

Trabajo de Fin de Grado

Las células de Leydig del ovario

Autores:

Adorsinda López Rodríguez

Francisco José Peraza González

Directores:

Profesor José Luis Carrasco Juan¹

Doctor Abián Vega Falcón²

Área de Conocimiento de Histología¹

Dpto. de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Ciencias de la Salud.

Sección de Medicina. Universidad de La Laguna

Servicio de Anatomía Patológica del CHUC²

RESUMEN:

Hemos llevado a cabo un estudio morfométrico de imágenes microscópicas que han sido adquiridas en preparaciones histológicas de estructuras gonadales humanas, fundamentalmente ovarios y trompas de Falopio. Las muestras fueron obtenidas y usadas en su momento para fines clínicos, y durante todo el presente estudio se ha mantenido un estricto anonimato de los pacientes.

Hemos concentrado el estudio en el aprendizaje y uso de un programa de tratamiento de imágenes para poder valorar las dimensiones de las células de Leydig del ovario y las de los acúmulos que generan. Con ello pretendemos determinar el valor aproximado que define a la hiperplasia de células de Leydig frente al que define un estado de normalidad.

ABSTRACT:

We have carried out a morphometric study of microscopic images that have been acquired in histological preparations of human gonadal structures, fundamentally ovaries and fallopian tubes. The samples were obtained and used at the time for clinical purposes, and throughout the present study strict patient anonymity has been maintained.

We have concentrated the study on the learning and use of an image treatment program to be able to assess the dimensions of the Leydig cells of the ovary and those of the accumulations that they generate. With this we intend to determine the approximate value that defines the hyperplasia of Leydig cells versus that which defines a state of normality.

ÍNDICE

Introducción	01
Aspectos históricos de las células de Leydig (CL)	01
Las CL en el hombre	01
Las CL en la mujer	02
Histogénesis de las CL	02
Alteraciones de las células de Leydig ováricas - CLO -	03
Objetivos	06
Material y métodos	07
Resultados	09
Discusión	13
Conclusiones	15
Bibliografía	16

INTRODUCCIÓN

Aspectos históricos de las células de Leydig (CL)

En 1850, Franz Leydig [von Leydig, 1850], anatomista alemán, descubre estas células. En un principio se les achacó únicamente una función estructural, como células del tejido conjuntivo (de ahí el nombre de célula intersticial de Leydig), pero años más tarde se descubrieron otras funciones. Así, en 1854 Albert Kölliker las describe como unas células que pueden ser observadas entre los túbulos seminíferos, a veces solas, pero también en grupos numerosos formando nidos. En el interior de estas células se podían encontrar vesículas llenas de contenido graso, abundante pigmento marrónáceo, y aunque no siempre, unas inclusiones que fueron denominadas cristales o cristaloides de Reinke [Reinke, 1896].

Las CL en el hombre

A comienzos del siglo XX se propuso que las CL tenían como función el recoger nutrientes de la circulación para apoyar la producción de esperma en los túbulos seminíferos, y que los cristales de Reinke eran una forma de almacenamiento de ese material. Se puso de manifiesto también que las gotas lipídicas de las CL eran el sustrato del que procedían las hormonas que se sintetizaban en el testículo, y se habló del papel de estas células en la diferenciación del sexo masculino.

Durante los años posteriores se sucedieron una serie de teorías que apoyaban y otras que desmentían esta creencia. En 1931 se descubrió que la principal hormona sexual masculina pertenecía a los esteroides y en 1935 se confirmó que su forma más abundante era la testosterona. En los años 60 del siglo pasado ya se pudieron medir productos químicos en la sangre y en el testículo, y se obtuvieron evidencias bioquímicas directas tanto de que la testosterona era producida por esta glándula como de que era sintetizada por las CL.

Años más tarde se comprueba que la testosterona es la que promueve el desarrollo de los conductos de Wolff y de los genitales externos, el descenso testicular y el desarrollo de patrones cerebrales sexo-específicos, iniciándose así la masculinización fetal antes de que se establezca el eje de señalización hipotálamo-hipofisario-gonadal [para una revisión completa ver Svidgen y Koopman, 2013].

Las CL en la mujer

Los ovarios tienen unas células que están localizadas preferentemente en sus hilios, que se corresponden morfológicamente con las CL testiculares y que producen andrógenos [para una revisión ver Carrasco-Juan y cols., 2017]. Estas células fueron observadas a comienzos del siglo pasado, y poco más tarde fueron relacionadas con las células paraganglionares y con las células cromafines. Años después Berger apreció que estas células eran muy parecidas a las CL testiculares y que estaban asiduamente relacionadas con las fibras nerviosas amielínicas del ovario, y por ello las llamó “células simpaticotrópicas” [Berger, 1922, 1924]. Algo más tarde Köhn apoyó estas observaciones, y utilizó para referirse a ellas términos como “células intersticiales extraglandulares” o “células de Leydig extraglandulares” [Kohn, 1928], aunque otros prefirieron denominarlas “células hiliares”.

Una candente y prolongada controversia se despertó por entonces entre unos y otros. Así por ejemplo Sternberg [Sternberg, 1949] expresó (literalmente), *"me referiré a estas células como las células del hilio ovárico. Afortunadamente, ninguno de los otros numerosos tipos de células que residen en el hilio ovárico han sido así designados. El término adolece, por supuesto, de una falta de especificidad, pero tal vez ello pueda representar una ventaja en la actualidad"*. De esta elegante forma quiso permanecer al margen de la contienda, pero ha sido precisamente esta denominación la que se ha perpetuado hasta nuestros días. No obstante otro término ha sido propuesto recientemente para sustituirla, el de “células de Leydig ováricas” (CLO) [Carrasco-Juan y cols., 2017].

Histogénesis de las CL

Con respecto al origen de estas células, tanto en el testículo como en el ovario, y a pesar de los considerables esfuerzos que se han llevado a cabo, continúa siendo desconocido y objeto de un importante debate. En el testículo se han propuesto las siguientes fuentes: el primordio adreno-gonadal, el mesonefros vecino, el epitelio celómico, las células perivasculares, la región fronteriza mesonéfrico-gonadal y a partir de células migratorias procedentes de la cresta neural [Svidgen y Koopman, 2013; Wen y cols., 2016].

También en el ovario la identidad de la fuente que genera a estas células (tanto durante la vida fetal como en las mujeres adultas) fue y sigue siendo un tema sujeto a intensa controversia. A las ya conocidas tendencias a considerarlas como células paraganglionares, como parte del sistema cromafín o como células simpaticotrópicas, se suman las opiniones de que son células de Schwann/elementos mesenquimatosos intraneurales, células estromales ová-

ricas luteinizadas o células que proceden de los fibroblastos perineurales [Robboy y cols., 2002], entre otras hipótesis propuestas. Más recientemente se ha propuesto que su posible origen se encuentra en células migratorias intraneurales que proceden de un hipotético reservorio de la cresta neural, concretamente el que está integrado por los ganglios del plexo celíaco [Carrasco-Juan y cols., 2017].

Alteraciones de las células de Leydig ováricas - CLO -

En los estudios histopatológicos de rutina del ovario, las CLO suelen pasar desapercibidas, y solamente se las menciona cuando existe una patología en ellas (de tipo hiperplasia o tumores). Sin embargo, Sternberg ya adelantó que era muy frecuente observar a estas células en los ovarios, y propuso que podía ocurrir hasta en el 80% de ellos [Sternberg, 1949]. Recientemente se ha demostrado que, bajo unas condiciones adecuadas de estudio, la presencia de estas células llega a alcanzar el 100% de los casos estudiados [Carrasco-Juan y cols., 2017].

Por otra parte, cuando un patólogo estudia un ovario al microscopio, normalmente su observación se encuentra sesgada por la búsqueda, la identificación y el diagnóstico de la patología sospechada por la clínica y las pruebas complementarias. Así, muchas de las anexectomías que son realizadas se llevan a cabo juntamente con histerectomías que han sido indicadas por la existencia de una hiperplasia endometrial, por un carcinoma de endometrio o por otro tipo de lesión tumoral. En muchos de los casos, por lo tanto, el estudio macroscópico y microscópico de los ovarios está orientado a la identificación de la existencia o ausencia de una extensión del proceso neoplásico endometrial, para así aportar en el diagnóstico el correcto estadiaje anatomopatológico (pTNM), estadiaje que conlleva una determinada actitud terapéutica, un seguimiento y un pronóstico cada vez más concretos.

Estas circunstancias, a las que se suma una elevada presión asistencial, no le permiten al patólogo llevar a cabo un estudio profundo de unas estructuras ováricas que prácticamente siempre aportan sorpresas cuando son observadas con la adecuada intensidad al microscopio. Pero a pesar de ello hace algunos años dos patólogos, mientras se encontraban observando al microscopio estructuras ováricas que habían sido extirpadas por las indicaciones clínicas descritas, cayeron en la cuenta de que con mucha frecuencia podían apreciar, sin esfuerzo, la presencia de nidos, racimos y grupos de CLO, y en una cantidad bastante superior a la existente en otros ovarios extirpados y estudiados por otras razones. Además, este incremento de CLO solía coincidir con la existencia de una hiperplasia del estroma cortical del ovario.

Las alteraciones de las CLO, aunque existe bien poco descrito sobre ellas en los libros de texto y en la bibliografía, las podemos clasificar en:

- Anomalías del desarrollo: ectopias o heterotopias.
- Hiperplasia de CLO (HCLO): nodulares y/o difusas.
- Tumores de CLO: que se encuadran dentro de los tumores no epiteliales del ovario.

La HCLO, ya sea nodular y/o difusa, hiliar y/o estromal, es una entidad muy difícil de delimitar por muy diferentes circunstancias.

En primer lugar, porque realmente se desconoce cuál es la cifra normal de las CLO en estados no patológicos. No existen estudios llevado a cabo a tal efecto, porque serían enormemente dificultosos y muy caros, y porque el objetivo perseguido no justificaría los gastos motivados por ellos.

Pero la determinación del número normal de CLO se complica aún más por otro hecho, y es que recientes estudios demuestran que estas células también pueden estar normalmente localizadas fuera del ovario, esto es, en el estroma de las trompas de Falopio, en el mesoovario, en el mesosálpinx, y en general, en cualquier punto que esté localizado a lo largo del recorrido del conducto mesonéfrico [Carrasco-Juan y cols., 2018].

En tercer lugar, a todo ello se suma la variación normal en la cantidad de CLO que existe dependiendo de la edad y del estado hormonal de las mujeres estudiadas.

Finalmente, y hablando en términos puramente morfológicos, la cuantificación se complica aún más debido a que los nidos de estas células suelen estar ampliamente separados espacialmente, y de uno en uno no pueden valorarse adecuadamente si no es a través de un exhaustivo muestreo mediante secciones consecutivas, y ello efectuado en ambos ovarios y en las regiones afines.

Si hablamos de hiperplasia, se define en general como el aumento anormal de tamaño que sufre un órgano, o un tejido orgánico, debido al incremento del número de células normales que lo componen. Estas células poseen un aspecto normal al microscopio, y la hiperplasia puede o no evolucionar hacia un cáncer.

En lo que a nosotros concierne, y de una forma bastante vaga e imprecisa por todo lo descrito hasta ahora, se hablaría de HCLO cuando existe un aumento del número normal de estas células, pero ese número normal de CL es precisamente el que nadie conoce hasta la fecha. Es más, la HCLO no se traduce obligatoriamente en un incremento de las dimensiones ni del peso de los ovarios, existiendo casos en la literatura de HCLO con la existencia de nódulos que tienen tan sólo 0,2 cm de diámetro [Tenczar, 1955].

La proliferación de las células hiliares puede ocurrir fisiológicamente como resultado de unos niveles elevados de hCG o LH (como durante el embarazo y después de la menopausia), o por razones desconocidas. En cualquier caso, las CLO producen andrógenos, por lo que la hiperplasia y los tumores de estas células se asocian normalmente con manifestaciones androgénicas (amenorrea, hirsutismo, atrofia mamaria, hipertrofia del clítoris, calvicie, etc.), y ocasionalmente con manifestaciones estrogénicas (precocidad sexual, menometrorragia, hiperplasia endometrial y carcinoma endometrial).

Histológicamente hablando, las hiperplasias descritas tienen una disposición nodular, o menos frecuentemente difusa, y se acompañan de otros signos imprecisos como son el aumento del tamaño celular, la existencia de mitosis, pleomorfismo celular-nuclear, hiper cromasia y multinucleación, y los cristales de Reinke pueden o no ser evidentes. La hiperplasia de CL hiliares puede estar asociada con otras lesiones ováricas, incluyendo una hiperplasia del estroma cortical (según los criterios de Boss) [Boss y cols., 1965], hipertecosis estromal, quistes de la rete ovarii, neoplasias de células hiliares, y menos frecuentemente, con tumores ováricos.

Por último, la distinción desde un punto de vista histopatológico entre un nódulo hiperplásico grande de células hiliares y un tumor de células hiliares es también bastante arbitraria, siendo una práctica más o menos extendida el diagnosticar una neoplasia cuando el nódulo tiene ya un tamaño que es igual o superior a 1 cm de diámetro [Kurman y cols., 2011].

OBJETIVOS

La valoración morfológica de la hiperplasia de CL con preparaciones histológicas sólo se ha efectuado en una ocasión hasta el año 2017, en lengua castellana y de una forma bastante arbitraria [Alemán y cols., 2017]. En este año 2019 ha sido publicado al respecto otro trabajo [Reijnen y cols., 2019], que está escrito en inglés y que ignora la existencia del anterior.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, nosotros hemos planificado efectuar una revisión retrospectiva de estructuras anexiales (ovarios y trompas de Falopio) que fueron extirpadas por diferentes indicaciones clínicas, con los siguientes objetivos:

- 1.- Aprender a identificar a las CLO y a entender los conceptos básicos de las técnicas de tinción histológica.
- 2.- Aprender a usar un programa informático específico para el estudio y el tratamiento digital de las imágenes histológicas.
- 3.- Efectuar valoraciones morfométricas sobre las CL y los acúmulos de CL.
- 4.- Intentar establecer cuál es el límite más aproximado entre lo que es una cifra normal de CLO y lo que debe ser ya considerado como una HCLO.
- 5.- Efectuar valoraciones cuantitativas sobre la frecuencia de la HCLO.
- 6.- Intentar correlacionar la HCLO, ya sea nodular y/o difusa, de células hiliares y/o estromales, con otras patologías ginecológicas, y concretamente con la hiperplasia del estroma cortical del ovario (HEO), con la hiperplasia endometrial y con el adenocarcinoma endometriode de endometrio (AEE), fundamentalmente.
- 7.- Finalmente, iniciar la aplicación de la misma metodología del trabajo en muestras procedentes de testículos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado para este estudio las muestras de pacientes que fueron sometidos a intervenciones quirúrgicas de anexectomía y de orquiectomía, que están almacenadas en los archivos de Anatomía Patológica del Complejo Hospital Universitario de Canarias (CHUC) y del Laboratorio González Santiago (LGS). La mayoría de estas muestras ya fueron utilizadas en un trabajo de fin de grado que fue efectuado hace dos años [Alemán y cols., 2017].

Las patologías que indicaron los estudios, y sus códigos SNOMED de búsqueda, fueron:

- Códigos de histerectomía total con anexectomía (T-82920), de ooforectomía (T-87800) y de salpinguectomía (T-86800), combinados con los siguientes códigos:
 - Hiperplasia endometrial simple y compleja (adenomatosa):
 - Sin atipias (M-72420).
 - Con atipias (M-72425).
 - Carcinoma endometriode de endometrio (M-83803).
 - Adenocarcinoma (M-81403).
 - Otros.
- Código de orquiectomía (T-78000), combinado con el código:
 - Carcinoma testicular (M-80103).
 - Otros.

El trabajo realizado ha seguido los principios acordados en la Declaración de Helsinki, y ha recibido la aprobación del correspondiente Comité de Ética (CEIBA2018-0289).

En los casos encontrados se ha efectuado una revisión de las preparaciones histológicas que eran representativas y que se encontraban en buen estado para ser escaneadas.

De esta forma, se han seleccionado 24 casos con preparaciones de estructuras anexiales (ovarios y trompas de Falopio) y 1 caso con preparaciones de testículo, con el propósito de identificar a las CLO y a las CL testiculares extraparenquimatosas, y comprobar si estas células mostraban alguna alteración como la hiperplasia, de tipo nodular fundamentalmente. Las indicaciones de los estudios están recopiladas en la Tabla 1.

Las preparaciones revisadas estaban teñidas con Hematoxilina-Eosina, y en algunos casos también con Tricrómico de Masson.

Las preparaciones histológicas de los 25 casos seleccionados han sido escaneadas con un scanner iScan Coreo de Ventana®. Las imágenes obtenidas han sido tratadas con el pro-

grama Ventana Image Viewer v.3.1.4. (©2012. Ventana Medical Systems, Inc.), y cuando fue necesario, retocadas con el programa Adobe Photoshop CS5 Extended.

Los hallazgos valorados en el estudio son:

- La presencia de nidos, acúmulos y regueros de CL, que puedan identificarse con el objetivo microscópico de menor aumento (4x).
- El número de acúmulos detectado en cada paciente.
- Las dimensiones de los acúmulos, incluyendo longitud y anchura (expresadas en mm o en μm) y medida del área (expresada en mm^2 y/o en μm^2).
- En cada uno de los acúmulos se ha identificado a cada célula de Leydig y se ha contabilizado el número total de las células que contiene.
- Cuando ha sido posible, por la calidad de la preparación, se han medido también las dimensiones y el área de las células de Leydig, individualmente, con el propósito de establecer sus valores standard. Al respecto, existen zonas donde las CL están agrupadas en un área, pero no integrando acúmulos compactos, siendo estas las condiciones preferidas para efectuar este tipo de mediciones.

En el trabajo realizado hace dos años, para considerar a un caso como positivo para HCLO se estableció como criterio la presencia de 3 o más acúmulos de CLO, con una superficie cada acúmulo igual o superior a la de un campo de gran aumento (objetivo LEICA N PLAN 40X/0'65 = cada campo de gran aumento tiene 0'5 mm de diámetro).

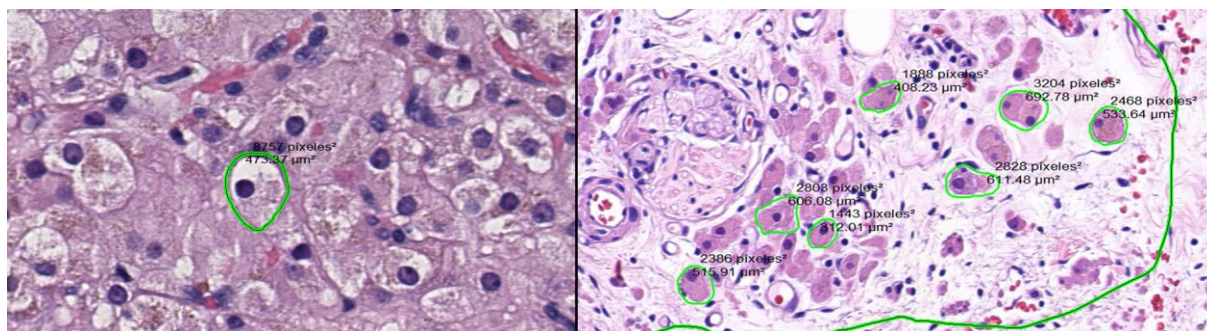
Como la superficie de la esfera es $A = \pi r^2 = \pi \times 0,25 \times 0,25 = 0,196 \text{ mm}^2$. Entonces tres, o más campos de gran aumento, equivalen a una superficie que es igual o superior a $0,589 \text{ mm}^2$ ($0,196 \times 3$).

En el estudio publicado este año en lengua inglesa se estimó la existencia de una hiperplasia de células de Leydig (hiliares) del ovario cuanto se identificaron un mínimo de 300 células (entre ambos ovarios) [Reijnen y cols., 2019].

RESULTADOS

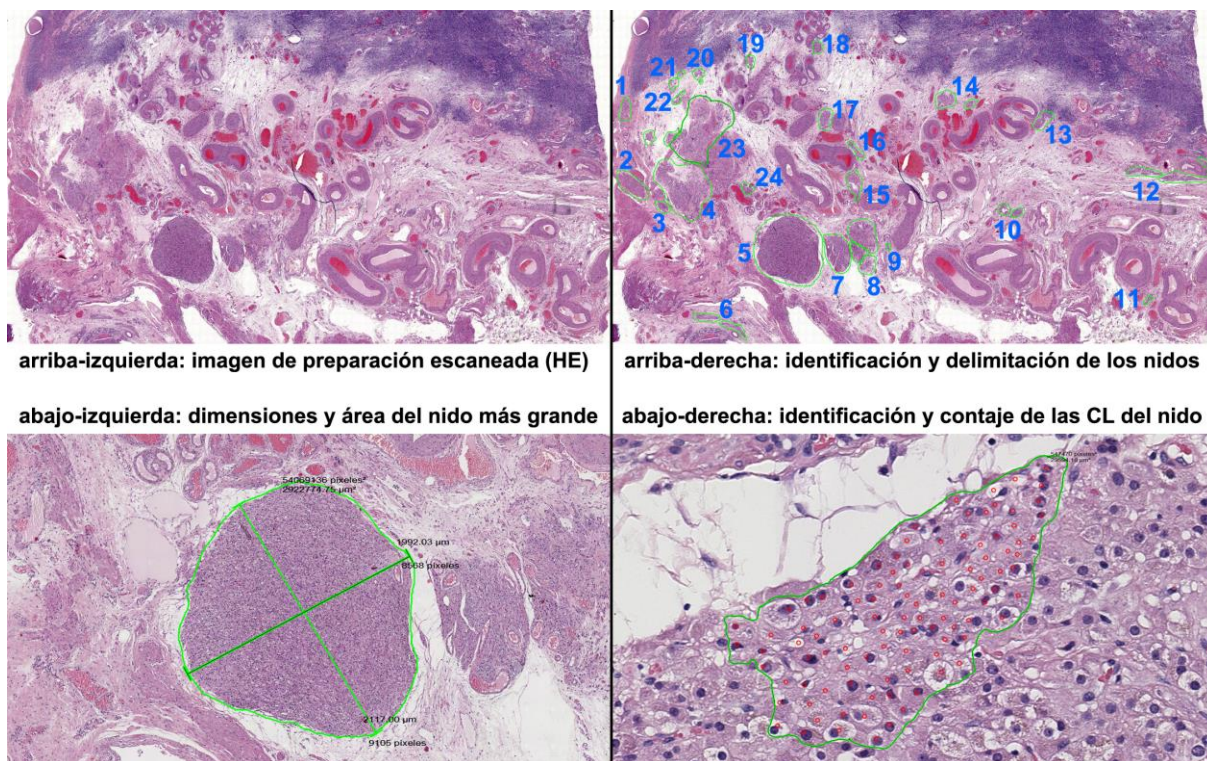
El software utilizado para el estudio es de fácil aprendizaje, por ser sencillo y muy intuitivo. Tras el escaneado de las preparaciones (que ha sido efectuado por el personal técnico del Servicio de Anatomía Patológica especializado en esta actividad, para así minimizar riesgos innecesarios sobre tan sofisticada máquina), se extrae la información de los casos hacia un disco duro externo.

Ya en el ordenador de trabajo hemos llevado a cabo la medida individual del área de 1.000 CL, básicamente de aquellas que se encontraban bien perfiladas en los nidos (figura 1, izquierda), o que se disponían individualmente en pequeños agrupamientos, sin contactos entre sus membranas (figura 1, derecha). Los valores de área máximo y mínimo obtenidos fueron $764 \mu\text{m}^2$ y $264,34 \mu\text{m}^2$, respectivamente, con un valor medio de $448,51 \mu\text{m}^2$ por célula.



quierda), o que se disponían individualmente en pequeños agrupamientos, sin contactos entre sus membranas (figura 1, derecha). Los valores de área máximo y mínimo obtenidos fueron $764 \mu\text{m}^2$ y $264,34 \mu\text{m}^2$, respectivamente, con un valor medio de $448,51 \mu\text{m}^2$ por célula.

Del mismo modo hemos analizado la presencia de acúmulos en las trompas de Falopio y en los ovarios en los 24 casos femeninos seleccionados, con la condición de que dichos acú-



mulos pudieran ser detectados al microscopio óptico usando el objetivo de menor aumento, o lupa (4x10=40 aumentos).

Una vez detectados se numeran y se resalta en color verde el perímetro de cada uno (figura 2). A continuación, se configura en el programa un contador para cada uno de los acúmulos, siendo preferible haciendo que coincida el número del acúmulo con el número del contador. Además, a cada contador se le asigna un color determinado, para evitar al máximo el que se cometan errores. Posteriormente de cada acúmulo se miden sus dos dimensiones y su correspondiente área, y se identifican todas las CL que lo componen. Todos estos datos quedan almacenados por el programa en la misma carpeta en la que están las imágenes escaneadas de cada caso, y ello también permite que se pueda completar el estudio en otro momento del día, o de otro día.

En conjunto, hemos identificado a 52.234 CL, siendo la cifra mayor por caso de 7.032 CL y la menor de 125 CL, con un promedio de 2.176,42 CL. Con los datos que han sido obtenidos del área de cada célula, si tres HPF tienen una superficie equivalente a 0,589 mm², o lo que es lo mismo 589.999 µm², dicha superficie da cabida entonces a un total de 1.313 CL. Por otra parte, si 300 CL fueran consideradas ya como una hiperplasia [Reijnen y cols., 2019], ello supondría una superficie de 134.553 µm², es decir, de menos de un campo de gran aumento (que tiene 196.000 µm²).

Por lo tanto, si consideramos que para que exista una HCLO tienen que cumplirse nuestras condiciones, es decir, que se identifiquen un mínimo de 1.313 CL, entonces los resultados

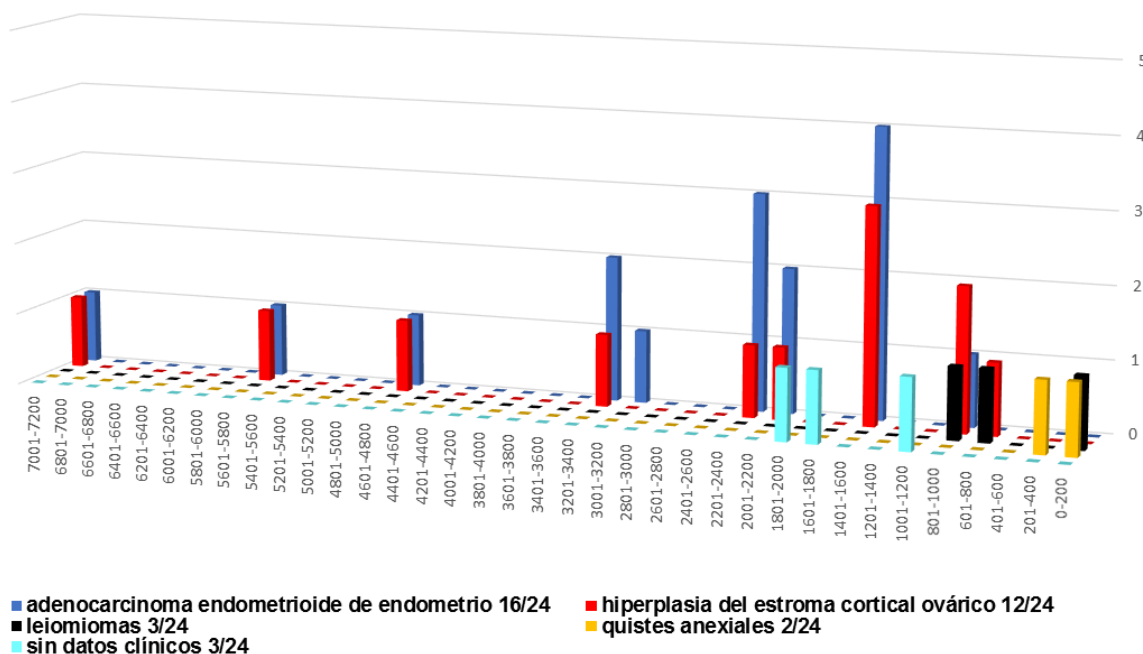
Distribución de casos por patologías y con sus cifras de CL

caso	HCL+AEE	HCL+AEE+HEO	HCL	AEE+HEO	HEO	quiste anejo	miomas	TT	sin datos	total CL
1		X								7032
2		X								2351
3		X								4745
4		X								5778
5	X									2217
6	X									2289
7	X									3117
8	X									2042
9				X						931
10		X								2125
11		X								3365
12		X								1485
13	X									1498
14						X				197
15					X		X			720
16	X									3385
17					X		X			883
18									X	1032
19			X						X	1886
20			X						X	1769
21						X				231
22							X			125
23		X								1453
24		X								1578
25								X		2179
total	6/24 25%	9/24 37,5%	2/24 8,3%	1/24 4,16%	2/24 8,3%	2/24 8,3%	3/24 12,5%	1/1 100%	3/24 12,5%	17/24 70,83%

que hemos obtenido son positivos para 17 de los 24 pacientes femeninos estudiados (70,83%), dudosos para 4 de 24 (16,67%) y negativos para 3 de 24 (12,5%). La distribución de los 24 casos, puestos en relación con la cifra de CL, con las patologías encontradas y con los datos clínicos de las pacientes, aparecen expuestos en la tabla 1 y en el gráfico 1.

De los 17 casos positivos, 15 tenían AEE (88,23%), y de ellos hasta 9 mostraban, además,

CIFRAS DE CÉLULAS DE LEYDIG RELACIONADAS CON LAS PATOLOGÍAS ENCONTRADAS



una HEO (52,94%). Pero también se aprecia que de los 16 casos con AEE, 15 mostraron HCL (93,75%), y que de los 12 casos con HEO, 9 mostraron HCL (75%).

De los 4 casos dudosos, 1 tenía AEE y HEO, y 2 tenían sólo HEO, en ambos casos con leiomiomas uterinos. Coincide que en todos ellos el estudio se efectuó sobre una, y no sobre las dos estructuras anexiales.

Entre los 3 casos negativos, dos presentaron los nidos en fimbrias o en el mesosálpinx de las trompas de Falopio, y fueron estudiados por leiomiomas uterinos, uno, y por un cistadenofibroma seroso de ovario, el otro. El tercer caso fue estudiado por un cistadenoma mucinoso de ovario derecho, y mostró dos pequeños nidos de CL en dicho ovario.

Tuvimos 3 casos con ausencia de cualquier dato clínico (12,5%), 1 de ellos dudoso, con 1.032 CL en el paroóforo izquierdo y 2 con HCL (1.769 CL y 1.886 CL), a expensas de nidos ubicados en las trompas de Falopio, no en los ovarios.

En el único caso estudiado de paciente masculino, que fue intervenido por un carcinoma tes-

ricular, identificamos a 2.179 CL extraparenquimatosas, en nidos que se encontraban localizados en la túnica albugínea y en el mediastino testicular.

DISCUSIÓN

Efectivamente, cuando estudiamos la literatura existente sobre las CLO, además de escasa, nos sorprende la existencia de trabajos que emplean el término hiperplasia de células de Leydig del ovario, o hiperplasia de células de Leydig hiliares, o hiperplasia de células de Leydig extraparenquimatosas, etc., pero que ninguno de estos trabajos se basa en una cifra específica de CLO que pueda justificar el empleo del término hiperplasia. En estos trabajos se habla vagamente de la existencia de un incremento del número de CLO, de la presencia de discretas variaciones de las características citológicas habituales en estas células, o incluso de la existencia en los pacientes de algunos síntomas y/o signos clínicos que pueden estar relacionados con un estado de hiperplasia.

Al respecto, hace dos años y en un trabajo de fin de grado, fue propuesta de una forma lógica, aunque realmente arbitraria, que la HCLO podía definirse con la detección o existencia de acúmulos de CLO que tuvieran en total unas dimensiones iguales o superiores a 3 HPF [Alemán y cols., 2017]. En el presente año, y en una revista de anatomía patológica que tiene un alto factor de impacto (3,125), ha sido publicado un trabajo que para definir la HCLO establece un límite de 300 CLO, entre ambos ovarios [Reijnen y cols., 2019]. Esta cifra supone una superficie que es inferior a la que le corresponde a 1 HPF.

Si esta cifra fuera correcta podemos afirmar, prácticamente sin ningún temor a equivocarnos, que todos los ovarios tienen una HCLO. Correctamente estudiados, el 100% de los ovarios exhiben estas células, eso sí, en variable cantidad [Carrasco-Juan y cols., 2017], pero esta cantidad casi siempre es suficiente como para ocupar una superficie igual o superior a la de 1 HPF. Pero, además, cuando uno se encuentra con un acúmulo de CLO nunca sabe si el corte histológico está representando el comienzo, la porción intermedia o la porción final de dicho acúmulo, y esa certeza únicamente se puede conseguir efectuando y observando multitud de cortes seriados (consecutivos). Este factor, curiosamente, tampoco ha sido tenido en cuenta en el trabajo que propone la cifra de 300 CLO.

Nosotros creemos que dicha cifra es muy inferior a la real, y que la cifra propuesta hace dos años sí se aproxima mucho más a la que es correcta. Si nos fijamos en el gráfico 1, la mayoría de las cantidades contabilizadas se encuentran concentradas por encima de las 1.400 CL, por lo que nosotros proponemos ese límite, las 1.400 CL, para definir a la HCLO.

La concentración de casos por encima de esta cifra adquiere su máximo significado cuando la relacionamos con la existencia de patologías claramente hormono dependientes, como

son el adenocarcinoma endometriode de endometrio de tipo I (AEE) y la hiperplasia del estroma cortical del ovario (HEO).

El hecho de intentar correlacionar a las alteraciones de las CLO con diversos estados patológicos en la mujer no es algo nuevo, y ha sido propuesto por algunos autores desde hace ya bastantes años, tanto para carcinomas de endometrio (Husslein, 1951) como para hiperplasia endometrial (Dockerty, 1940) y virilización (Berger, 1942), entre otras patologías. Es más, ya en 1959 se propuso que el adenocarcinoma de endometrio estaba siempre relacionado con una enfermedad ovárica, y concretamente con la hiperplasia de células de Leydig hiliares (Sherman y Woolf, 1959).

Sin embargo, una cosa es proponerlo y otra cosa el demostrarlo. Resulta inexplicable que mujeres con carcinoma de endometrio no presenten alteraciones de las CLO, que mujeres con HCLO o con tumores de CLO no desarrollen carcinoma de endometrio, pero sí presenten signos de virilización, etc.

No obstante, nosotros también creemos que la HCLO tiene relación con el adenocarcinoma endometriode de endometrio de tipo I (y con su lesión precursora, la hiperplasia endometrial), así como con la hiperplasia del estroma cortical del ovario, y nuestros resultados avallan esta hipótesis (de 16 casos con AEE 15 mostraron HCL, y de los 12 casos con HEO 9 tenían una HCL).

Estudios adicionales deben pues ser llevados a cabo en esta dirección para intentar demostrar definitivamente la existencia de esta relación.

Finalmente, hemos comenzado a aplicar la misma metodología del presente trabajo a preparaciones histológicas escaneadas y que pertenecen a tejido testicular, con el propósito de valorar si los resultados son equiparables entre las gónadas de ambos sexos. Por ahora, y aunque sólo hemos descrito un caso, tanto la cantidad como la distribución de estas CL ofrecen una gran similitud con los hallazgos que hemos observado en las piezas de anexectomía.

CONCLUSIONES

Primera

Aprendimos a reconocer las CLO al microscopio, a diferentes aumentos y con diferentes tinciones, así como sus características citológicas.

Segunda

Aprendimos a manejar un programa de tratamiento de imágenes histológicas y efectuamos estudios morfométricos de las CLO, para calcular su área típica y para hacer un recuento aproximado de las CLO que presenta cada caso.

Tercera

Encontramos CLO en toda las muestras analizadas, independientemente de comorbilidad de otra patología asociada, ya sea el AEE o la HEO.

Cuarta

Demostramos que podemos hablar de HCLO con un recuento de más de 1.400 CLO, en contra de un artículo publicado este mismo año que propuso un total de 300 CLO.

Quinta

Nuestros resultados avalan la existencia de una relación entre la HCLO con patologías hormono dependientes, como son la HEO y el AEE.

Sexta

Hemos iniciado la aplicación de esta misma metodología para el estudio de las CL testiculares extraparenquimatosas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alemán Sánchez C, Hernández Hernández I, Marrero Fraga GI, Martín Corriente C, Álvarez-Argüelles Cabrera H, Gutiérrez García R, Valladares Parrilla F, Díaz-Flores L, Carrasco-Juan JL. Las células de Leydig ováricas. *Majorensis*, 2017, 13:103-117.
- Berger L. Sur l'existence de glandes sympathicotropes dans l'ovaire et le testicule humains; leurs rapports avec la glande interstitielle du testicule. *Compt rend Acad d sc*, 1922, 175:907-909.
- Berger L. Les cellules sympathicotropes et pheochromes de l'ovaire humain. *Compt rend Soc de biol*, 1924, 90:267-268.
- Berger L. Tumeurs des cellules sympathicotropes de l'ovaire avec virilization. *Rev Canad Biol*, 1942, 1:539.
- Boss JH, Scully RE, Wagner KH, Cohen RB. Structural variations in adult ovary: clinical significance. *Obstet Gynecol*, 1965, 25:747-764.
- Carrasco-Juan JL, Álvarez-Argüelles Cabrera H, Martín Corriente MC, González-Gómez M, Valladares Parrilla F, Gutiérrez García R, Díaz-Flores L. Ovarian Leydig cells (OLC): A histomorphological and immunohistochemical study. *Histol Histopathol*, 2017; 32:1089-1097.
- Carrasco-Juan JL, Álvarez-Argüelles Cabrera H, Martín Corriente MC, Gutiérrez García R, Vega Falcón A, Expósito Afonso I, Méndez Medina R, Díaz-Flores L. Extraparenchymal ovarian and testicular Leydig cells: ectopic/heterotopic or orthotopic?. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298:655-661.
- Dockerty MB. The theca cell tumors of the ovary. *Am J Obs & Gynec*, 1940, 39:434.
- Husslein H. Hiluscelladenom und Korpus Karzinom. *Zentralbl Gynäk*, 1951, 73:1649-1654.
- Kohn A. Über "Leydigsche Zwischenzellen" im Hilus des menschlichen Eierstockes. (Extraglanduläre Zwischenzellen). *Endokrinologie*, 1928, 1:3-10.
- Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM (eds.). *Blaustein's pathology of the female genital tract* (6th ed.), DOI 10.1007/978-1-4419-0489-8-9, Springer Science + Business Media, 2011.
- Reijnen C, Küsters-Vandeveldde HVN, Abbink K, Zusterzeel PLM, van Herwaarden AE, van der Laak JAWM, Massuger LFAG, Snijders MPLM, Pijnenborg JMA, Bulten J. Quantification of Leydig cells and stromal hyperplasia in the postmenopausal ovary of women with endometrial carcinoma. *Hum Pathol*, 2019, 85:119-127.
- Reinke FB. Beiträge zur histologie des Menschen. I. Krystalloidbildung in den interstitiellen Zellen des menschlichen Hodens. *Archiv für mikroskopische Anatomie, Bonn*, 1896, 47:34-44.
- Robboy SJ, Anderson MC, Russell P. En: *Pathology of the female reproductive tract*. Churchill Livingstone, 2002, pp 481.
- Sherman AI, Woolf RB. An endocrine basis for endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 1959, 77:233-242.
- Sternberg WH. The morphology, androgenic function, hyperplasia, and tumors of the human ovarian hilus cells. *Am J Pathol*, 1949, 25:493-521.
- Svidgen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev*, 2013, 27:2409-2426.
- Tenczar FJ. Hilus cell hyperplasia of ovary. *Q Bull Northwest Univ Med Sch*, 1955, 30:49-51.
- Von Leydig F. Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugethiere. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 1850, 2:1-57.
- Wen Q, Cheng CY, Liu Y-X. Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59:89-98.