones originales relacionadas con la presente tesis doctoral

[Histopathology](#). 2016 Mar;68(4):613-5. doi: 10.1111/his.12776. Epub 2015 Sep 6

Maolly Schuldt MD, Alejandro Rubio MD, Ovidiu Preda MD PhD^(*) and Francisco F Nogales MD PhD.

From the Department of Pathology. San Cecilio University Hospital, Granada, Spain and R&D unit at Master Diagnóstica ^(*), Granada, Spain.

GATA3 expression is present in primitive patterns of Yolk Sac Tumors but is not expressed by differentiated variants

GATA3 is a useful marker in the characterization of mammary and urothelial tumours(175). Recently, a tissue microarray (TMA) based systematic analysis of 2500 cases(158), has also reported GATA3 expression in renal tumors, paragangliomas, choriocarcinomas and mesotheliomas, as well as a constant positivity in a small number of cases (6/6) *endodermal sinus tumours* of unspecified variants (preferred terminology is yolk sac tumors(176) -YST-).

Germ cell tumours (GCTs) are known for their histological heterogeneity and indeed, YSTs are not an exception, representing not a discrete entity, but a group of tumours with a wide capacity of endodermal differentiation, at various developmental stages, into both primitive extraembryonal and somatic structures. These often include tissue differentiations such as liver and fetal gut(53, 159).

In order to provide a wider immunohistochemical dataset for GATA3 for this heterogeneous tumor, we analyzed its immunoexpression in reported histological YST variants: reticular-microcystic, endodermal sinus, polyvesicular vitelline, glandular, hepatoid and solid, that were found in 22 cases from different organs (13 ovarian, 6 testicular, 2 gastric and 1 renal). Furthermore, 4 normal human yolk sacs (HYS) from ectopic and uterine pregnancies corresponding to the 5th, 6th, 7th and 8th weeks were studied. Additionally, one ovarian polyembryoma was also included with the purpose of analyzing GATA3 expression in the primary yolk sac-like structure reproduced in embryoids. Immunohistochemistry was performed in a Thermo Scientific™ Autostainer LabVision 480S-2D. Two paraffin-embedded tissue sections per case were incubated at pH8 for 20 minutes with a primary mouse monoclonal anti-GATA3 antibody (1:500 dilution, clone L50-823, Biocare, Concord, CA, USA), a comparable procedure to the one used in the analysis reporting GATA3 constant expression in 6 cases of YSTs(158).

Histologically, 13 YSTs showed varying admixtures of the usual reticular-microcystic primitive pattern with polyvesicular vitelline variants (3 cases) and endodermal sinus (1 case). Somatic glandular and hepatoid areas were present in 16 YSTs, in 9 cases they were predominant or pure and in 7 cases mixed forms were associated with primitive areas. Twelve of the cases with glandular (11/12) and hepatoid (2/12) YST variants were associated with somatic non-germ cell tumours such as ovarian endometrioid carcinoma (2 cases), ovarian clear cell carcinoma (6 cases), intestinal gastric adenocarcinoma (2 cases), one uterine carcinosarcoma and one renal pelvic transitional cell carcinoma. One case of polyembryoma showed embryoids, often related to foci of hepatoid differentiation.

Finally, 2 solid testicular YSTs were included; neither of which expressed embryonal carcinoma markers such as CD30, SOX2 or OCT4, thus endorsing a diagnosis of a solid YST.

Our immunohistochemical analysis revealed that GATA3 was invariably expressed in both the primitive endoderm of embryoids and the primitive patterns of YST: 11/11 in reticular-microcystic (Fig 1A), 1/1 endodermal sinus, 3/3 polyvesicular (Fig 1B) as well as in the primitive yolk sac-like structures of the embryoids of polyembryoma (Fig 1C). In contrast, differentiated somatic tissues such as glandular (9/9) (Fig 1D) and hepatoid in both YSTs (2/2) and in the vicinity of embryoids (Fig 1C) also consistently failed to express GATA3. However, their YST immunophenotype was confirmed by their expression for AFP, Glypican 3, villin, SALL4 and HepPar1(159). Focal GATA3 positivity was observed in glandular areas of one testicular and two ovarian YSTs at the interface of endodermal somatic patterns with the primitive areas of polyvesicular pattern (Fig 1B). The remaining 4 glandular YSTs with mixed primitive areas (Fig 1A) were negative for GATA3 in the glandular areas but positive in the concurrent primitive patterns. Furthermore, GATA3 was neither expressed in the solid patterns of 2 testicular YSTs.

Among normal structures, HYSs never expressed GATA-3, even in the earliest ones of the 5th and 6th weeks.

The above results show that GATA3 is only expressed by the usual primitive areas of YST, while the less frequent somatic glandular, hepatoid and solid patterns are consistently negative. In routine diagnostic procedures, most YSTs are

identified by the presence of primitive areas, which express GATA3 and, consequently, it would seem that it represents a good marker for the most of usual types of YSTs. However, hepatoid, glandular and solid YSTs, which not express GATA3, are difficult to identify due to their rarity and unexpected histology, thus often representing a major pitfall in YST diagnosis(159, 170). This is particularly true when these special variants associate with non-germ cell tumours such as endometrioid(125), clear cell, urothelial(118), gastric, *etcetera*. Indeed, these patterns are the most frequently found associated to somatic tumours, and are often overlooked. This omission is particularly serious as these neoplasms have an invariably poor prognosis(125).

Although the use of TMA-sections, as performed in a systematic analysis of GATA3 in 2500 epithelial and non-epithelial tumors(158) is a correct procedure to analyze large series of tumors, it may yield misleading results. This is due to the small amount of tissue analyzed, in histologically heterogeneous neoplasms, such as neuroendocrine pancreatic tumors(177) and multidifferentiated YSTs, where the study of full tissue sections may be more representative of the various growth patterns present in such heterogeneous tumours.

GATA3 expression shows a temporal and spatial heterogeneity during embryonal development(178). Indeed, GATA3 is expressed in fully differentiated, terminal tissues such as breast, urothelial, amnion, trophoblast(158), etc. However, its expression in mature, terminally differentiated tissues is difficult to reconcile with its positivity in the primitive endoderm of embryoids and its negativity in HYS of

unspecified developmental age(158). To complement these data, we analyzed in this study HYSs of the 5-8th week, and confirmed the absence of GATA3 expression even in the earliest ones.

In summary, YSTs are heterogeneous neoplasms, often with multiple histological growth patterns. Although the usual type primitive extraembryonal YST patterns express GATA3, we have observed a consistent negativity in pure glandular, hepatoid and solid areas of YST. Consequently, GATA3 is not a reliable diagnostic marker for differentiated endodermal somatic patterns of YSTs, especially when they are predominant or associated with non-germ cell tumours. This exemplifies the fact that in YSTs, the usage of an ample immunohistochemical panel is necessary to reach a correct diagnosis.

ILLUSTRATION

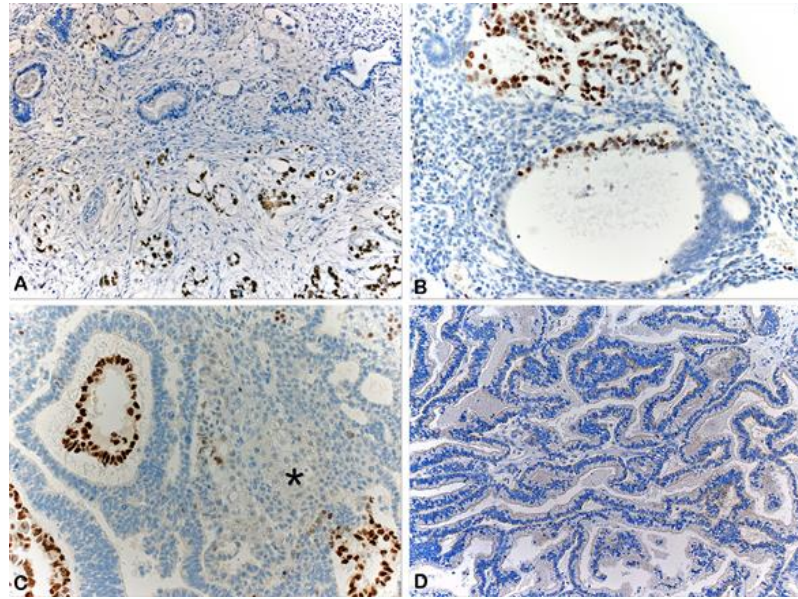


Figure 1: Immunohistochemical findings in YST patterns: (A) nuclear expression in microcystic areas (bottom) is absent in endodermal glandular differentiations (top). Polyvesicular vitelline pattern showing pinched-off vesicles (B) showing a heterogeneous staining: positive in coexisting primitive endodermal areas (top) and negative in differentiated columnar cells (bottom). (C) Embryoids from a polyembryoma show a positive primitive yolk sac-like cavity coexisting with a negative hepatoid area (asterisk). (D) A YST with a differentiated somatic glandular pattern, otherwise expressing AFP, Glypican 3, villin, SALL4 and HepPar1, but failed to express GATA3.

References

1. Liu H, Shi J, Wilkerson ML, *et al.* Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *American journal of clinical pathology* 2012; **138**:57-64
2. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, *et al.* GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *The American journal of surgical pathology* 2014; **38**:13-22
3. Prat JC, D. Carinelli, S.G. Nogales FF, Vang R, Zaloudek CJ. Germ cell tumours In eds. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH, *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014; 57-62
4. Nogales FF, Preda O, Nicolae A. Yolk sac tumours revisited. A review of their many faces and names. *Histopathology* 2012; **60**:1023-1033
5. Nogales FF, Quinonez E, Lopez-Marin L, *et al.* A diagnostic immunohistochemical panel for yolk sac (primitive endodermal) tumours based on an immunohistochemical comparison with the human yolk sac. *Histopathology* 2014; **65**:51-59
6. Heifetz SA, Cushing B, Giller R, *et al.* Immature teratomas in children: pathologic considerations: a report from the combined Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group. *The American journal of surgical pathology* 1998; **22**:1115-1124
7. Nogales FF, Bergeron C, Carvia RE, *et al.* Ovarian endometrioid tumors with yolk sac tumor component, an unusual form of ovarian neoplasm. Analysis of six cases. *The American journal of surgical pathology* 1996; **20**:1056-1066
8. Preda O, Dema A, Iacob M, *et al.* Urothelial carcinoma of the renal pelvis with simultaneous trophoblastic and malignant clear cell endodermal-type differentiation. *Virchows Arch* 2012; **460**:353-356
9. Yang Z, Tang LH, Klimstra DS. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *The American journal of surgical pathology* 2011; **35**:853-860
10. Debacker C, Catala M, Labastie MC. Embryonic expression of the human GATA-3 gene. *Mech Dev* 1999; **85**:183-187

Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma

Juan A. Retamero, MD, Maolly Schuldt, MD, and Francisco F. Nogales, MD, PhD

Abstract: A nulliparous, obese, diabetic 68-year-old woman with a history of pelvic endometriosis presented with an International Federation of Gynecology and Obstetrics stage III 17-cm ovarian mass. Histology showed endometriotic cysts with an intracystic growth of well-differentiated endometrioid adenocarcinoma with squamous morular change. This co-existed with a second papillary epithelial pattern corresponding to a glandular yolk sac tumor (YST) that merged with the endometrioid adenocarcinoma. Immunohistochemistry discriminated between endometrioid adenocarcinoma and glandular YST phenotypes.

The expression of traditional YST markers, such as α -fetoprotein and glypican 3, was heterogeneous and irregular, failing to demarcate the YST from the endometrioid carcinoma. However, the coexpression of SALL4 and villin clearly differentiated the positive YST from the negative endometrioid adenocarcinoma.

2 Müllerian epithelial markers, such as epithelial membrane antigen, cytokeratin 7, and PAX8, highlighted endometrioid carcinoma areas but were consistently negative in both glandular and classic variants of YST. 1 Germ cell tumors arising

from somatic Müllerian tumors in the female genital tract are aggressive, high clinical stage nondysgerminomatous tumors of both the ovary and endometrium; the most frequent association is endometrioid adenocarcinoma and YST although they can be associated to CCC. 4 They likely originate from tumor stem cells. Their endometrioid adenocarcinoma component is usually high grade, although a minority arises from low-grade neoplasms with morular differentiation. 3 The germ cell component is always YST with a predominance of glandular and hepatoid variants.

Immunohistochemical differentiation between both patterns should be accomplished using a broad panel including SALL4, villin, GATA3, α -fetoprotein, and glypican 3. However, a reduced panel using just SALL4 and villin is often sufficient for the diagnosis of the majority of YST. Müllerian antibodies against epithelial membrane antigen, cytokeratin 7, and PAX8 are usually negative in YST but positive in Müllerian

Key Words: yolk sac tumor, endometrioid adenocarcinoma, tumor stem cells, immunohistochemistry, SALL4, villin, PAX8

CASE PRESENTATION

A nulliparous, obese, diabetic 68-year-old woman, with a long history of pelvic endometriosis treated with testosterone isoxazole presented with a short history of

rapid abdominal distension and discomfort. Cancer antigen 125 levels were substantially increased, and ultrasonography showed a heterogeneous solid and cystic left ovarian mass and a thickened (15 mm), irregular endometrium. Abdominal surgery revealed abundant ascites and an International Federation of Gynecology and Obstetrics stage III, 17-cm, ovarian mass adherent to pelvic structures. A 2-cm subdiaphragmatic nodule underwent biopsy. Total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy were performed, followed by bleomycin, etoposide, and cisplatin combination chemotherapy, which was poorly tolerated.

Throughout follow-up, levels of α -fetoprotein (AFP) were raised, although remaining less than 100 ng/ml. Two years after surgery, she developed large abdominal recurrences and eventually died with widespread metastases.

Macroscopically, the ovarian tumor had an irregularly thickened surface with capsular adhesions and zones of rupture. On cut section, cystic areas with dense hemorrhagic contents coexisted with masses of friable white tissue. The walls of the cysts were fibrous and tan. The uterus was moderately enlarged and lined by a microcystic endometrium. The contralateral ovary was involuted but otherwise unremarkable.

Histology showed endometriotic cysts displaying intracystic growth of a well-differentiated endometrioid adenocarcinoma with squamous morular change (Fig. 1). Multiple sections also exposed the coexistence of a second papillary epithelial pattern that formed coarse, anastomosing papillae merging with the endometrioid

adenocarcinoma (Fig. 2A). The interface showed intermingled areas of both patterns (Fig. 2B). The papillae had a complex structure, and although at low power, they resembled the villoglandular component of endometrioid carcinoma; on higher magnification, a characteristic columnar epithelium with apically placed nuclei and a marked subnuclear vacuolation reminiscent of fetal gut was seen. Consequently, it was identified as a somatic endodermal pattern of a yolk sac (endodermal primitive) tumor (Fig. 3A). There were also micropapillary, microcystic areas of the usual diagnostic pattern of yolk sac tumor (YST) (Fig. 3B), which predominated in the subdiaphragmatic metastasis.

Immunohistochemistry was performed to discriminate between endometrioid adenocarcinoma and glandular YST phenotypes. Glandular YST areas were highlighted by the expression of SALL4 and villin that clearly differentiated them from consistently negative endometrioid adenocarcinoma (Fig. 4A, B). This diagnostic antibody combination markedly contrasted glandular patterns of YST from endometrioid carcinoma. The fetal intestinal phenotype of the glandular YST was further confirmed by its CDX2 overexpression (Fig. 5). CDX2, however, was also present in the morular areas of the well-differentiated endometrioid adenocarcinoma. However, traditional YST markers such as AFP (Fig. 6A) and glypican 3 (GPC3) (Fig. 6B) had a heterogeneous and irregular expression that failed to demarcate the YST from the endometrioid carcinoma.

Müllerian epithelial markers such as epithelial membrane antigen (EMA) (Fig. 7A), cytokeratin 7 (CK7) (Fig. 7B), and PAX8 (Fig. 7C) highlighted areas of both

endometriosis and endometrioid carcinoma and were consistently negative in both glandular and classic variants of YST.

The endometrium had extensive cystic change, and the remaining ovary was unremarkable.

DISCUSSION

Germ Cell Tumors Arising From Somatic Müllerian Tumors this unusual case of tumor heterogeneity exemplifies a group of rare, malignant nondysgerminoma germ cell tumor (GCT) variants arising from somatic cell-derived tumors. In the female genital tract, they occur mainly in neoplasms of Müllerian derivation of both the ovary and endometrium, such as endometriosis,¹ endometrioid adenocarcinomas and carcinosarcomas,²⁻⁴ clear cell adenocarcinomas (CCCs),⁵ and rarely, in high-grade serous⁶ and mucinous adenocarcinomas.⁷ Their most frequent association is endometrioid adenocarcinoma and YST, as exemplified by this case presentation, and secondarily, CCC and YST. Similar combinations of somatic tumors and GCT patterns may occur in extra-gonadal locations such as the uterus, head and neck region,⁸ stomach,⁹ urinary tract,¹⁰ and soon.

Germ cell tumor patterns arising in somatic Müllerian tumors (SMTs) probably originate from tumor stem cells behaving as induced pluripotential stem cells (JW Oosterhuis and Looijenga L, personal communication). Endometrial stem cells have been demonstrated in endometrioid adenocarcinoma,^{11,12} and indeed, pluripotential

stem cells with a phenotype analogous to germ cells have been obtained from surface ovarian epithelium.¹³ These pluripotential, induced pluripotential stem cell-like cells express OCT4 and have been specifically identified by us in GCT arising in CCC.⁵

The clinicopathologic profile of these tumors is uncommon since they involve patients substantially older than those usually presenting with primary gonadal and extragonadal GCT. In our unpublished series of 23 ovarian and 4 uterine cases, the mean age was 63 years, with an age range from 30 to 80 years, most in the sixth and seventh decades of life and only 1 patient in each of the third, fourth, and fifth decades. It is worth noting that most premenopausal cases had a concomitant endometriosis or endometrioid cystadenofibroma, which were, presumably, the precursor lesion of endometrioid adenocarcinoma. In postmenopausal patients, endometriotic lesions were seen in more than half of the cases. Macroscopically, all were large tumors, with an average diameter of 15 cm, ranging from 10 to 30 cm, and all but one were unilateral. International Federation of Gynecology and Obstetrics stages III and IV were the norm, with only 3 patients in stage I. Generally, there was a poor response to chemotherapy and high mortality rate.

Histologically, when the SMT type corresponded to endometrioid adenocarcinoma, two thirds of cases were high- grade tumors, including carcinosarcoma. However, it is interesting that in a third of cases, GCT arose, as in this case presentation, from low-grade neoplasms with morular differentiation (Figs. 1-3), even including one instance of pure endometriosis. The germ cell component was always YST that,

although frequently admixed with small foci of microcystic pattern, had a predominance of glandular and hepatoid variants.

Additional polydifferentiated GCT patterns were seen in 4 cases: 2 with neural rosettes similar to those found in immature teratomas (ITs), 1 with choriocarcinoma, and another with embryoid bodies coexisting with solid or fenestrated areas of embryonal carcinoma-like growth, coexpressing OCT4, CD30, and SOX2.

Overgrowth of YST in elderly, postmenopausal patients may erase the SMT component, thus giving the appearance of a primary GCT.¹⁴ Although there are diagnostic foci of the usual microcystic pattern, glandular forms may predominate and become a pitfall in differential diagnosis with endometrioid carcinoma. Indeed, well-differentiated endometrioid adenocarcinoma and glandular YST share many histologic similarities. It must be born in mind that in the first description of glandular YST, it was named *endometrioid-like YST*.¹⁵ These similar histologic appearances should therefore be unmasked by immunophenotypic analysis.

Yolk Sac Tumor Immunohistochemistry The current term of YST encompasses a group of heterogeneous endodermal differentiations ranging from primary yolk sac to differentiated cell lineages such as the intestine and liver. To include the wide range of cell types that may coexist or predominate in a given tumor, the term *primitive endodermal tumor* has been proposed,¹⁶ being accepted by the World Health Organization as an alternative name to YST.¹⁷

Thus, the complex immunophenotype of YST is a reflection of the multiple differentiations and caricatures of developmental stages that coexist in these neoplasms. For this reason, the use of a wide immunohistochemical panel capable of identifying various tissues and stages of endodermal development is recommended.¹⁸ We have proposed a comprehensive diagnostic panel based on the comparative expression of various proteins in the human yolk sac, early somatic endoderm, and YST.^{18,19} This approach includes pluripotentiality as well as extraembryonal and somatic endodermal markers and is useful in the diagnosis of both bona fide YST of germ cell origin and those arising in a somatic tumor.

Among extraembryonal endodermal markers, *AFP* has been for many years the referential diagnostic antibody for YST. α -Fetoprotein is secreted by the human yolk sac and liver but not in other endodermal differentiations.

Consequently, AFP would only identify these phenotypes but not other somatic differentiations such as the lung, intestine, and so on. This explains why AFP expression is usually heterogeneous and focal (Fig. 6A) and may be absent when a somatic variant predominates. The same is true for *GPC3*, which displays a similar staining pattern to AFP (Fig. 6B) but has the disadvantage of being less specific.²⁰ *GATA3*²¹ is a good marker for primitive YST but is not consistently expressed in differentiated forms.²² Thus, negativity of AFP, GPC3, or GATA3 in tumors with a glandular histology should not preclude a diagnosis of YST.

Villin, however, is expressed during the embryogenesis of early and differentiated endoderm and constitutes a highly sensitive marker for both primitive and differentiated endodermal patterns.¹⁸ Villin positivity is strong and cytoplasmic in all variants of YST (Fig. 4B), being absent or only minimally expressed by Müllerian neoplasms.

Pluripotentiality markers are extremely helpful in YST diagnosis. Both human yolk sac and embryonal somatic differentiations retain a degree of pluripotency represented by the expression of proteins such as *SALL4* (Fig. 4B) and *LIN28*.^{23,24} *SALL4* is widely available and more frequently used than *LIN28*. Practically all YST are positive for *SALL4*, although highly differentiated intestinal areas of glandular YST differentiating goblet cells may be negative.

Somatic endodermal, tissue-specific markers, such as *CDX2* and *HepPar-1*, are both good indicators of human yolk sac and somatic endodermal differentiation such as the intestine and liver. *CDX2* can be strongly positive in glandular YST (Fig. 5). The present case also illustrates the fact that morules of endometrioid adenocarcinoma also express *CDX2*.²⁵ *HepPar-1* highlights areas of liver, small intestine, and human yolk sac differentiation, being particularly expressed in hepatoid YST. Positivity for these anti- bodies is focal or absent in the usual microcystic variants of YST.

In cases like the present one, where a differential diagnosis is to be made with SMT, it is also necessary to analyze the expression of markers present in Müllerian-derived tumors such as *EMA*, *CK7*,²⁶ and *PAX8*, which are positive in the Müllerian areas but usually negative in YST (Fig. 7A-C), with the exception of some glandular YST that can be positive for both *EMA* and *CK7*, possibly representing a gastropancreatic differentiation.

Notes on Diagnostic Immunohistochemistry of Ovarian GCT

In a recent review,²⁷ we analyzed the use of immunohistochemistry in female genital tract GCT and underlined its relevance in the diagnosis of primitive GCT such as dysgerminoma, YST, and IT.

Dysgerminoma

Dysgerminoma, owing to its characteristic cellularity and consistent lymphocytic infiltrates, usually has a straightforward diagnosis. However, its identification may be problematic in some variants and in poorly fixed tumors, where a marked architectural distortion and a partial loss of antigenicity may exist. Autolytic features include the formation of pseudofollicular structures that may resemble both small cell carcinomas with hypercalcemia and struma ovarii, neoplasms that also affect young patients. *Placental-like alkaline phosphatase* is often used as a standard marker, but its expression is often conditioned by poor fixation. Conversely, both *CD117* and *clone D2-40 of podoplanin* are relatively stable membrane markers for dysgerminoma.²⁸ *Cytokeratin* positivity can occur in up to a

third of cases; consequently, it is not advisable to differentiate dysgerminoma from embryonal carcinoma or solid patterns of YST by cytokeratin expression alone. Early pluripotentiality marker *OCT4* is expressed by both dysgerminoma and embryonal carcinoma. Nevertheless, when taking into account the exceptionality of embryonal carcinoma in the ovary, OCT4 can be considered a selective marker of dysgerminoma. *SALL4* is a sensitive marker for primitive GCT, being expressed in dysgerminoma, although it lacks specificity because it is also expressed in embryonal carcinoma and solid YST.

Immature Teratoma

The main use of immunohistochemistry in IT lies in the quantification of immature neural areas²⁷ necessary to establish a histologic grade and the demonstration of prognostically relevant²⁹ immature endodermal foci that may resemble YST.

The relative amount of immature neural tubules and areas of neurogenesis is important in establishing a tumor grade in IT. *SALL4* identifies all lineages of immature cells retaining pluripotency but not specifically neural ones. However, *SOX2* is an excellent marker of developing neural structures and therefore identifies immature neural areas relevant to grading, permitting a far more precise evaluation of the quantity of immature areas at low magnification. Mature neural structures like retina and ependymoma may be mimics of immature neural tubules, being negative for *SOX2*. Furthermore, *SOX2* is also useful in the demonstration of immaturity in nodules of peritoneal gliomatosis.^{30,31}

Immature endodermal elements can occur in high-grade IT and are readily identified by the coexpression of villin and SALL4; their presence is of prognostic importance.²⁹ In these, coexpression of villin and SALL4 readily identifies them.

OCT4 expression may occur in IT,³² but in our experience, it is restricted to foci in high-grade tumors, highlighting the embryonal stem cell line.

Postpubertal Testicular-Type GCT in Females

Postpubertal testicular-type GCTs in females (embryonal carcinoma, choriocarcinoma, and mixed GCT) are not included here as ovarian GCT because they occur exceptionally in 46XX women. In phenotypic females, they most probably arise in disorders of sex differentiation with the presence of Y chromosome material. Because most originate in the mutated germ cells of gonadoblastoma, which are similar to those of germ cell neoplasia in situ of the testis, they should be considered of postpubertal testicular-type rather than true parthenogenetic ovarian GCT. Although both types of GCT may share a similar histology, they have a different cellular origin, genetics, and behavior.

Figures

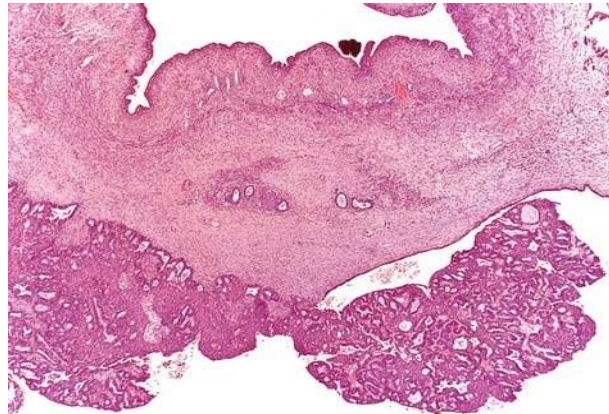


FIGURE 1. Endometriotic cyst with a fibrous wall showing endometrial epithelial lining (top) and polypoid growths of endometrioid adenocarcinoma (bottom)

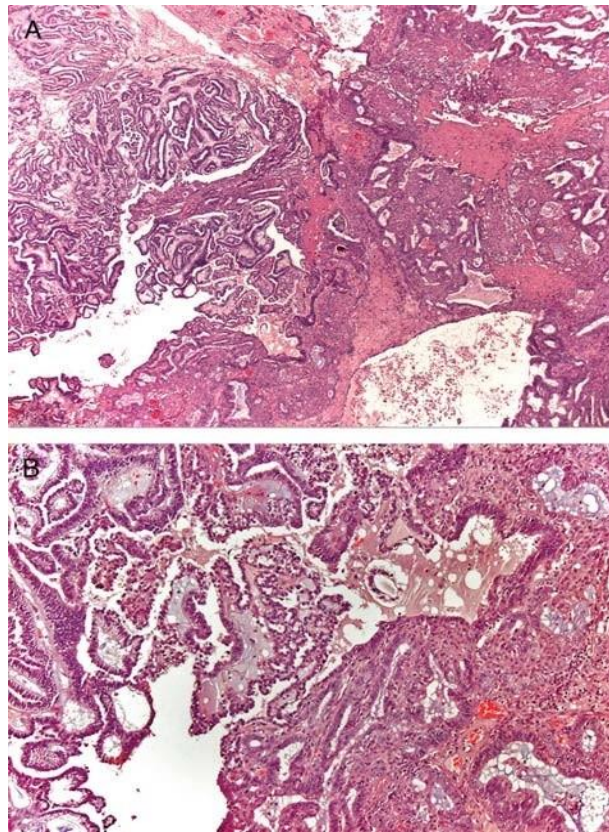


FIGURE 2. A, Interface between endometrioid adenocarcinoma set in a fibrous stroma (right) and papillae of glandular YST (left). In this field (B), both patterns are well demarcated

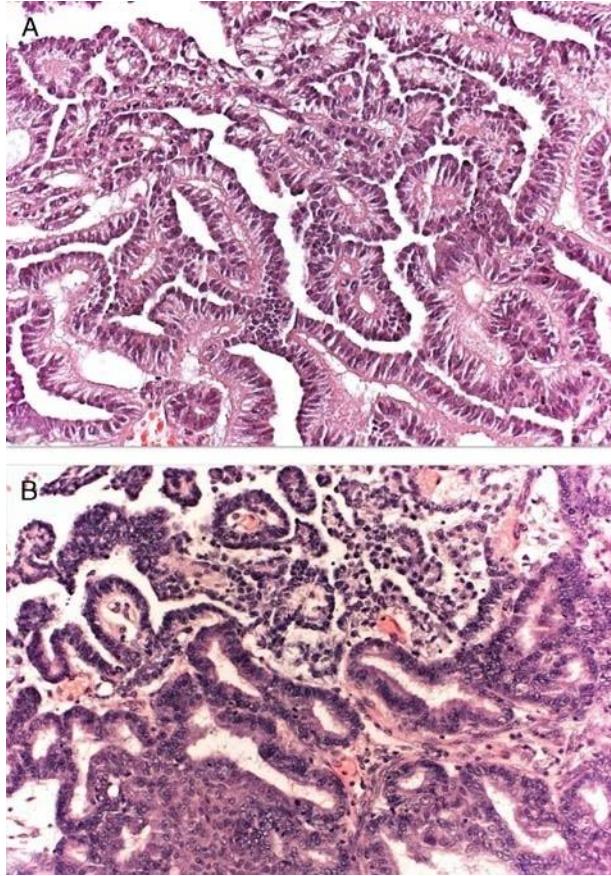


FIGURE 3. A, Coarse papillae of glandular YST with characteristic subnuclear vacuolation that places nuclei apically. B, Small foci of micropapillary-cystic YST (top right) are focally intermingled with endometrioid adenocarcinoma.

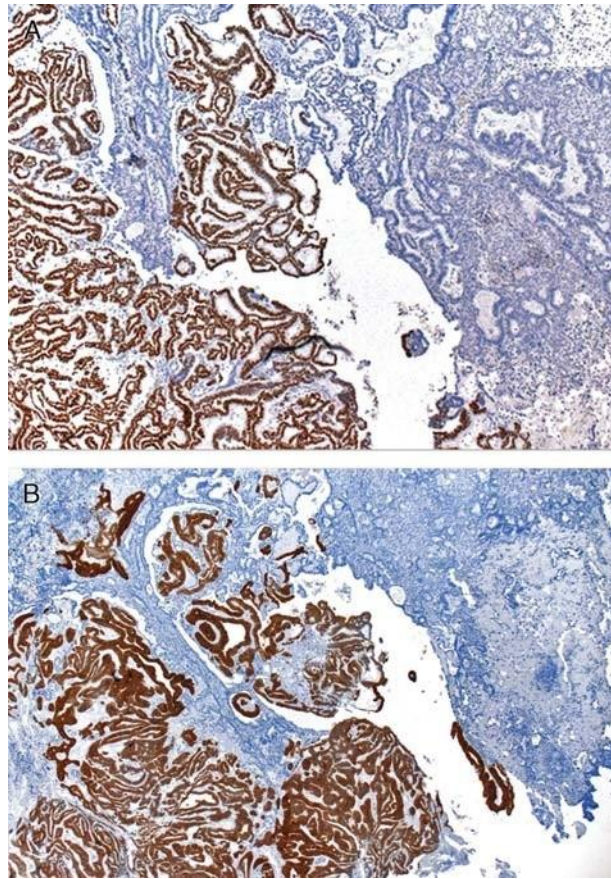


FIGURE 4. Strong expression of SALL4 (A) and villin (B) in glandular YST areas, both being absent in endometrioid adenocarcinoma areas

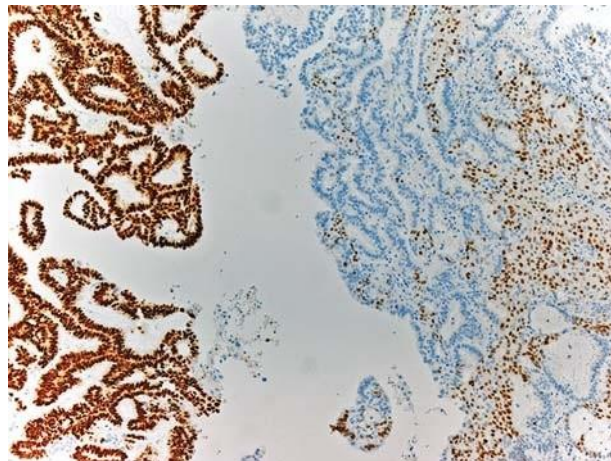


FIGURE 5. Glandular YST with an intestinal phenotype due to the marked expression of CDX2 (left), which is also positive in the morular component of endometrioid adenocarcinoma (right).

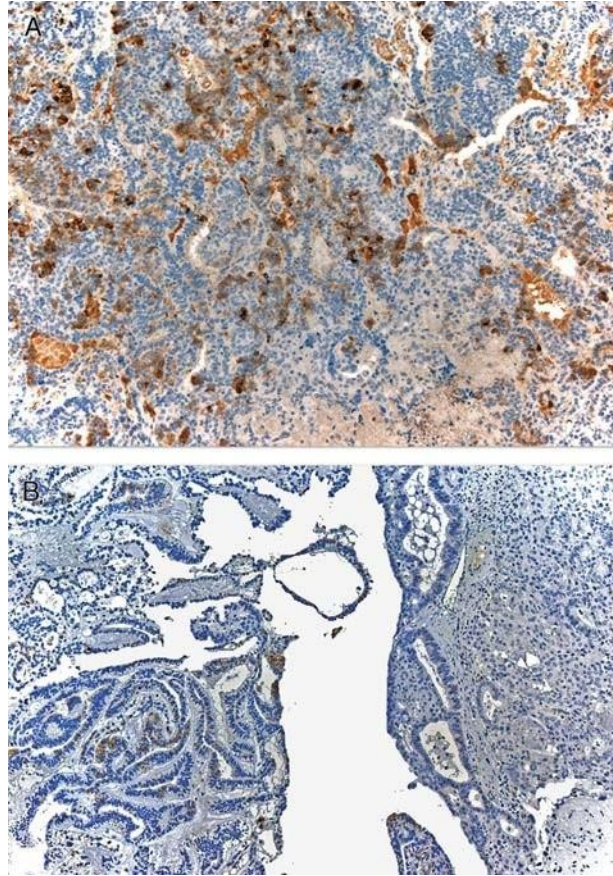


FIGURE 6. Frequently used markers in the diagnosis of YST only have an irregular positivity. α -Fetoprotein shows a patchy expression (A), whereas GPC3 has a weak focal expression (B).

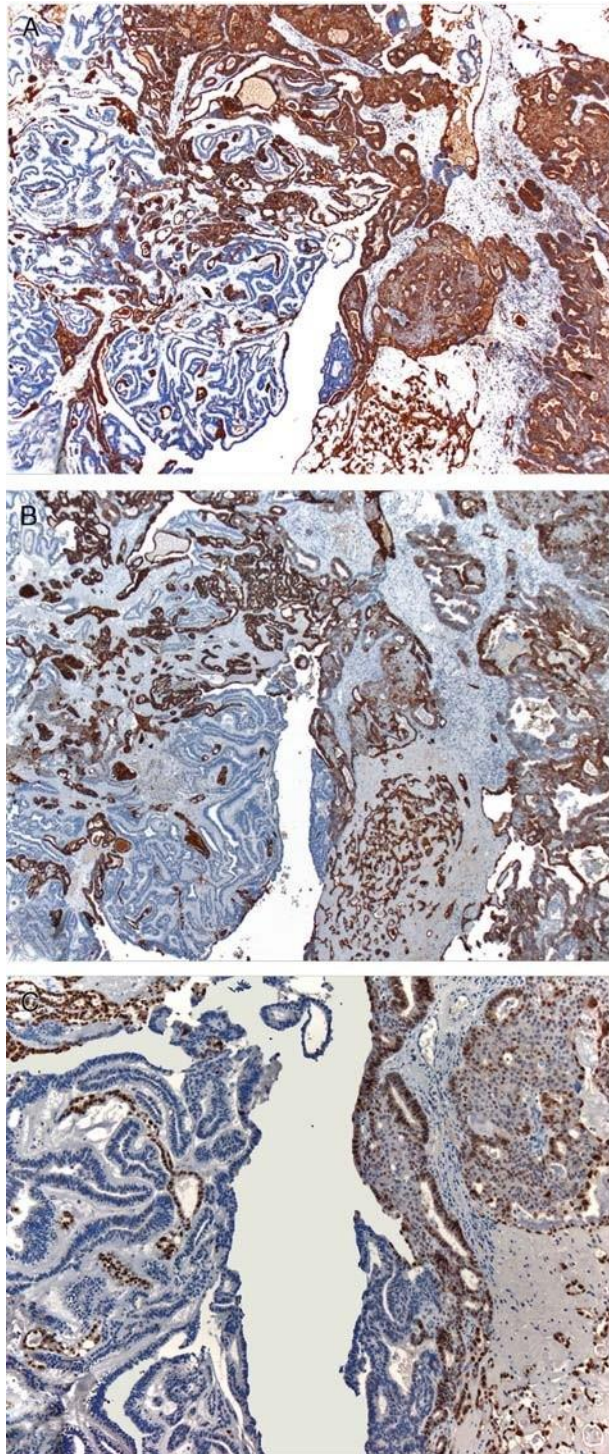


FIGURE 7. Müllerian markers. EMA (A), CK7 (B), and PAX8 (C) highlight the endometrioid adenocarcinoma, whereas YST areas are consistently negative. Endometrioid adenocarcinoma is found interstitially among YST areas.

REFERENCES

1. Lankerani MR, Aubrey RW, Reid JD. Endometriosis of the colon with mixed “germ cell” tumor. *Am J Clin Pathol* 1982;78:555–559.
2. Rutgers JL, Young RH, Scully RE. Ovarian yolk sac tumor arising from an endometrioid carcinoma. *Hum Pathol* 1987;18:1296–1299.
3. Nogales FF, Bergeron C, Carvia RE, et al. Ovarian endometrioid tumors with yolk sac tumor component, an unusual form of ovarian neoplasm. Analysis of six cases. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1056–1066.
4. García-Galvis OF, Cabrera-Ozoria C, Fernández JA, et al. Malignant Müllerian mixed tumor of the ovary associated with yolk sac tumor, neuroepithelial and trophoblastic differentiation (teratoid carcinosarcoma). *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:515–520.
5. Nogales FF, Schuldt M, McCluggage WG, Kaur B, Prat J. Mixed clear cell carcinoma with yolk sac tumour. Immunohistochemical differentiation between glandular YST components and clear cell carcinoma. in preparation 2016.
6. Varia M, McCluggage WG, Oommen R. High grade serous carcinoma of the ovary with a yolk sac tumour component in a postmenopausal woman: report of an extremely rare phenomenon. *J Clin Pathol* 2012;65:853–854.
7. Lopez JM, Malpica A, Deavers MT, et al. Ovarian yolk sac tumor associated with endometrioid carcinoma and mucinous cystadenoma of the ovary. *Ann Diagn Pathol* 2003;7:300–305.
8. Shanmugaratnam K, Kunaratnam N, Chia KB, et al. Teratoid carcinosarcoma of the paranasal sinuses. *Pathology* 1983;15:413–419.
9. Kinjo T, Taniguchi H, Kushima R, et al. Histologic and immunohistochemical analyses of α -fetoprotein—producing cancer of the stomach. *Am J Surg Pathol* 2012;36:56–65.
10. Preda O, Dema A, Iacob M, et al. Urothelial carcinoma of the renal pelvis with simultaneous trophoblastic and malignant clear cell endodermal-type differentiation. *Virchows Arch* 2012;460:353–356.
11. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the cd133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:4299–4311.
12. Chang SJ, Wang TY, Tsai CY, et al. Increased epithelial stem cell traits in advanced endometrial endometrioid carcinoma. *BMC Genomics* 2009;10:613.
13. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, et al. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev* 2009;18:137–149.
14. Roth LM, Talerman A, Levy T, et al. Ovarian yolk sac tumors in older women arising from epithelial ovarian tumors or with no detectable epithelial component. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30:442–451.
15. Clement PB, Young RH, Scully RE. Endometrioid-like variant of ovarian yolk sac tumor. A clinicopathological analysis of eight cases. *Am J Surg Pathol* 1987;11:767–778.
16. Nogales FF, Preda O, Nicolae A. Yolk sac tumours revisited. A review of their many faces and names. *Histopathology* 2012;60:1023–1033.
17. Prat J, Cao D, Carinelli SG, et al. Germ cell tumors. In: WHO classification of tumours of female reproductive organs. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH (Eds). 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. pp. 57–62.
18. Nogales FF, Quiñonez E, López-Marín L, et al. A diagnostic immunohistochemical panel for yolk sac (primitive endodermal) tumours based on an immunohistochemical comparison with the human yolk sac. *Histopathology* 2014;65:51–59.
19. Nogales FF, Dulcey I. The secondary human yolk sac has an immunophenotype indicative of both hepatic and intestinal differentiation. *Int J Dev Biol* 2012;56:755–760.
20. Preda O, Nicolae A, Aneiros-Fernández J, et al. Glypican 3 is a sensitive, but not a specific, marker for the diagnosis of yolk sac tumours. *Histopathology* 2011;58:312–315.
21. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, et al. Gata3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 2014;38:13–22.
22. Schuldt M, Rubio A, Preda O, et al. GATA binding protein 3 expression is present in primitive patterns of yolk sac tumours but is not expressed by differentiated variants. *Histopathology* 2016;68:613–615.
23. Cao D, Allan RW, Cheng L, et al. RNA-binding protein lin28 is a marker for testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 2011;42:710–718.

24. Cao D, Guo S, Allan RW, et al. Sall4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguishing yolk sac tumor from clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009;33:894–904.
25. Houghton O, Connolly LE, McCluggage WG. Morules in endometrioid proliferations of the uterus and ovary consistently express the intestinal transcription factor CDX2. *Histopathology* 2008;53:156–165.
26. Ramalingam P, Malpica A, Silva EG, et al. The use of cytokeratin 7 in differentiating yolk sac tumors from endometrioid and clear cell carcinomas of the ovary. *Lab Invest* 2003;83:207A–207A.
27. Nogales FF, Dulcey I, Preda O. Germ cell tumors of the ovary: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:351–362.
28. Rabban JT, Zaloudek CJ. A practical approach to immunohistochemical diagnosis of ovarian germ cell tumours and sex cord–stromal tumours. *Histopathology* 2013;62:71–88.
29. Heifetz SA, Cushing B, Giller R, et al. Immature teratomas in children: pathologic considerations: a report from the combined pediatric oncology group/children's cancer group. *Am J Surg Pathol* 1998;22: 1115–1124.
30. Nogales FF, Preda O, Dulcey I. Gliomatosis peritonei as a natural experiment in tissue differentiation. *Int J Dev Biol* 2012;56: 969–974.
31. Liang L, Zhang Y, Malpica A, et al. Gliomatosis peritonei: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 21 cases. *Mod Pathol* 2015;28:1613–1620.
32. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, et al. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1842–1848.

Germ cell tumor growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favoring their origin from somatic stem cells

Nogales FF¹, Prat J², Schuldt M¹, Cruz-Viruel N¹, Kaur B⁶, D'Angelo E³, Matias-Guiu X⁵, Vidal A⁵, McCluggage WG⁷, Oosterhuis JW⁴

From the Departments of Pathology at the Universities of Granada, Spain (1), Autonomous University of Barcelona, Spain (2), University of L'Aquila, Italy (3) and Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam, The Netherlands (4). Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain (5), Imperial College Healthcare NHS Trust London, UK (6) and Belfast Health and Social Care Trust, Belfast, UK (7)

Francisco F Nogales MD, PhD. Professor of Pathology, University of Granada, 18016 Granada, Spain (fnogales@ugr.es)

Jaime Prat, MD, PhD, FRCPath, Emeritus Professor of Pathology, Autonomous University of Barcelona, Spain (JPrat@santpau.cat);

Maolly Schuldt MD. Fellow in Pathology, University of Granada, 18016 Granada, Spain (maollyschuldt@hotmail.com)

Nelly Cruz-Viruel MD. Fellow in Pathology, University of Granada, 18016 Granada, Spain (nellycruzv@yahoo.com)

Baljeet Kaur MD. Department of Pathology, Imperial College Healthcare NHS Trust London, United Kingdom (baljeetkaur@doctors.org.uk) (baljeet.kaur3@imperial.nhs.uk)

Emanuela D'Angelo, MD, PhD, Professor of Pathology, Department of Life, Health & Environmental Sciences, University of L'Aquila, Italy (emadangelo@gmail.com)

Xavier Matias Guiu MD, PhD. Department of Pathology, Hospital de Bellvitge, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (xmatias@bellvitgehospital.cat)

August Vidal MD. Department of Pathology, Hospital de Bellvitge, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (avidal@bellvitgehospital.cat)

W Glenn McCluggage MD, Department of Pathology, Belfast Health and Social Care Trust, Belfast, United Kingdom (glenn.mccluggage@belfasttrust.hscni.net)

J Wolter Oosterhuis, MD, PhD. Professor of Pathology, Department of Pathology, Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam, The Netherlands (j.w.oosterhuis@erasmusmc.nl)

Corresponding author: Professor Francisco F Nogales. Department of Pathology. Facultad de Medicina, Avenida de la Investigación, 18016 Granada, Spain. fnogales@ugr.es

ABSTRACT

We report 11 ovarian and 1 endometrial cases, often associated with endometriosis, of a combination of clear cell neoplasms and germ cell tumor (GCT) in elderly females. Clear cell tumors included carcinoma (CCC) and cystadenofibroma, whereas GCT was always glandular yolk sac tumor (YST). Additionally, in 4 cases, CCC coexisted with teratoma with mature and immature neuroepithelial and endodermal tissues, and embryonal carcinoma-like areas with true embryoids.

For distinguishing between CCC and YST components, we used the following antibodies: HNF1- β , Napsin-A, CK7, PAX8, EMA, AFP, SALL4, villin, Glypican-3, GATA3, HepPar-1, OCT4, CDX2, CD30 and SOX2. HNF1- β , CK7, EMA and Glypican-3 were expressed in both CCC and glandular YST and considered nonspecific. Other markers had higher specificity for each cellular lineage: Napsin-A and PAX8 were only expressed in CCC, while SALL4, villin, AFP and HepPar-1 and were positive in glandular YST and negative in CCC. 12p analysis was unremarkable.

OCT4 expression occurred in 6/10 cases and consistently in teratoma (4/4) taking place in both blastemal and embryonal carcinoma-like areas. We propose that these cancer cells differentiate into GCT and represent stem cells induced to pluripotency similar to induced pluripotent stem cells (iPSC), possibly conditioned by aging-related epigenetic factors. These neoplasms resemble in part, pediatric GCT, showing lack of 12p gain, preponderance of YST and coexistence with immature neuroectoderm. However, resemblance is not complete, since there are also

embryonal carcinoma-like areas with embryoid bodies, usual of postpubertal testicular GCT; however with a distorted phenotype with weak or absent SOX2/CD30 expression.

Key words: endometrioid, aging, clear cell carcinoma, yolk sac tumor, germ cell tumor, teratoma, immunohistochemistry, pluripotency, iPSC, OCT4, SOX2, 12p chromosome.

INTRODUCTION

Germ cell tumors (GCT) rarely develop from somatic epithelial neoplasms in gonadal and extragonadal sites such as the sinonasal area,(179) stomach,(117) bladder and kidney.(118) In contrast with the usual types of GCT that affect children and adolescents, they almost invariably occur in elderly patients. The most frequent GCT growth pattern arising from epithelial neoplasms is yolk sac tumor (YST), usually of glandular type, and less frequently teratomas with immature neural, squamous, and mesenchymal tissues and choriocarcinoma. Noteworthy, however, seminoma/dysgerminoma has never been reported in association with a somatic tumor.

In the female genital tract, these combined tumors have been described in the ovary and less frequently in the uterine corpus, often adjacent to or admixed with Müllerian lesions; most commonly endometrioid adenocarcinoma and endometriosis,(125, 180, 181) and less frequently with serous(131) and mucinous carcinomas.(132)

Possibly due to the histologic similarities between clear cell carcinoma (CCC) and glandular YST, very few cases of this particular combination have been described.(152, 182) In this study, we report 12 cases (11 ovarian and one uterine tumors) exhibiting a mixture of glandular YST and clear cell tumor elements, including 11 carcinomas and one borderline tumor. In order to facilitate the distinction between CCC and glandular YST components in this setting, we used a panel of antibodies often applied to both CCC(183) and GCT.(159)

Furthermore, to elucidate the pathogenesis of the GCT component, we analyzed the expression of pluripotency markers in all cases and 12p status in 4 in which GCT patterns other than YST were present. We also describe the presence of embryoid bodies, a hitherto unreported finding in GCT of somatic origin.

MATERIAL AND METHODS

Cases

Twelve tumors exhibiting both CCC and GCT components were collected from the consultation files and routine practice of the following authors: AVB and XMG (Barcelona, Spain) cases 1&2, WGM (Belfast, UK) cases 3&4; JP and EDA (Barcelona, Spain) cases 5&6, BK (London, UK) cases 7&8 and FNF (Granada, Spain) cases 9-12. Cases 3, 4 and 12 have been previously reported (180, 184). Clinical and macroscopic data were available in all cases. Paraffin blocks were available for immunohistochemistry in all but case 4.

Immunohistochemistry

Routine immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin sections, with the following antibodies (Master Diagnostica, Granada): hepatocyte nuclear factor beta (HNF1- β), Napsin-A, cytokeratin 7 (CK7), paired box gene 8 (PAX8), epithelial membrane antigen (EMA), α -fetoprotein (AFP). Spalt-Like Transcription Factor 4 (SALL4), villin, glypican-3 (GPC-3), GATA binding Protein 3 (GATA3), hepatocyte paraffin-1 (HepPar-1), octamer-binding

transcription factor 4 (OCT4), caudal type homeobox 2 (CDX2), CD30, and sex determining region Y-Box 2 (SOX2).

12p analysis.

Cases 6, 9, 10 and 12 which exhibited GCT patterns other than YST, were analyzed with a dual-color FISH probe strategy to identify structural and/or numeric alterations of chromosome 12p. A Texas red-labeled centromeric probe for chromosome 12 (SureFISH Chr12 CEP, Agilent Technologies) and a FITC-labeled subtelomeric probe (SureFISH 12p13.33 Chr12pTel, Agilent Technologies) were used. The hybridization was performed according to the manufacturer's instructions.

Signal scoring. A structurally normal chromosome 12 would produce a single red signal (1R) with a single green signal (1G), representing one chromosome 12 centromere and one 12p region, respectively. Thus, a nucleus with 2 normal copies of chromosome 12 would be expected to show 2 pairs of 1R1G signals. If a genetic rearrangement has created an i(12p), the resulting FISH pattern should reflect the presence of two 12p regions with an interceding chromosome 12 centromeric region, demonstrating a 1G1R1G signal pattern. A total of 50 cells per case were analyzed. Tumor samples were interpreted as positive for i(12p) if more than 15% of the cells analyzed demonstrated a 1G1R1G signal pattern. Samples were considered to be polysomy for chromosome 12 if more than 10% demonstrated greater than 2 1R1G FISH signals per cell.

This study is a retrospective description of a series of cases and ethics committee approval is not required.

RESULTS

Clinical data

Clinicopathologic results are summarized in Table 1. Patients ranged from 37 to 94 years with a mean/average age of 62 years. All patients except 2 (cases 5 and 9) were postmenopausal. All cases comprised ovarian tumors with the exception of case 12, in which the tumor was an endometrial primary. Symptoms were the usual nonspecific ones for ovarian and uterine masses. Following surgery (surgical procedures are provided in Table 1) and pathological examination, 4 patients were FIGO stage I, 3 stage II, 4 stage III and one stage IV. All but two patients (cases 3 and 12) were treated with various chemotherapy regimens.

Follow up was available in all cases. Four patients are alive and well with follow up ranging from 15 months to 4 years. Eight patients died of tumor, one died of postoperative complications and the others 16 months to 3 years following surgery. Follow up revealed elevated serum AFP levels in three cases (all less than 300ng/ml) and in case 6 an elevated serum hCG.

Pathologic Features

Macroscopic findings. The tumors were generally large and bulky, with an average diameter of 12cm (minimum 2cm and maximum 20cm). They were predominantly solid with multiple cystic areas and interspersed hemorrhage and necrosis.

Microscopic findings.

1. *Coexistence of CCC and YST.* Four cases (1, 4, 8, 10) contained pure CCC with tubulocystic, papillary and solid patterns, while case 3 had a borderline clear cell adenofibroma. In the remaining cases, various patterns of CCC coexisted with endometrioid adenocarcinoma (cases 2, 5, 6, 7, 9, 11) or uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor) (case 12).

The GCT component in all cases contained a glandular type YST which occurred as a pure pattern in cases 1 and 3, overwhelmingly predominant in cases 8 and 10 and associated with a focal component of classic microcystic pattern of YST in cases 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11.

The CCC and glandular YST sometimes merged (Fig 1a) and in other cases abutted to each other (Fig 1b). In case 3, the borderline clear cell adenofibroma coexisted with areas of glandular YST with mucinous differentiation (Fig 1c). Although the glandular YST resembled CCC due to their shared cytoplasmic vacuolation, the former was recognized by a taller and relatively uniform cellular lining, polarized basal vacuoles and sometimes a marked periglandular basophilic stromal rarefaction (Fig 1d). Case 10 showed a remarkable transition between CCC and

YST. Cysts exhibited the coexistence of CCC and glandular YST elements in the form of a biphasic lining in several cysts (Figs 2a-b). Each component was identified by its characteristic immunoprofile (see below) (Figs 2c-d).

2. *Coexistence of CCC with both YST and teratoma.* CCC was associated with components other than YST in GCT in cases 9-12. The most prevalent component was an admixture of highly immature neural and endodermal tissues; these were present in all but case 11. The neurogenic components were represented by characteristic neural tubules (Figs 3a-b), blastema, neuroepithelial rosettes and areas of glial differentiation with characteristic fibrillary matrix. In case 12, there was extensive neuroendocrine, neuroglial, neuronal, and melanocytic differentiation, including patterns identical to glioblastoma multiforme. Immature neuroectodermal elements were intimately admixed with glandular YST (Fig 3a) or hepatoid tissue (Fig 3b). Each component had a distinctive immunophenotype: the immature endodermal areas were positive for villin (Fig 3c) and the neural areas for SOX2 (Fig 3d).

In cases 6 and 11, a remarkable organoid association of endodermal and neurogenic structures in cases 6 and 11 (Figs 4a-b) consisted of embryoid-like bodies with a characteristic caricature of a SOX2 positive neuroectodermal plate (Fig 4c) surrounding a yolk sac structure with hepatic tissue positive for villin (Fig 4d).(144)

Other additional teratoid components coexisting with glandular YST included mature squamous epithelium, unrelated to endometrioid adenocarcinoma in cases

8-10 (Fig 5a), melanin pigment in cases 9 (Fig 5b) and 12, striated muscle differentiation (Fig 5c) in cases 9 and 10, and immature cartilaginous nodules in case 10. Choriocarcinomatous areas (Fig 5d) were found in case 6 and isolated syncytiotrophoblasts in case 12. These teratoid components were not part of a preexisting dermoid cyst.

3. Association with endometriosis or cystadenofibromas. Five cases (cases 5, 7, 9-11) showed coexisting endometriosis, which was prominent in the two premenopausal patients. Four cases had cystadenofibromas, 1 of endometrioid type with associated endometriosis (case 7); two were of pure endometrioid type (cases 2 and 6) and one was a borderline clear cell cystadenofibroma (Case 3).

Immunohistochemistry

Although CCC (including a borderline clear cell tumor) and glandular YST (Fig 6a & b) components showed characteristic immunophenotypes, they shared the expression of some markers. HNF1- β was expressed in 11/12 cases of CCC and 6/12 of glandular YST (Fig 6c-d). Immunostaining tended to be diffuse in CCC but heterogeneous in glandular YST. CK7 was positive in all cases of CCC, and was also strongly expressed, albeit patchily, in 5/11 glandular YST. EMA was expressed in all but in one case of CCC; however, glandular YST also had a high rate of EMA expression (9/12). Glypican-3 was expressed in 2/12 CCCs, which contrasted with a higher proportion of positivity in glandular YST (10/12). GATA 3 showed focal staining in two cases of CCC and it was diffusely positive in the microcystic areas of 5 YST and focally positive in the glandular areas in two cases.

Other markers exhibited higher specificity for each tumor component. Napsin-A and PAX8 (Figs 6e-h) were expressed only by CCC (9/10 versus 0/11 in YST) which was negative for SALL4 (Figs 6i-j), villin (Figs 6k-l), AFP and HepPar-1, all of which were positive in practically all cases of glandular YST.

Figure 7 shows the immunophenotype of the papillary areas of glandular YST expressing HNF1 β , CK7, EMA, AFP, SALL4, villin, Glypican-3 and HepPar-1 (Figs 7a-h)

OCT4 expression was studied in 10 cases. Nuclear positivity was present in 6 cases (cases 5, 6, 8, 9, 11 and 12) in the form of isolated positivity of a few cells (case 5) (Figs 8a-b) or in solid blastemal areas (cases 8, 9, 11) (Figs 8c-d) that were fenestrated (Figs 8e-f) and resembled embryonal carcinoma in cases 6 and 12. Additionally, OCT4 positive elements also coexpressed SOX2 in a weak focal positivity in cases 11 and 12. Focal, weak CD30 expression occurred only in case 12.

Immunohistochemical features are summarized in Table 2.

12p status

Three cases (cases 6, 9 and 10) were interpreted as exhibiting normal 12p copies. In case 12, there was an increase of the 12p region in comparison with 12 centromere, but the final score was consistent with polysomy.

DISCUSSION

Somatically-derived GCTs of the female genital tract have been mainly described in association with endometrioid lesions, ranging from histologically benign endometriosis,(127) well differentiated,(125, 181) to high grade adenocarcinomas(129, 180) and carcinosarcomas.(130) The terms neometaplasia and retrodifferentiation have been used to define this association.

Epidemiologically, these combined tumors affect a substantially older age group than usual-type GCT, with an average age of 63 years.(181) This explains data from histopathologic-based registries (29, 85) revealing an unusual GCT incidence peak at age 65-75. It is possible that many such cases may go unrecognized as the GCT component may have overgrown and effaced the original somatic tumor.(41, 182)

Histologically, the tumors are invariably non-dysgerminomatous neoplasms of large size that typically exhibit glandular YST as the predominant GCT pattern. They are often associated with endometrioid lesions and present at advanced clinical stages.

In this study, we report 12 cases of ovarian and 1 uterine neoplasms containing a component of somatic CCC or borderline clear cell adenofibroma in conjunction with YST and other teratomatous elements. Given the morphologic overlap between the clear cell components and glandular YST, we undertook a detailed immunohistochemical analysis to investigate which markers were of most value in distinguishing between the two components. Furthermore, we attempt to identify a pluripotent cell population in order to explain their histogenesis.

The CCC-derived GCT in the present series, involved a similar age group as endometrioid carcinoma-derived GCT(181) and equally, over half of cases were diagnosed in the advanced clinical stage and had a poor outcome. Endometriosis or benign endometrioid adenofibromas were present in all but two cases, highlighting the frequent association of these precursor lesions with CCC.(185) Histologically, all the CCCs and the borderline clear cell adenofibroma exhibited the various characteristic patterns of these neoplasms.(151) The GCT component always included foci of glandular YST admixed in a minority of cases with foci of classic microcystic YST. In four cases, both mature and immature teratomatous components were also present. The glandular YST often simulated the histology of endometrioid carcinoma.(145)

CCC-derived YST: Traditionally, CCC has represented the main differential diagnosis of glandular YST.(167) The finding of clear vacuolated cells, hyaline globules, and tubulopapillary patterns in the absence of diagnostic patterns of YST may result in a hybrid phenotype that often hinders the identification of the two

tumor components. However, in glandular YST, the presence of tall cylindrical cells with regular nuclei, polarized apical or subnuclear vacuoles, occasional goblet cells, and subepithelial stromal rarefaction at the periphery facilitate the recognition of the YST component.

Immunohistochemistry is necessary for establishing the correct diagnosis, and a panel of markers should always be used since aberrant staining patterns may occur(186, 187) and “characteristic markers” may be expressed by both components. Therefore, diagnostic accuracy is improved by using markers of both CCC(151) and YST(159). Before these were available, distinction between YST and CCC was difficult and it could be speculated that previously published cases of CCC exhibiting AFP or Glypican-3 expression(187-191) were either pure CCC with ectopic AFP secretion or possibly, glandular YST resembling CCC(41). In our series, AFP was consistent, but heterogeneously expressed in practically all cases of YST but not in any CCC, while Glypican-3 had a similar expression to AFP in YST but also showed weak focal positivity in 2 cases of CCC. Among the other markers frequently used for distinguishing between CCC and YST, HNF1- β is a marker often used to identify CCC. However, this is also often expressed in YST(191). Indeed, in the present series, HNF1- β was positive in half of the glandular YST components.

CK7 and EMA are consistently positive in CCC, with most studies showing these markers to be negative in YST.(33) However, although this is true for the classical

microcystic-reticular pattern of YST, strong and heterogeneous expression for CK and EMA occurred in glandular YST in over half of our cases.

GATA3 is typically not expressed by CCC,(192) but has been proposed as a marker of classical YST;(158) however, glandular YST is usually negative.(124) This marker was positive in only 2/10 cases of glandular YSTs in our study; there was also focal expression in two cases of CCC. In keeping with prior studies,(158) GATA3 was positive in the areas of classic microcystic-reticular YST patterns.

PAX8, a broad Müllerian-derived tumor marker,(149) and Napsin-A(162) are frequently expressed by CCC. In our series, both markers were consistently positive in the CCC components but never in the YST elements in our study, thus confirming their usefulness in distinguishing between the two components.

Among YST markers, SALL4 is an indicator of stemness-retaining cells and consequently it is expressed by YST of both classic and glandular type. In all our cases, SALL4 was expressed in all areas of GCT, both teratoma and glandular YST, but was negative in CCC components.(193) Additionally, villin, a marker of human yolk sac and early endoderm(159) was constantly expressed both in microcystic and glandular YST but never in CCC. HepPar-1, an antibody often expressed by glandular and hepatoid YST, was focally positive in over half of our cases of glandular YST component but was never expressed in CCC.

The findings of this study demonstrate first that glandular YST is the predominant pattern in these rare tumors. Glandular YST is relatively uncommon and under recognized pattern of YST and shares morphological and immunocytochemical overlaps with CCC. Secondly, the expression of often described "characteristic immunocytochemical markers", including CK7, EMA, HNF1- β and Glypican-3, is unclear. These markers were co-expressed by both components in varying proportion. Hence these cannot be reliably used to distinguish between glandular YST and CCC. A wide comprehensive panel including SALL-4, Villin, Napsin-A and PAX-8 improves the diagnostic accuracy in these cases. Thirdly, rare teratomatous elements can be seen in some of these tumors.

CCC-derived YST with teratoma. We identified further teratoid tissues that were intimately admixed with CCC and YST in four cases. These included neural tissues in four cases, two of them with melanin pigmentation, mature squamous epithelium in three, mature striated/ skeletal muscle differentiation in two, and immature cartilaginous nodules in one. Foci of trophoblastic differentiation were found in two cases. Of special interest, was the presence of a concomitant biphasic proliferation of highly immature neuroectoderm (blastema and neurotubules) and endoderm (glandular and microcystic YST) in three cases.

They had different immunophenotypes; the endodermal elements expressing AFP, Glypican-3, villin and HepPar-1 and the neuroectoderm, SOX2. In two cases, this pattern became organoid forming embryoids; i.e., a caricaturized cavity of primitive yolk sac and a surrounding neuroectodermal layer. The coexistence of immature

neuroectoderm and endoderm is often found in pediatric ovarian high grade immature teratomas, in which AFP elevation and the corresponding presence of endodermal YST-like proliferations are relevant prognostic factors.(169, 170)

In these cases, it is likely that the GCT elements originate from the “parent” CCC. The possibility that mature squamous epithelium, striated/ skeletal muscle and cartilage were remnants of a dermoid overgrown by the tumor was excluded taking into account the absence of characteristic hair and sebum. Moreover, the intimate admixtures of growth patterns, with one case showing cysts simultaneously lined by CCC, glandular YST and mature squamous epithelium, likely expressed tumor heterogeneity rather than collision. In the literature, these polydifferentated tumors have been reported as immature teratoma in the uterus.(153, 194) In the ovary, a case of association of immature teratoma and carcinoid with endometrioid carcinoma was reported in a 72 year old female.(180)

Another case report showed the coexistence of ovarian CCC, YST, teratoma and areas of tumor interpreted as an embryonal carcinoma and was reported as a mixed germ cell tumor.(152)

Regarding pathogenesis, the cell of origin of neoplasms sharing GCT histology is far from being univocal. The pluripotency for a given GCT is determined both by the developmental state of their precursor stem cells and the epigenetic changes such as genomic imprinting as well as reprogramming.(173) These interactions are modulated by location, gender and age at presentation.

In our cases, the older age of most patients makes an origin from germ cells unlikely. However, the probable pathogenesis of CCC-derived GCT is that somatic cancer cells, probably cancer stem cells(174), are induced to pluripotency.(195, 196) These cancer-derived induced pluripotent stem cells (iPSC), like genetically engineered iPSC,(197, 198) may form tumors with a developmental potential resembling that of pediatric GCTs, which are typically composed of somatic tissue with occasional OCT4 positive, SOX2 and CD30 negative stem cells in immature neural areas.(172, 199, 200) It is thus likely that the OCT4 positive cells in our cases correspond to embryonal stem cells in the primed state.(173, 201)

Formation of iPSCs in Müllerian neoplasms is probably due to epigenetic factors. Taking into account the age of the patients it may be assumed that age-related gradual loss of DNA methylation can result in aberrant gene activation.(171) Even more so in CCC, a fast growing neoplasm, where additional cancer-related epigenetic changes may disrupt the stem cell program,(137) and cause loss of imprinting.(135) In particular, imprinting of H19 and IGF-II is often lost in epithelial cancers of the ovary(136) due to hypomethylation. This is consistent with the hypothesis that development of a GCT component in CCC of ovary results from derepression of pluripotency genes, such as OCT4 and SOX2. This assumption is substantiated by our finding of cells retaining a high degree of stemness(184) with OCT4 nuclear expression in half of our cases, either as isolated foci or in more extensive blastemal areas. Additionally, in two cases, they had histology reminiscent of embryonal carcinoma forming solid or fenestrated sheets of large cells showing pleomorphic nuclei and macronucleoli and embryoids.

These cells, however, also had an incomplete embryonal carcinoma immunophenotype, since they had no 12p gain and only expressed SOX2 in a weak, focal fashion. Furthermore, CD30 was only focally expressed in one case. Previously, OCT4 expression has been reported only in high grade immature ovarian teratomas,(172) but not in Müllerian-derived GCT.

CCC-derived GCTs resemble pediatric GCTs (*synonym: type I GCTs* (173, 202)) which originate from a pluripotent, methylated primordial germ cell. These similarities include a lack of 12p gain and preponderance of YST that may coexist with immature neuroectoderm.(170) In fact, most progressed pediatric GCTs are mainly composed of YST that probably have outgrown and obscured the teratoma from which they originated.(173, 203-208) Consistent with this pattern, we found that the main component of CCC derived GCTs is glandular YST, although less frequently there were combinations of immature and mature teratoma elements.

Nevertheless, in our cases, the resemblance to pediatric, type I GCTs is incomplete, since there were also features such as embryonal carcinoma-like cells co-expressing OCT4 and SOX2. Their presence, corresponding to embryonal stem cells in the ground state,(173, 201) is inconsistent with pediatric-type GCT, but a relevant feature of postpubertal testicular-type non-seminomatous GCT (*synonym Type II GCT*.(40, 173, 202))). However, our cases with teratoma were negative for 12p gain, a usual feature in postpubertal testicular-type GCT. Likewise, GCT developing from genetically engineered iPSCs may contain embryonal carcinoma

and/or somatic type malignancy, sometimes as the only component, particularly when the pluripotency-inducing vectors included the MYC gene.(174, 209-211)

In summary, we postulate that somatically-derived malignant stem cells in CCC, behave as genetically engineered iPSCs and give rise to components resembling GCT with incomplete features of both pediatric, type I GCT (teratoma, immature teratoma, and the endodermal structures YST and trophoblast) and of postpubertal non-seminomatous, type II GCT, including embryonal carcinoma, even with an organoid arrangement into embryoids.

Illustrations.

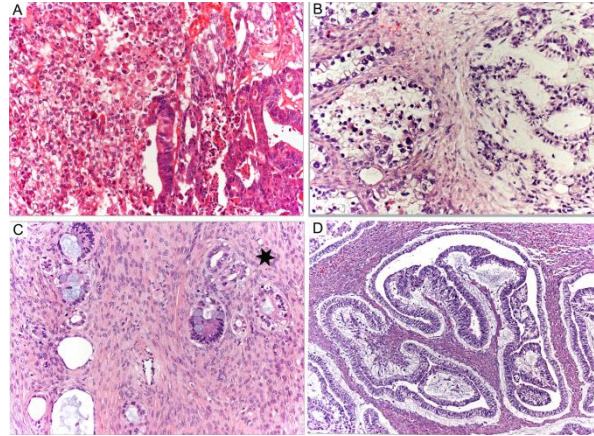


Figure 1. Case 5. Coexistence of CCC with YST. Solid CCC merging with a glandular YST that resembles endometrioid carcinoma (A). Case 8. Tubular pattern of CCC (left) opposed to a glandular YST (right) (B). Case 3. Locules of borderline CCC cystadenofibroma with focal differentiation into glandular YST (asterisk) also presenting a goblet cell differentiation (C). Case 8. Glandular YST with characteristic basophilic subepithelial rarefaction (D).

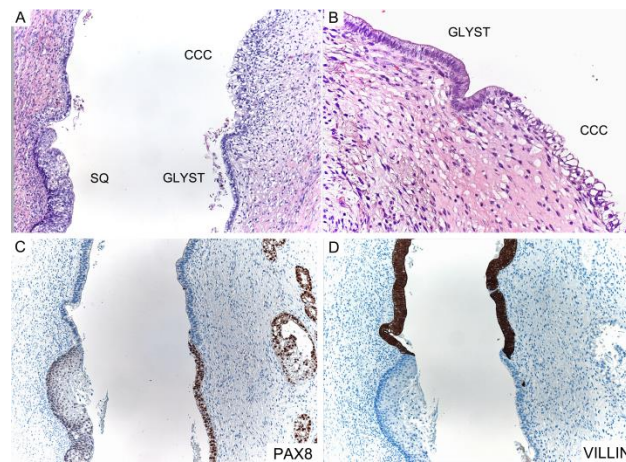


Figure 2. Case 10. Transitional areas between CCC and glandular YST (GLYST). Although both line a cyst with a focal squamous differentiation (A), their limits are clear cut (B). Immunohistochemically, CCC is identified by its PAX8 expression (C) while glandular YST expresses villin (D).

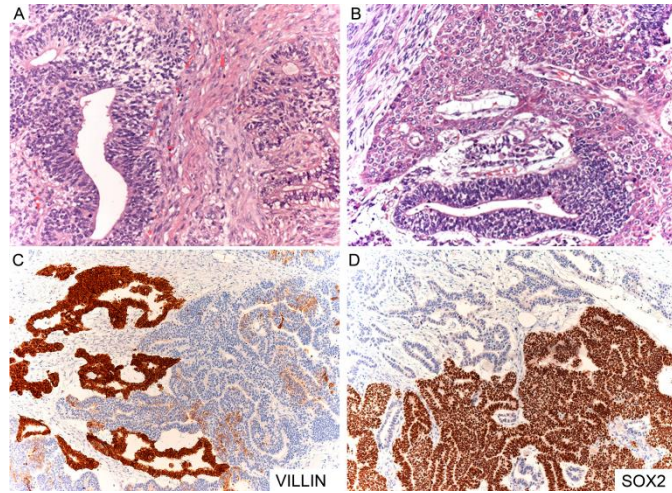


Figure 3. Case 9. Simultaneous endodermal and neural differentiations (A). A neuroepithelial rosette (left) faces foci of glandular YST (right) (B). Hepatoid tissue (top) merges with a neuroepithelial rosette (bottom center). Glandular YST is identified by its villin expression (C) while neuroepithelium expresses SOX2 (D).

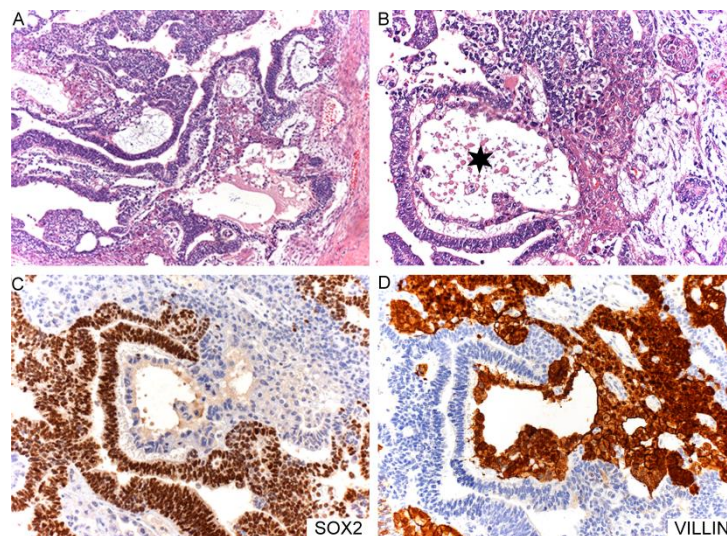


Figure 4. Case 11. Organoid association of endo and neurogenic structures forming embryoid-like bodies (A&B) with a primitive vitelline cavity (asterisk) surrounded by a neuroectodermal plate expressing SOX2 while the yolk sac lining reveals a strong stain for villin (D).

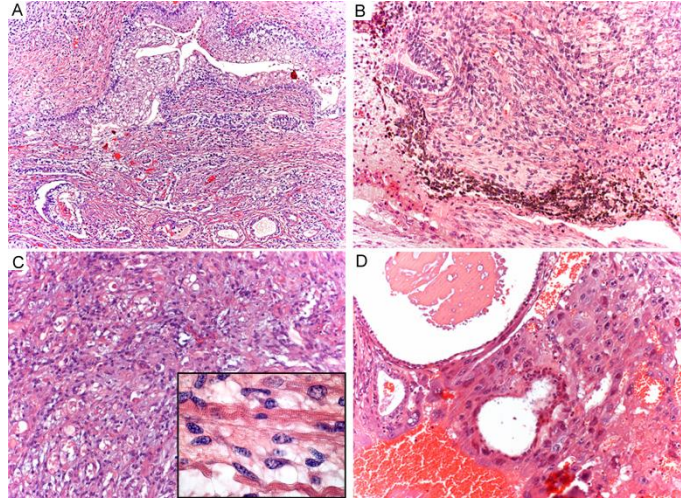


Figure 5. Other tissue differentiations associated with CCC: squamous epithelium (A) coexisting with melanin-pigmented neuroepithelium (B) in case 9. Mature striated cells (higher magnification inset) in case 10 (C) and choriocarcinoma (D) in case 6.

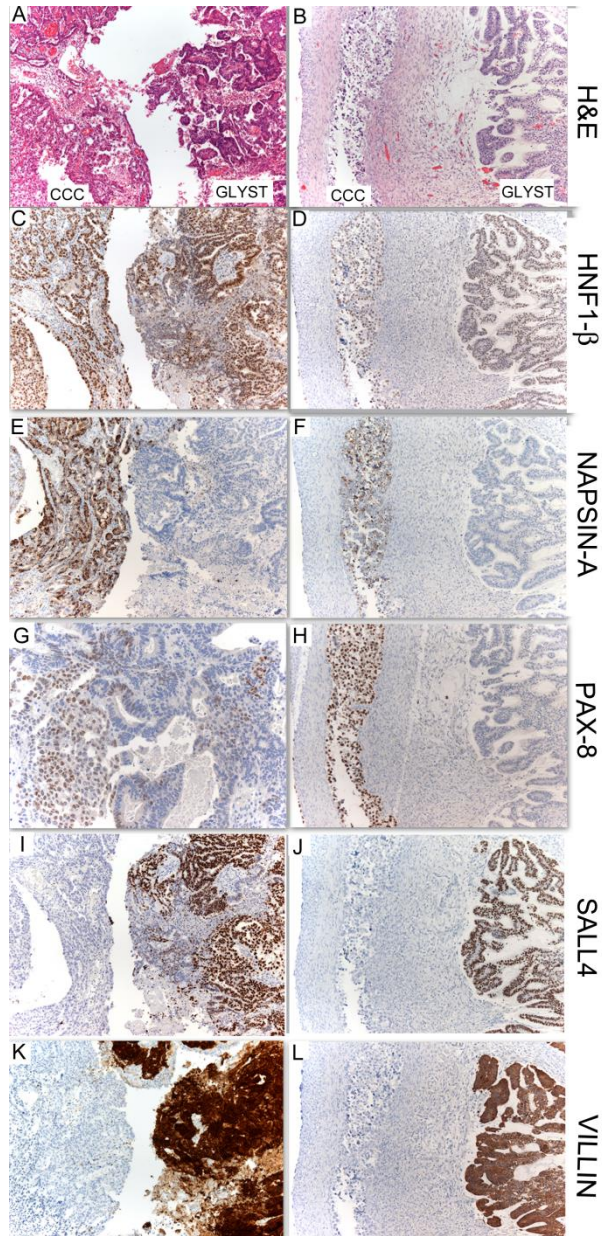


Figure 6. Immunohistochemistry of interface between CCC and glandular YST (GLYST) corresponding to cases 5 (A) and 8 (B). HNF1- β (C&D) stains both tumor patterns, while Napsin-A (E&F) and PAX8 (G&H) only stains CCC. SALL4 (I&J) and villin (K&L) show high specificity for glandular YST.

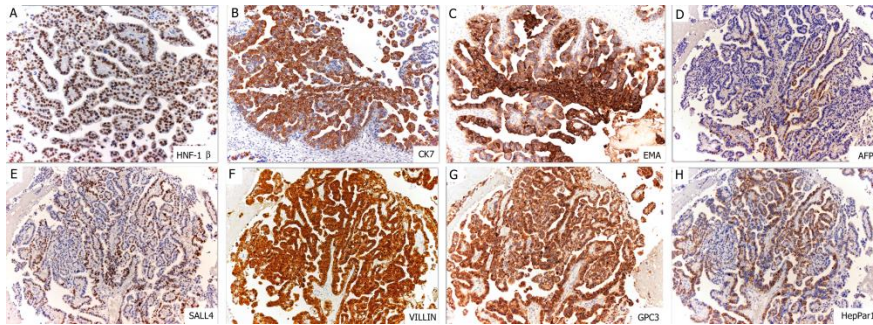


Figure 7. Case 10. An area of papillary glandular YST mimics the usual immunophenotype of CCC, with strong expression HNF1- β (A), CK7 (B) and EMA (C). AFP (D) stains only weakly, SALL4 (E) distribution is heterogeneous. Both villin (F) and Glypican-3 (G) and HepPar-1 (H) are diffusely expressed.

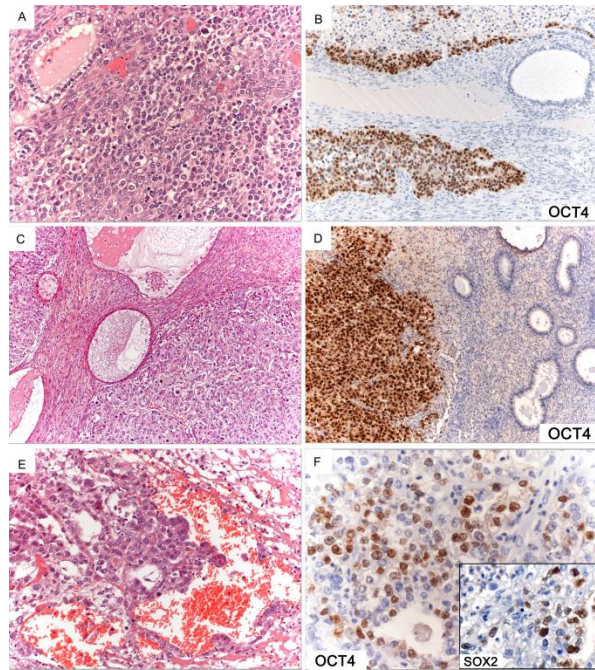


Figure 8. Expression of OCT4 in blastemal, embryonal carcinoma-like areas of case 12 (A&B), solid sheets in case 6 (C&D) and pseudoglandular, fenestrated areas of case 6, also coexpressing SOX2 focally (inset) (D&E).

TABLA 1

	AGE (years)	SITE/SIZE	HISTOPATHOLOGIC COMPONENTS		Associated lesion	STAGE	TREATMENT	FOLLOW-UP
			Somatic tumor	Germ cell tumor				
1	76	Left ovary/ 2cm	CCC	Pure GLYST		III	TAH-BSO, Omentectomy, Chemotherapy	DOD 1 year
2	94	Left ovary/ 19cm	ENC+CCC	GLYST+MYST	END-CAF	I	TAH-BSO,Omentectomy, Chemotherapy	Disseminated metastases, DOD 1 year
3	79	Left ovary/ 8cm	Borderline CC adenofibroma	Pure GLYST		I	TAH-BSO	AW 21 months
4	48	Left ovary/ 18cm	CCC	GLYST+MYST		III	LSO, Omentectomy, Chemotherapy	DOD 16 months after diagnosis
5	37	Left ovary/ size not known	ENC+CCC	GLYST+MYST	Endometriosis	I	LSO, Chemotherapy.	DOD 18 months after diagnosis. Early recurrences.
6	57	Right ovary/ 15cm	ENC+ CCC	GLYST+CHO+EC L+EMBRYOID	END-CAF	II	BSO, Chemotherapy	DOD after 2 years Recurrence 7 months. Raised hCG.

7	49	Ovary (laterality not known)/ 8cm	ENC+CCC	GLYST+MYST	Endometriosis +END-CAF	II	TAH-BSO, Omentectomy, Pelvic LND, Chemotherapy	AW 2 years with negative markers
8	69	Ovary (laterality not known)/ 10cm	CCC	GLYST (predominant)+MYST SQUA (benign)		III	Debulking surgery, Omentectomy, Chemotherapy	DOD
9	40	Left ovary/ 4cm	ENC+CCC	GLYST+NEURO+STM+ SQUA (benign)	Endometriosis	I	LSO, Chemotherapy	AW 4 years
10	58	Right ovary/ 20cm	CCC	GLYST (predominant)+MYST(focal)+ NEURO+SQUA+STM+CART(benign)	Endometriosis	II	TAH-BSO, Chemotherapy	AW 15 months
11	72	Right ovary/ 17cm	ENC+CCC	GLYST+MYST+NEURO+EMBRYOID	Endometriosis	III	TAH-BSO, Chemotherapy	Early recurrence. DOD 3 years
12	69	Uterus/ 11 cm	Carcinosarcoma+CCC	GLYST+NEURO+CHO+ECL		IV	TAH-BSO	DOD in postoperative period

TABLE 1. Clinicopathologic findings. KEY. GLYST: glandular yolk sac tumor. MYST: microcystic yolk sac tumor. ECL: embryonal carcinoma-like. EMBRYOID: embryoids. CCC: clear cell carcinoma. ENC: endometrioid adenocarcinoma.. CC-CAF: clear cell cystadenofibroma. END-CAF: endometrioid cystadenofibroma. CHO: choriocarcinoma. NEURO: immature or malignant neuroepithelium. STM: striated muscle. SQUA: Mature squamous epithelium. CART: cartilage.. TAH-BSO: Total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. LSO: left salpingo-oophorectomy. LND: lymph node dissection. DOD: dead of disease. AW: alive and well. AWD: alive with disease.

TABLA 2		
Antibodies	Clear Cell Tumor	Glandular YST
HNF1-β	11/12 Diffuse	6/12 Heterogeneous
CK7	12/12 Diffuse	5/11 Heterogeneous
EMA	11/12 Diffuse	9/12 Heterogeneous
Napsin-A	9/10 Diffuse	0/11
PAX8	11/11 Diffuse	0/11
AFP	0/12	10/12 Heterogeneous
SALL4	0/12	12/12 Diffuse
Villin	0/11	11/11 Diffuse
HepPar1	0/11	7/11 Focal
GPC-3	2/12 Focal	10/12 Heterogeneous
GATA3	2/10 Focal	2/10 Focal
OCT4	6/10 Heterogeneous	0/12

Acknowledgements

The authors would like to thank the following colleagues for providing the following cases: Case 9, Maria J Pareja MD, Hospital de Valme, Seville, Spain. Case 10, José Aneiros M.D, Granada, Spain. Case 11, Ana Felix M.D, Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa, Portugal.

Bibliography

1. Thomas J, Adegboyega P, Iloabachie K, et al. Sinonasal teratocarcinosarcoma with yolk sac elements: a neoplasm of somatic or germ cell origin? *Ann Diagn Pathol.* 2011;15:135-139.
2. Kinjo T, Taniguchi H, Kushima R, et al. Histologic and immunohistochemical analyses of alpha-fetoprotein--producing cancer of the stomach. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:56-65.
3. Preda O, Dema A, Iacob M, et al. Urothelial carcinoma of the renal pelvis with simultaneous trophoblastic and malignant clear cell endodermal-type differentiation. *Virchows Arch.* 2012;460:353-356.
4. Nogales FF, Bergeron C, Carvia RE, et al. Ovarian endometrioid tumors with yolk sac tumor component, an unusual form of ovarian neoplasm. Analysis of six cases. *Am J Surg Pathol.* 1996;20:1056-1066.
5. McNamee T, Damato S, McCluggage WG. Yolk sac tumours of the female genital tract in older adults derive commonly from somatic epithelial neoplasms: somatically derived yolk sac tumours. *Histopathology.* 2016.
6. Retamero JA, Schuldt M, F. NF. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma. *AJSP: Reviews & Reports.* 2016;21:189-194.
7. Varia M, McCluggage WG, Oommen R. High grade serous carcinoma of the ovary with a yolk sac tumour component in a postmenopausal woman: report of an extremely rare phenomenon. *J Clin Pathol.* 2012;65:853-854.
8. Lopez JM, Malpica A, Deavers MT, et al. Ovarian yolk sac tumor associated with endometrioid carcinoma and mucinous cystadenoma of the ovary. *Ann Diagn Pathol.* 2003;7:300-305.
9. Roth LM, Talerman A, Levy T, et al. Ovarian Yolk Sac Tumors in Older Women Arising From Epithelial Ovarian Tumors or With No Detectable Epithelial Component. *International Journal of Gynecological Pathology.* 2011;30:442-451.
10. Yu XJ, Zhang L, Liu ZP, et al. Ovarian malignant mixed germ cell tumor with clear cell carcinoma in a postmenopausal woman. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:8996-9001.
11. Fadare O, Zhao C, Khabele D, et al. Comparative analysis of Napsin A, alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, P504S), and hepatocyte nuclear factor 1 beta as diagnostic markers of ovarian clear cell carcinoma: an immunohistochemical study of 279 ovarian tumours. *Pathology.* 2015;47:105-111.
12. Nogales FF, Quinonez E, Lopez-Marin L, et al. A diagnostic immunohistochemical panel for yolk sac (primitive endodermal) tumours based on an immunohistochemical comparison with the human yolk sac. *Histopathology.* 2014;65:51-59.
13. Garcia-Galvis OF, Cabrera-Ozoria C, Fernandez JA, et al. Malignant mullerian mixed tumor of the ovary associated with yolk sac tumor, neuroepithelial and trophoblastic differentiation (teratoid carcinosarcoma). *International Journal of Gynecological Pathology.* 2008;27:515-520.
14. Nogales FF, Dulcey I. The secondary human yolk sac has an immunophenotype indicative of both hepatic and intestinal differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012;56:755-760.
15. Lankerani MR, Aubrey RW, Reid JD. Endometriosis of the colon with mixed "germ cell" tumor. *Am J Clin Pathol.* 1982;78:555-559.
16. Rutgers JL, Young RH, Scully RE. Ovarian yolk sac tumor arising from an endometrioid carcinoma. *Hum Pathol.* 1987;18:1296-1299.
17. Garcia-Galvis OF, Cabrera-Ozoria C, Fernandez JA, et al. Malignant Mullerian mixed tumor of the ovary associated with yolk sac tumor, neuroepithelial and trophoblastic differentiation (teratoid carcinosarcoma). *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27:515-520.
18. Arora RS, Alston RD, Eden TO, et al. Comparative incidence patterns and trends of gonadal and extragonadal germ cell tumors in England, 1979 to 2003. *Cancer.* 2012;118:4290-4297.
19. Stang A, Trabert B, Wentzensen N, et al. Gonadal and extragonadal germ cell tumours in the United States, 1973-2007. *Int J Androl.* 2012;35:616-625.
20. Nogales FF, Schuldt M. Germ cell tumors of the female genital tract. . In: Nogales FF, Jimenez RE, eds. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors.* Heidelberg and New York: Springer; 2017.
21. Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol.* 2012;124:164-169.
22. Offman SL, Longacre TA. Clear Cell Carcinoma of the Female Genital Tract (Not Everything Is as Clear as it Seems). *Advances in Anatomic Pathology.* 2012;19:296-312.
23. Clement PB, Young RH, Scully RE. Endometrioid-like variant of ovarian yolk sac tumor. A clinicopathological analysis of eight cases. *Am J Surg Pathol.* 1987;11:767-778.

24. Teilm G. Endodermal sinus tumors of the ovary and testis. Comparative morphogenesis of the so-called mesoepithroma ovarii (Schiller) and extraembryonic (yolk sac-allantoic) structures of the rat's placenta. *Cancer*. 1959;12:1092-1105.
25. Esheba GE, Pate LL, Longacre TA. Oncofetal protein glypican-3 distinguishes yolk sac tumor from clear cell carcinoma of the ovary. *American Journal of Surgical Pathology*. 2008;32:600-607.
26. Maeda D, Ota S, Takazawa Y, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Modern Pathology*. 2009;22:824-832.
27. Ballotta MR, Bianchini E, Borghi L, et al. Clear cell carcinoma simulating the "endometrioid-like variant" of yolk sac tumor. *Pathologica*. 1995;87:87-90.
28. Cetin A, Bahat Z, Cilesiz P, et al. Ovarian clear cell adenocarcinoma producing alpha-fetoprotein: case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28:241-244.
29. El-Bahrawy M. Alpha-fetoprotein-producing non-germ cell tumours of the female genital tract. *European Journal of Cancer*. 2010;46:1317-1322.
30. Meguro S, Yasuda M. alpha-Fetoprotein-producing ovarian tumor in a postmenopausal woman with germ cell differentiation. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2013;17:140-144.
31. Espinosa I, Gallardo A, D'Angelo E, et al. Simultaneous carcinomas of the breast and ovary: utility of Pax-8, WT-1, and GATA3 for distinguishing independent primary tumors from metastases. *Int J Gynecol Pathol*. 2015;34:257-265.
32. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:13-22.
33. Schuldt M, Rubio A, Preda O, et al. GATA3 expression is present in primitive patterns of Yolk Sac Tumors but is not expressed by differentiated variants. *Histopathology*. 2015.
34. Nonaka D, Chiriboga L, Soslow RA. Expression of pax8 as a useful marker in distinguishing ovarian carcinomas from mammary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1566-1571.
35. Iwamoto M, Nakatani Y, Fugo K, et al. Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. *Hum Pathol*. 2015;46:957-962.
36. Cao D, Guo S, Allan RW, et al. SALL4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguishing yolk sac tumor from clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:894-904.
37. Marina NM, Cushing B, Giller R, et al. Complete surgical excision is effective treatment for children with immature teratomas with or without malignant elements: A Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *J Clin Oncol*. 1999;17:2137-2143.
38. Heifetz SA, Cushing B, Giller R, et al. Immature teratomas in children: pathologic considerations: a report from the combined Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:1115-1124.
39. Iwanaga S, Shimada A, Hasuo Y, et al. Immature teratoma of the uterine fundus. *Kurume Med J*. 1993;40:153-158.
40. Ansah-Boateng Y, Wells M, Poole DR. Coexistent immature teratoma of the uterus and endometrial adenocarcinoma complicated by gliomatosis peritonei. *Gynecol Oncol*. 1985;21:106-110.
41. Oosterhuis JW, Looijenga L. Germ cell tumors from a developmental perspective: cells of origin, pathogenesis and molecular biology; emerging patterns In: Nogales FF, Jimenez RE, eds. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*. Heidelberg and New York: Springer; 2017.
42. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010;24:2239-2263.
43. Niu Z, Hu Y, Chu Z, et al. Germ-like cell differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Cell Biochem Funct*. 2013;31:12-19.
44. Niu N, Mercado-Urbe I, Liu J. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. 2017.
45. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
46. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009;136:411-419.
47. Ngan KW, Jung SM, Lee LY, et al. Immunohistochemical expression of OCT4 in primary central nervous system germ cell tumours. *J Clin Neurosci*. 2008;15:149-152.
48. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, et al. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1842-1848.

49. Oosterhuis JW, Stoop JA, Rijlaarsdam MA, et al. Pediatric germ cell tumors presenting beyond childhood? *Andrology*. 2015;3:70-77.
50. Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 2014;15:416-430.
51. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-463.
52. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007;447:433-440.
53. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol*. 2007;211:261-268.
54. Kim HT, Choi BH, Niikawa N, et al. Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF-II genes in ovarian tumors. *Am J Med Genet*. 1998;80:391-395.
55. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, et al. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
56. Gonzalez-Crussi F. *Extragenital teratomas*. Washington, DC Armed Forces Institute of Pathology; 1982.
57. Dehner LP. Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Hum Pathol*. 1983;14:493-511.
58. Isaacs H, Jr. Perinatal (fetal and neonatal) germ cell tumors. *J Pediatr Surg*. 2004;39:1003-1013.
59. Schneider DT, Calaminus G, Koch S, et al. Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42:169-175.
60. McKenney JK, Heerema-McKenney A, Rouse RV. Extragenital germ cell tumors: a review with emphasis on pathologic features, clinical prognostic variables, and differential diagnostic considerations. *Adv Anat Pathol*. 2007;14:69-92.
61. De Backer A, Madern GC, Pieters R, et al. Influence of tumor site and histology on long-term survival in 193 children with extracranial germ cell tumors. *Eur J Pediatr Surg*. 2008;18:1-6.
62. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:210-222.
63. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle*. 2009;8:3822-3830.
64. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:268-277.
65. Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*. 2013;19:998-1004.

Bibliografía

1. Oosterhuis JW, L. Germ Cell Tumors from a Developmental Perspective: Cell origin, Pathogenesis, and Molecular Biology (Emerging Patterns). In: F N, editor. Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. Germany: Springer; 2017. p. 23-99.
2. Pantoja E, Noy MA, Axtmayer RW, Colon FE, Pelegrina I. Ovarian dermoids and their complications. Comprehensive historical review. Obstetrical & gynecological survey. 1975;30(1):1-20.
3. Young RH. A brief history of the pathology of the gonads. Mod Pathol. 2005;18 Suppl 2:S3-S17.
4. Rana SS, Swami N, Mehta S, Singh J, Biswal S. Intrapulmonary teratoma: an exceptional disease. The Annals of thoracic surgery. 2007;83(3):1194-6.
5. Sabnis RB, Bradoo AM, Desai RM, Bhatt RM, Randive NU. Primary benign vesical teratoma. A case report. Arch Esp Urol. 1993;46(5):444-5.
6. Grosfeld JL, Skinner MA, Rescorla FJ, West KW, Scherer LR, 3rd. Mediastinal tumors in children: experience with 196 cases. Annals of surgical oncology. 1994;1(2):121-7.
7. Shintaku M, Sakuma T, Ohbayashi C, Maruo M. Well-formed cerebellum and brainstem-like structures in a mature ovarian teratoma: Neuropathological observations. Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology. 2017;37(2):122-8.
8. Levin ML, Leone CR, Jr., Kincaid MC. Congenital orbital teratomas. American journal of ophthalmology. 1986;102(4):476-81.
9. Carrizo F, Pineda-Daboin K, Neto AG, Luna MA. Pharyngeal teratocarcinoma: review of the literature and report of two cases. Ann Diagn Pathol. 2006;10(6):339-42.
10. Heffner DK, Hyams VJ. Teratocarcinoma (malignant teratoma?) of the nasal cavity and paranasal sinuses A clinicopathologic study of 20 cases. Cancer. 1984;53(10):2140-54.
11. Thompson LD, Rosai J, Heffess CS. Primary thyroid teratomas: a clinicopathologic study of 30 cases. Cancer. 2000;88(5):1149-58.
12. Ohta M, Imamura Y, Mori M, Maegawa H, Kojima A, Fujieda S. Benign cystic teratoma of the parotid gland: a case report. Acta Cytol. 2009;53(4):427-30.
13. Singh S, Rawat J, Ahmed I. Immature extragastric teratoma of infancy: a rare tumour with review of the literature. BMJ Case Rep. 2011;2011.
14. Ghinescu C, Sallami Z, Jackson D. Choriocarcinoma of the spleen--a rare cause of atraumatic rupture. Annals of the Royal College of Surgeons of England. 2008;90(3):W12-4.
15. Ramachandran BS, Murugesan M, Ali M, Padmanabhan P. Primary pancreatic choriocarcinoma presenting as pancreatitis. JOP : Journal of the pancreas. 2012;13(2):217-8.
16. Fried I, Rom-Gross E, Finegold M, Simanovsky N, Revel-Vilk S, Ben-Neriah Z, et al. An infant with a diagnostically challenging hepatic teratoma, hypofibrinogenemia, and adrenal neuroblastoma: case report. Pediatr Dev Pathol. 2015;18(3):251-6.
17. Zhao J, Sun F, Jing X, Zhou W, Huang X, Wang H, et al. The diagnosis and treatment of primary adrenal lipomatous tumours in Chinese patients: A 31-year follow-up study. Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada. 2014;8(3-4):E132-6.
18. Okani CO, Aramide KO, Edegbe FO, Ogun GO, Okolo CA, Salako BL, et al. Intrarenal teratoma: report of two cases seen in a 31-year retrospective study at the

University College Hospital, Ibadan. Nigerian journal of medicine : journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria. 2014;23(3):271-5.

19. Yao XD, Hong YP, Ye DW, Wang CF. Primary yolk sac tumor of seminal vesicle: a case report and literature review. *World journal of surgical oncology*. 2012;10:189.
20. Sievert K, Weber EA, Herwig R, Schmid H, Roos S, Eickenberg HU. Pure primary choriocarcinoma of the urinary bladder with long-term survival. *Urology*. 2000;56(5):856.
21. Cotton MH, Blake JR. Dermoid cyst: a rare tumour of the appendix. *Gut*. 1986;27(3):334-6.
22. Naim M. Immature embryoid teratoma of the gall bladder: case of a primary primitive neoplasm. *BMJ Case Rep*. 2009;2009.
23. Joshi P, Parelkar S, Shetty S, Sanghvi B, Mundada D, Kapadnis S, et al. Mature duodenal teratoma in a neonate with exomphalos minor with intestinal obstruction: first case report. *Eur J Pediatr Surg*. 2014;24(2):187-9.
24. Maehira H, Shimizu T, Sonoda H, Mekata E, Yamaguchi T, Miyake T, et al. A rare case of primary choriocarcinoma in the sigmoid colon. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(39):6683-8.
25. Rubio-Fernandez A RJ, Nogales FF. Germ Cell Tumors of Miscellaneous Extragonadal Sites. In: FF N, editor. *Pathology and biology of Human Germ Cell Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 37-408.
26. Nakazawa R, Soneda S, Kinoshita A, Kitagawa H, Koike J, Chikaraishi T. A case report: primary extragonadal yolk sac tumor of penile shaft in a 2-year-old child. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2009;16(4):413-5.
27. Munghate GS, Agarwala S, Bhatnagar V. Primary yolk sac tumor of the common bile duct. *J Pediatr Surg*. 2011;46(6):1271-3.
28. Tsai TF, Chuan MT, Hsiao CH. A cystic teratoma of the skin. *Histopathology*. 1996;29(4):384-6.
29. Arora RS, Alston RD, Eden TO, Geraci M, Birch JM. Comparative incidence patterns and trends of gonadal and extragonadal germ cell tumors in England, 1979 to 2003. *Cancer*. 2012;118(17):4290-7.
30. Trama AB, F. The Epidemiology of Malignant Germ Cell Tumors: The EURO CARE study. In: F N, editor. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 11-20.
31. Damjanov I. Germ Cell Tumors: Classification, Definitions, and Terminology. In: Nogales F, editor. *Pathology and Biology of Human Germ Cells Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 1-9.
32. Damjanov I, Wewer-Albrechtsen N. Testicular germ cell tumors and related research from a historical point of view. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-4):197-200.
33. Pierce GB, Dixon FJ, Jr. Testicular teratomas. II. Teratocarcinoma as an ascitic tumor. *Cancer*. 1959;12(3):584-9.
34. Damjanov I. In Memoriam - Prof. G. Barry Pierce (1925-2015). *The International journal of developmental biology*. 2016;60(1-3):1-3.
35. Dixon FM, R. *Tumors of the Male Sex Organs*. Washington D.C. 1952.
36. Teilum G. *Special tumors of Ovary and Testis*. 2nd ed. Munksgaard, Copenhagen: J. B. Lippincott; 1976.
37. Berney DM, Looijenga LH, Idrees M, Oosterhuis JW, Rajpert-De Meyts E, Ulbright TM, et al. Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology*. 2016;69(1):7-10.
38. Skakkebaek NE. Abnormal morphology of germ cells in two infertile men. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1972;80(3):374-8.

39. Moch H, Humphrey P, Ubright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Bosman FT, Jaffe ES, Lkhani SR, Ohgaki H, editors. Lyon: IARC; 2016.
40. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(3):210-22.
41. Nogales FF, Schuldt M. Germ cell tumors of the female genital tract. . In: Nogales FF, Jimenez RE, editors. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*. 1st ed. Heidelberg and New York: Springer; 2017.
42. Teilum G, Albrechtsen R, Norgaard-Pedersen B. The histogenetic-embryologic basis for reappearance of alpha-fetoprotein in endodermal sinus tumors (yolk sac tumors) and teratomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1975;83(1):80-6.
43. Tabansky I, Stern JNH. Basics of Stem Cell Biology as Applied to the Brain. In: Pfaff D, Christen Y, editors. *Stem Cells in Neuroendocrinology*. Cham (CH)2016.
44. Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Sobhani A. Multipotent Stem Cell and Reproduction. *Journal of stem cells*. 2016;11(4):219-29.
45. Vermilyea SC, Guthrie S, Meyer M, Smuga-Otto K, Braun K, Howden S, et al. induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Neurons from Adult Common Marmoset Fibroblasts. *Stem Cells Dev*. 2017.
46. Shroff G, Dhanda Titus J, Shroff R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy. *American journal of stem cells*. 2017;6(1):1-12.
47. Denker HW. Stem cell terminology and 'synthetic' embryos: a new debate on totipotency, omnipotency, and pluripotency and how it relates to recent experimental data. *Cells, tissues, organs*. 2014;199(4):221-7.
48. Ulbright TM, Tickoo SK, Berney DM, Srigley JR, Members of the IliDUPG. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in testicular tumors: report from the International Society of Urological Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):e50-9.
49. Bashtrykov P, Jeltsch A. Epigenome Editing in the Brain. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;978:409-24.
50. Yamazawa S, Ushiku T, Shinozaki-Ushiku A, Hayashi A, Iwasaki A, Abe H, et al. Gastric Cancer With Primitive Enterocyte Phenotype: An Aggressive Subgroup of Intestinal-type Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(7):989-97.
51. Syrris P, Heathcote K, Carrozzo R, Devriendt K, Elcioglu N, Garrett C, et al. Human piebaldism: six novel mutations of the proto-oncogene KIT. *Human mutation*. 2002;20(3):234.
52. Sun YC, Wang YY, Ge W, Cheng SF, Dyce PW, Shen W. Epigenetic regulation during the differentiation of stem cells to germ cells. *Oncotarget*. 2017.
53. Nogales FF, Preda O, Nicolae A. Yolk sac tumours revisited. A review of their many faces and names. *Histopathology*. 2012;60(7):1023-33.
54. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
55. Papapetrou EP. Induced pluripotent stem cells, past and future. *Science*. 2016;353(6303):991-2.
56. Thakkar UG, Vanikar AV, Trivedi HL. Stem cells: An emerging novel therapeutic for type-1 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2017;130:130-2.
57. Iannitelli A, Quartini A, Tirassa P, Bersani G. Schizophrenia and Neurogenesis: A Stem Cell Approach. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017.
58. Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. *Circulation research*. 2017;120(12):1958-68.

59. Staal FJ, Wiekmeijer AS, Brugman MH, Pike-Overzet K. The functional relationship between hematopoietic stem cells and developing T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1370(1):36-44.
60. Lindsay SL, Barnett SC. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochemistry international*. 2017;106:101-7.
61. Uzbas F, May ID, Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Perkins AD, et al. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. *Stem cell reviews*. 2015;11(2):298-308.
62. Carelli S, Messaggio F, Canazza A, Hebda DM, Caremoli F, Latorre E, et al. Characteristics and Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived From Microfragmented Adipose Tissue. *Cell transplantation*. 2015;24(7):1233-52.
63. Bragdon B, Burns R, Baker AH, Belkina AC, Morgan EF, Denis GV, et al. Intrinsic Sex-Linked Variations in Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Bone Marrow Multipotent Stromal Cells. *J Cell Physiol*. 2015;230(2):296-307.
64. Ragni E, Parazzi V, Crosti M, Moro M, Giordano R, Lazzari L. Diet composition transiently modulates proliferative and potency features of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;55:269-78.
65. Lian EC, Larcada AF, Chiu AY. Combination immunosuppressive therapy after factor VIII infusion for acquired factor VIII inhibitor. *Annals of internal medicine*. 1989;110(10):774-8.
66. Chinnici CM, Amico G, Monti M, Motta S, Casalone R, Petri SL, et al. Isolation and characterization of multipotent cells from human fetal dermis. *Cell transplantation*. 2014;23(10):1169-85.
67. Lee YS, Lee JE, Park HY, Lim YS, Lee JC, Wang SG, et al. Isolation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from human adenoid tissue. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;31(4-5):513-24.
68. Zhao Y, Jia Z, Huang S, Wu Y, Liu L, Lin L, et al. Age-Related Changes in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells: An In Vitro Study in Rats. *Stem cells international*. 2017;2017:6761572.
69. Einhorn LH, Brames MJ, Heinrich MC, Corless CL, Madani A. Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol*. 2006;29(1):12-3.
70. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Canamero M, Rayon T, Ors I, et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 2013;502(7471):340-5.
71. Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, et al. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. *Gastroenterology*. 2017;152(1):218-31 e14.
72. Haase I, Knaup R, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J, Mahrle G. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells into keratinocyte-like cells. *European journal of cell biology*. 2007;86(11-12):801-5.
73. Wahl GM, Spike BT. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. *NPJ breast cancer*. 2017;3:14.
74. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer cell*. 2017;31(6):737-54 e6.
75. Talkhabi M, Zonooz ER, Baharvand H. Boosters and barriers for direct cardiac reprogramming. *Life sciences*. 2017;178:70-86.
76. Roy S, Sridharan R. Chromatin module inference on cellular trajectories identifies key transition points and poised epigenetic states in diverse developmental processes. *Genome research*. 2017.

77. Grant P, Pearn JH. Foetus-in-foetu. *The Medical journal of Australia*. 1969;1(20):1016-9.
78. Nogales FF, Jr., Gasca L, Llamas R, Blanco A, Sanz JF. Case Report: epignathus-clinical, radiologic, and pathologic considerations. *Int J Gynaecol Obstet*. 1977;15(1):41-3.
79. Arlikar JD, Mane SB, Dhende NP, Sanghavi Y, Valand AG, Butale PR. Fetus in fetu: two case reports and review of literature. *Pediatr Surg Int*. 2009;25(3):289-92.
80. Gan Y, Xiong C, Wu J, Li X, Lu L. [One case of retroperitoneal parasitic fetus and literature review]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*. 2012;37(2):213-6.
81. Gupta SK, Singhal P, Arya N. Fetus-in-fetu: A Rare Congenital Anomaly. *Journal of surgical technique and case report*. 2010;2(2):77-80.
82. Kim JW, Park SH, Park SS, Wang KC, Cho BK, Kim SY, et al. Fetus-in-fetu in the cranium of a 4-month-old boy: histopathology and short tandem repeat polymorphism-based genotyping. Case report. *Journal of neurosurgery Pediatrics*. 2008;1(5):410-4.
83. Ji Y, Song B, Chen S, Jiang X, Yang G, Gao X, et al. Fetus in Fetu in the Scrotal Sac: Case Report and Literature Review. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(32):e1322.
84. Ozturk A, Gunay GK, Akin MA, Arslan F, Tekelioglu F, Coban D. Multiple intraoral teratoma in a newborn infant: epignathus. *Fetal and pediatric pathology*. 2012;31(4):210-6.
85. Stang A, Trabert B, Wentzensen N, Cook MB, Rusner C, Oosterhuis JW, et al. Gonadal and extragonadal germ cell tumours in the United States, 1973-2007. *International journal of andrology*. 2012;35(4):616-25.
86. Heerema-McKenney A, Harrison MR, Bratton B, Farrell J, Zaloudek C. Congenital teratoma: a clinicopathologic study of 22 fetal and neonatal tumors. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):29-38.
87. Jimenez REG, S. Herrera-Hernandez, L. Sebo, T. Testicular Germ Cell Tumors. In: FF N, editor. *Pathology and Biology of the Human Germ Cell Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 267-325.
88. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *American journal of cancer research*. 2012;2(2):153-67.
89. Retamero JA, Schuldt M, Nogales FF. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma. *AJSP-Reviews and Reports* 2016;21:189-94.
90. Roden A. Mediastinal Germ Cell Tumors. In: FF N, editor. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 327-64.
91. Vizcaino AR, F. Central Nervous System Germ Cell Tumors. In: FF N, editor. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*. Germany: Springer; 2017. p. 365-91.
92. von Hochstetter AR, Sigg C, Saremaslani P, Hedinger C. The significance of giant cells in human testicular seminomas. A clinico-pathological study. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1985;407(3):309-22.
93. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 1964;24:1544-51.
94. Dashti NJRE. Somatic-Type Malignances in Germ Cell Tumors. In: FF N, editor. *Pathology and Biology of the Human Germ Cell Tumors*. 1 ed. Germany: Springer; 2017. p. 419-35.
95. Aggarwal N, Parwani AV. Spermatocytic seminoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(12):1985-8.
96. Di Donato N, Zanello M, Corti B, Seracchioli R, Paradisi R. Incidental diagnosis of ectopic adenohipophyseal tissue in an ovarian dermoid cyst: a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;183:203-4.

97. Axiotis CA, Lippes HA, Merino MJ, deLanerolle NC, Stewart AF, Kinder B. Corticotroph cell pituitary adenoma within an ovarian teratoma. A new cause of Cushing's syndrome. *Am J Surg Pathol.* 1987;11(3):218-24.
98. McKeel DW, Jr., Askin FB. Ectopic hypophyseal hormonal cells in benign cystic teratoma of the ovary. Light microscopic histochemical dye staining and immunoperoxidase cytochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 1978;102(3):122-8.
99. Ulirsch RC, Goldman RL. An unusual teratoma of the ovary: neurogenic cyst with lactating breast tissue. *Obstet Gynecol.* 1982;60(3):400-2.
100. Oi RH, Dobbs M. Lactating breast tissue in benign cystic teratoma. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;130(6):729-31.
101. Nogales FFJF-SJR-H, F. Matilla, A. Galera-Davidson, H. . Estudio clínico-patológico de 288 teratomas quísticos de ovario. *Patológica.* 1979;16:12-25.
102. Lopez JI, de Santamaria IS, Claros IJ, Garmendia M, Gaafar A, Bilbao FJ. Prostatic remnants in mature cystic teratoma of the ovary. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(5):378-80.
103. Shelekhova KV, Hejda V, Kazakov DV, Michal M. Mature cystic teratoma of the ovary with male accessory sexual glands including seminal vesicles, prostatic tissue, and bulbo-urethral glands: a case report. *Virchows Arch.* 2008;452(1):109-11.
104. Glavina-Durdov M, Forempoher G. Thymus tissue in ovarian cystic teratoma: possible clues to its histogenesis. *Pathol Res Pract.* 2000;196(11):795-7; discussion 8-9.
105. Zaragoza Vargas PE, Dickter S, Baquera Heredia J, Ortiz Hidalgo C. [Gastric wall in benign cystic teratoma of the ovary]. *Ginecol Obstet Mex.* 2007;75(1):43-5.
106. Tiltman AJ, Glass DR, Duffield MS. Peptic ulceration in a mature cystic teratoma of the ovary. *Histopathology.* 1995;26(4):375-7.
107. Sahin AA, Ro JY, Chen J, Ayala AG. Spindle cell nodule and peptic ulcer arising in a fully developed gastric wall in a mature cystic teratoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114(5):529-31.
108. Agarwal K, Agarwal C, Agarwal S, Chaddha R. Mature teratoma with loops of colon: a case report. *Indian J Pathol Microbiol.* 2007;50(2):405-7.
109. Woodfield B, Katz DA, Cantrell CJ, Bogard PJ. A benign cystic teratoma with gastrointestinal tract development. *Am J Clin Pathol.* 1985;83(2):236-40.
110. Agaimy A, Lindner M, Wuensch PH. Interstitial cells of Cajal (ICC) in mature cystic teratoma of the ovary. *Histopathology.* 2006;48(2):208-9.
111. Agaimy A, Wunsch PH. Coexistence of interstitial cell of Cajal hyperplasia and microcarcinoidosis in a mature cystic teratoma of the ovary. *Histopathology.* 2008;52(2):260-2.
112. Ishida M, Iwai M, Yoshida K, Kagotani A, Okabe H. Well-differentiated cerebellum within a mature cystic teratoma of the ovary. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(3):1255-7.
113. Dominguez-Rosado I, Michel J, Ortiz-Hidalgo C. Ovarian mature cystic teratoma exhibiting well-differentiated cerebellum in a 14-year-old female. *Pediatr Dev Pathol.* 2005;8(2):247-9.
114. Godinho AB, Martins D, Araujo C, Melo MA, Mendes Graca L. [Twin pregnancy with a complete hydatiform mole and a viable co-twin]. *Acta medica portuguesa.* 2014;27(1):135-7.
115. Nogales FF, Prat J, Schuldt M, Cruz-Viruel N, Kaur B, D'Angelo E, et al. Germ cell tumour growth patterns originating from clear cell carcinomas of the ovary and endometrium: a comparative immunohistochemical study favouring their origin from somatic stem cells. *Histopathology.* 2018;72(4):634-47.
116. Shanmugaratnam K, Kunaratnam N, Chia KB, Chiang GS, Sinniah R. Teratoid carcinosarcoma of the paranasal sinuses. *Pathology.* 1983;15(4):413-9.

117. Kinjo T, Taniguchi H, Kushima R, Sekine S, Oda I, Saka M, et al. Histologic and immunohistochemical analyses of alpha-fetoprotein--producing cancer of the stomach. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(1):56-65.
118. Preda O, Dema A, Iacob M, Goyenaga P, Dulcey I, Aneiros Fernandez J, et al. Urothelial carcinoma of the renal pelvis with simultaneous trophoblastic and malignant clear cell endodermal-type differentiation. *Virchows Arch.* 2012;460(3):353-6.
119. Qu Y, Yang Q, Liu J, Shi B, Ji M, Li G, et al. c-Myc is Required for BRAFV600E-Induced Epigenetic Silencing by H3K27me3 in Tumorigenesis. *Theranostics.* 2017;7(7):2092-107.
120. Choi J, Clement K, Huebner AJ, Webster J, Rose CM, Brumbaugh J, et al. DUSP9 Modulates DNA Hypomethylation in Female Mouse Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2017;20(5):706-19 e7.
121. Hsu CM, Lin PM, Lin HC, Lai CC, Yang CH, Lin SF, et al. Altered Expression of Imprinted Genes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer research.* 2016;36(5):2251-8.
122. Mishima C, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, et al. Loss of imprinting of IGF2 in fibroadenomas and phyllodes tumors of the breast. *Oncol Rep.* 2016;35(3):1511-8.
123. Pan Y, He B, Chen J, Sun H, Deng Q, Wang F, et al. Gene therapy for colorectal cancer by adenovirus-mediated siRNA targeting CD147 based on loss of the IGF2 imprinting system. *International journal of oncology.* 2015;47(5):1881-9.
124. Schuldt M, Rubio A, Preda O, Nogales FF. GATA3 expression is present in primitive patterns of Yolk Sac Tumors but is not expressed by differentiated variants. *Histopathology.* 2015.
125. Nogales FF, Bergeron C, Carvia RE, Alvaro T, Fulwood HR. Ovarian endometrioid tumors with yolk sac tumor component, an unusual form of ovarian neoplasm. Analysis of six cases. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(9):1056-66.
126. Damato S, Haldar K, McCluggage WG. Primary Endometrial Yolk Sac Tumor With Endodermal-Intestinal Differentiation Masquerading as Metastatic Colorectal Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2015.
127. Lankerani MR, Aubrey RW, Reid JD. Endometriosis of the colon with mixed "germ cell" tumor. *Am J Clin Pathol.* 1982;78(4):555-9.
128. McNamee T, Damato S, McCluggage WG. Yolk sac tumours of the female genital tract in older adults derive commonly from somatic epithelial neoplasms: somatically derived yolk sac tumours. *Histopathology.* 2016;69(5):739-51.
129. Rutgers JL, Young RH, Scully RE. Ovarian yolk sac tumor arising from an endometrioid carcinoma. *Hum Pathol.* 1987;18(12):1296-9.
130. Garcia-Galvis OF, Cabrera-Ozoria C, Fernandez JA, Stolnicu S, Nogales FF. Malignant Mullerian mixed tumor of the ovary associated with yolk sac tumor, neuroepithelial and trophoblastic differentiation (teratoid carcinosarcoma). *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27(4):515-20.
131. Varia M, McCluggage WG, Oommen R. High grade serous carcinoma of the ovary with a yolk sac tumour component in a postmenopausal woman: report of an extremely rare phenomenon. *J Clin Pathol.* 2012;65(9):853-4.
132. Lopez JM, Malpica A, Deavers MT, Ayala AG. Ovarian yolk sac tumor associated with endometrioid carcinoma and mucinous cystadenoma of the ovary. *Ann Diagn Pathol.* 2003;7(5):300-5.
133. Praxis Strategy Group Analysis of U.S. Census Population Projections, Released 2008 [Internet].
134. Liu WB, Wu JF, Du Y, Cao GW. Cancer Evolution-Development: experience of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *Current oncology.* 2016;23(1):e49-56.
135. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol.* 2007;211(3):261-8.

136. Kim HT, Choi BH, Niikawa N, Lee TS, Chang SI. Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF-II genes in ovarian tumors. *Am J Med Genet.* 1998;80(4):391-5.
137. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature.* 2007;447(7143):433-40.
138. Chojamts B, Jimi S, Kondo T, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, et al. CD133+ cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Mullerian tumor). *Stem Cells.* 2011;29(10):1485-95.
139. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4299-311.
140. Mizuno T, Suzuki N, Makino H, Furui T, Morii E, Aoki H, et al. Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species. *Gynecol Oncol.* 2015;137(2):299-305.
141. Gotte M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kelsch R, Schuring AN, et al. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2008;215(3):317-29.
142. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, Vrtacnik-Bokal E, Novakovic S, Rulicke T, et al. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev.* 2009;18(1):137-49.
143. Zhang S, Mercado-Uribe I, Xing Z, Sun B, Kuang J, Liu J. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene.* 2014;33(1):116-28.
144. Nogales FF, Dulcey I. The secondary human yolk sac has an immunophenotype indicative of both hepatic and intestinal differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012;56(9):755-60.
145. Clement PB, Young RH, Scully RE. Endometrioid-like variant of ovarian yolk sac tumor. A clinicopathological analysis of eight cases. *Am J Surg Pathol.* 1987;11(10):767-78.
146. Ramalingam P, Malpica A, Silva EG, Gershenson DM, Liu JL, Deavers MT. The use of cytokeratin 7 and EMA in differentiating ovarian yolk sac tumors from endometrioid and clear cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(11):1499-505.
147. Okoye EI, Bruegl AS, Fellman B, Luthra R, Broaddus RR. Defective DNA Mismatch Repair Influences Expression of Endometrial Carcinoma Biomarkers. *Int J Gynecol Pathol.* 2016;35(1):8-15.
148. Mahdi Z, Abdulfatah E, Pardeshi V, Hassan O, Schultz D, Morris R, et al. The Impact of Androgen Receptor Expression on Endometrial Carcinoma Recurrence and Survival. *Int J Gynecol Pathol.* 2017.
149. Nonaka D, Chiriboga L, Soslow RA. Expression of pax8 as a useful marker in distinguishing ovarian carcinomas from mammary carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(10):1566-71.
150. Nogales FF, Dulcey I, Preda O. Germ cell tumors of the ovary: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(3):351-62.
151. Offman SL, Longacre TA. Clear Cell Carcinoma of the Female Genital Tract (Not Everything Is as Clear as it Seems). *Advances in Anatomic Pathology.* 2012;19(5):296-312.
152. Yu XJ, Zhang L, Liu ZP, Shi YQ, Liu YX. Ovarian malignant mixed germ cell tumor with clear cell carcinoma in a postmenopausal woman. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):8996-9001.

153. Ansah-Boateng Y, Wells M, Poole DR. Coexistent immature teratoma of the uterus and endometrial adenocarcinoma complicated by gliomatosis peritonei. *Gynecol Oncol.* 1985;21(1):106-10.
154. Preda ONF. Diagnosis Immunopathology of Germ Cell Tumors. In: FF N, editor. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors.* Germany: Springer; 2017. p. 131-63.
155. Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Coomans C, Durr J, et al. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(38):26968-77.
156. Veugelers M, De Cat B, Delande N, Esselens C, Bonk I, Vermeesch J, et al. A 4-Mb BAC/PAC contig and complete genomic structure of the GPC5/GPC6 gene cluster on chromosome 13q32. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2001;20(5-6):375-85.
157. Preda O, Nicolae A, Aneiros-Fernandez J, Borda A, Nogales FF. Glypican 3 is a sensitive, but not a specific, marker for the diagnosis of yolk sac tumours. *Histopathology.* 2011;58(2):312-4; author reply 4-5.
158. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(1):13-22.
159. Nogales FF, Quinonez E, Lopez-Marin L, Dulcey I, Preda O. A diagnostic immunohistochemical panel for yolk sac (primitive endodermal) tumours based on an immunohistochemical comparison with the human yolk sac. *Histopathology.* 2014;65(1):51-9.
160. Chiarelli S, Buritica C, Litta P, Ciani S, Guarch R, Nogales FF. An immunohistochemical study of morules in endometrioid lesions of the female genital tract: CD10 is a characteristic marker of morular metaplasia. *Clin Cancer Res.* 2006;12(14 Pt 1):4251-6.
161. Houghton O, Connolly LE, McCluggage WG. Morules in endometrioid proliferations of the uterus and ovary consistently express the intestinal transcription factor CDX2. *Histopathology.* 2008;53(2):156-65.
162. Iwamoto M, Nakatani Y, Fugo K, Kishimoto T, Kiyokawa T. Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. *Hum Pathol.* 2015;46(7):957-62.
163. Wang J, Li Q, Cheng X, Xiong K, Qi Q, Huang W. [Diagnostic value of combined detection of HNF-1beta and Napsin A in the diagnosis of ovarian clear cell carcinoma]. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology.* 2015;44(12):874-8.
164. Preda O, Dulcey I, Nogales FF. Papel de los nuevos marcadores inmunohistoquímicos en los tumores de células germinales malignos gonadales *Rev Esp Patol.* 2012;45(4):195-203.
165. Rutgers. 1987.
166. Higuchi Y, Kouno T, Teshima H, Akizuki S, Kikuta M, Ohyumi M, et al. Serous papillary cystadenocarcinoma associated with alpha-fetoprotein production. *Arch Pathol Lab Med.* 1984;108(9):710-2.
167. Teilum G. Endodermal sinus tumors of the ovary and testis. Comparative morphogenesis of the so-called mesoepithelioma ovarii (Schiller) and extraembryonic (yolk sac-allantoic) structures of the rat's placenta. *Cancer.* 1959;12:1092-105.
168. Meguro S, Yasuda M. alpha-Fetoprotein-producing ovarian tumor in a postmenopausal woman with germ cell differentiation. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(1):140-4.
169. Marina NM, Cushing B, Giller R, Cohen L, Lauer SJ, Ablin A, et al. Complete surgical excision is effective treatment for children with immature teratomas with or without malignant elements: A Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2137-43.

170. Heifetz SA, Cushing B, Giller R, Shuster JJ, Stolar CJ, Vinocur CD, et al. Immature teratomas in children: pathologic considerations: a report from the combined Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(9):1115-24.
171. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457-63.
172. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Baba T, Horiuchi A, et al. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(12):1842-8.
173. Oosterhuis JW, Looijenga L. Germ cell tumors from a developmental perspective: cells of origin, pathogenesis and molecular biology; emerging patterns In: Nogales FF, Jimenez RE, editors. *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors.* 1st ed. Heidelberg and New York: Springer; 2017.
174. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010;24(20):2239-63.
175. Liu H, Shi J, Wilkerson ML, Lin F. Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *American journal of clinical pathology.* 2012;138(1):57-64.
176. Prat JC, D. Carinelli, S.G. Nogales FF, Vang R, Zaloudek CJ. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH, WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. p. 57-62.
177. Yang Z, Tang LH, Klimstra DS. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *The American journal of surgical pathology.* 2011;35(6):853-60.
178. Debacker C, Catala M, Labastie MC. Embryonic expression of the human GATA-3 gene. *Mech Dev.* 1999;85(1-2):183-7.
179. Thomas J, Adegboyega P, Iloabachie K, Mooring JW, Lian T. Sinonasal teratocarcinosarcoma with yolk sac elements: a neoplasm of somatic or germ cell origin? *Ann Diagn Pathol.* 2011;15(2):135-9.
180. McNamee T, Damato S, McCluggage WG. Yolk sac tumours of the female genital tract in older adults derive commonly from somatic epithelial neoplasms: somatically derived yolk sac tumours. *Histopathology.* 2016.
181. Retamero JA, Schuldt M, F. NF. Yolk Sac Tumors in Postmenopausal Patients Arising in Endometrioid Adenocarcinoma. *AJSP: Reviews & Reports.* 2016;21(4):189-94.
182. Roth LM, Talerman A, Levy T, Sukmanov O, Czernobilsky B. Ovarian Yolk Sac Tumors in Older Women Arising From Epithelial Ovarian Tumors or With No Detectable Epithelial Component. *International Journal of Gynecological Pathology.* 2011;30(5):442-51.
183. Fadare O, Zhao C, Khabele D, Parkash V, Quick CM, Gwin K, et al. Comparative analysis of Napsin A, alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, P504S), and hepatocyte nuclear factor 1 beta as diagnostic markers of ovarian clear cell carcinoma: an immunohistochemical study of 279 ovarian tumours. *Pathology.* 2015;47(2):105-11.
184. Garcia-Galvis OF, Cabrera-Ozoria C, Fernandez JA, Stolnicu S, Nogales FF. Malignant mullerian mixed tumor of the ovary associated with yolk sac tumor, neuroepithelial and trophoblastic differentiation (teratoid carcinosarcoma). *International Journal of Gynecological Pathology.* 2008;27(4):515-20.
185. Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol.* 2012;124(1):164-9.
186. Esheba GE, Pate LL, Longacre TA. Oncofetal protein glypican-3 distinguishes yolk sac tumor from clear cell carcinoma of the ovary. *American Journal of Surgical Pathology.* 2008;32(4):600-7.

187. Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Aburatani H, Nakagawa S, Yano T, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Modern Pathology*. 2009;22(6):824-32.
188. Ballotta MR, Bianchini E, Borghi L, Fortini RM. Clear cell carcinoma simulating the "endometrioid-like variant" of yolk sac tumor. *Pathologica*. 1995;87(1):87-90.
189. Cetin A, Bahat Z, Cilesiz P, Demirbag N, Yavuz E. Ovarian clear cell adenocarcinoma producing alpha-fetoprotein: case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28(3):241-4.
190. El-Bahrawy M. Alpha-fetoprotein-producing non-germ cell tumours of the female genital tract. *European Journal of Cancer*. 2010;46(8):1317-22.
191. Meguro S, Yasuda M. alpha-Fetoprotein-producing ovarian tumor in a postmenopausal woman with germ cell differentiation. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2013;17(1):140-4.
192. Espinosa I, Gallardo A, D'Angelo E, Mozos A, Lerma E, Prat J. Simultaneous carcinomas of the breast and ovary: utility of Pax-8, WT-1, and GATA3 for distinguishing independent primary tumors from metastases. *Int J Gynecol Pathol*. 2015;34(3):257-65.
193. Cao D, Guo S, Allan RW, Molberg KH, Peng Y. SALL4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguishing yolk sac tumor from clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(6):894-904.
194. Iwanaga S, Shimada A, Hasuo Y, Yoh S, Miyajima S, Nishimura H, et al. Immature teratoma of the uterine fundus. *Kurume Med J*. 1993;40(3):153-8.
195. Niu Z, Hu Y, Chu Z, Yu M, Bai Y, Wang L, et al. Germ-like cell differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Cell Biochem Funct*. 2013;31(1):12-9.
196. Niu N, Mercado-Uribe I, Liu J. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. 2017.
197. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
198. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009;136(3):411-9.
199. Ngan KW, Jung SM, Lee LY, Chuang WY, Yeh CJ, Hsieh YY. Immunohistochemical expression of OCT4 in primary central nervous system germ cell tumours. *J Clin Neurosci*. 2008;15(2):149-52.
200. Oosterhuis JW, Stoop JA, Rijlaarsdam MA, Biermann K, Smit VT, Hersmus R, et al. Pediatric germ cell tumors presenting beyond childhood? *Andrology*. 2015;3(1):70-7.
201. Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):416-30.
202. Ulbright TMea. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
203. Gonzalez-Crussi F. Extragenital teratomas. Washington, DC Armed Forces Institute of Pathology; 1982.
204. Dehner LP. Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Hum Pathol*. 1983;14(6):493-511.
205. Isaacs H, Jr. Perinatal (fetal and neonatal) germ cell tumors. *J Pediatr Surg*. 2004;39(7):1003-13.
206. Schneider DT, Calaminus G, Koch S, Teske C, Schmidt P, Haas RJ, et al. Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42(2):169-75.
207. McKenney JK, Heerema-McKenney A, Rouse RV. Extragenital germ cell tumors: a review with emphasis on pathologic features, clinical prognostic variables, and differential diagnostic considerations. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(2):69-92.

208. De Backer A, Madern GC, Pieters R, Haentjens P, Hakvoort-Cammel FG, Oosterhuis JW, et al. Influence of tumor site and histology on long-term survival in 193 children with extracranial germ cell tumors. *Eur J Pediatr Surg.* 2008;18(1):1-6.
209. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle.* 2009;8(23):3822-30.
210. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):268-77.
211. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med.* 2013;19(8):998-1004.