

# Inmunohistoquímica de filamentos intermedios, tipo vimentina y desmina, y enzima enolasa en túbulos seminíferos seniles humanos

H. Rodríguez<sup>a</sup>, A. Ríos<sup>a</sup>, L. Sarabia<sup>a</sup>, E. Ossandón<sup>a</sup> y J.C. Araya<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Histoembriología de la Reproducción. Programa de Morfología. ICBM y Departamento de Urología. Hospital Clínico J.J. Aguirre. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago de Chile. <sup>b</sup>Histomed. Viña del Mar. Chile.

## RESUMEN

**Objetivos:** En el envejecimiento masculino suceden alteraciones morfológicas y bioquímicas que modifican la eficacia sexual, incluyendo filamentos intermedios y la expresión de enolasa neuronal específica (ENE) testicular, ambos dependientes de la foltropina.

**Métodos:** Se procesaron los testículos de 3 pacientes de 72, 74 y 75 años, con diagnóstico de cáncer prostático, por técnicas histológicas de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica, con anticuerpos antivimentina, antidesmina y ENE. Al microscopio óptico, se cuantificaron las células negativas y positivas, en compartimiento peritubular e intratubular.

**Resultados:** La vimentina positiva se expresa en células peritubulares (18,7%) y de Sertoli (0,1%), y la negativa, en la línea germinal; la desmina positiva está entre el 10 y el 15% de las células peritubulares (el 81% en la lámina celular interna y el 19% en la periferia). Respecto a la ENE positiva, sólo la línea germinal mostró reacción: un 76% de gonias A y B, un 10% en espermatoцитos I y ausencia de espermátidas y espermatozoides.

**Discusión:** La vimentina se expresa intensamente en las células peritubulares y débilmente en las de Sertoli en individuos seniles. La desmina se expresa diferencialmente en células peritubulares (carácter mioide), preferentemente cerca de la lámina basal del tubulo. La ENE está sólo en la línea germinal, como muestra de su diferenciación embrionaria temprana.

**Palabras clave:** Testicular. Desmina. Vimentina. ENE. Humano.

**Correspondencia:** Prof. Dr. H. Rodríguez.  
Programa de Morfología. ICBM.  
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.  
Casilla 70079, Santiago-7. Santiago de Chile, Chile.  
Correo electrónico: hrodrigu@machi.med.uchile.cl

## ABSTRACT

**Immunohistochemistry of vimentin and desmin intermediate filaments and enolase enzyme in seminiferous tubules from senile individuals**

**Objectives:** Aging in males produces morphophysiological and biochemical alterations that modify sexual function, including intermediate filaments and expression of neuron-specific enolase (NSE) in the testes, both of which depend on follicle-stimulating hormone.

**Methods:** The testicles of 3 patients, aged 72, 74 and 75 years old, with a diagnosis of prostate cancer were processed by histological techniques for hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry with antibodies against vimentin, desmin and NSE. Optic microscopy was used to quantify negative and positive cells in the peri- and intratubular compartments.

**Results:** Vimentin expression was positive in peritubular (18.7%) and Sertoli cells (0.1%) and was negative in the germ line. Between 10% and 15% of peritubular cells were positive for desmin expression (81% in the internal lamina and 19% in the periphery). Only the germ line showed a positive reaction to NSE: 76% of spermatogonia A and B, 10% in spermatocytes I, and absence in spermatids and spermatozooids.

**Discussion:** Therefore, in senile individuals, vimentin is strongly expressed in peritubular cells and is weakly expressed in Sertoli cells. Desmin expression is differentially expressed in peritubular cells (myoid type), preferentially near the basal lamina of the tubule; NSE is found only in the germ line, as a sign of its early embryonic differentiation.

**Key words:** Testicular. Desmin. Vimentin. NSE. Human.

## INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la senilidad masculina se acompaña con una disminución de la libido. Sin embargo, a edades avanzadas se mantiene la potencialidad fecundante, con presencia de espermatozoides móviles y normales. Paralelamente, se describe una involución testicular funcional, con alteraciones histológicas<sup>1</sup>, disminución de la espermatogenia<sup>2</sup> y cambios en los filamentos intermedios (FI), tipo vimentina y desmina, y de algunas enzimas, tipo enolasa neuronal específica (ENE). Los FI dan flexibilidad y movilidad al citosqueleto y permiten el desplazamiento de macromoléculas intracelulares<sup>3</sup>. Estos FI están asociados al tipo y el origen de los tejidos mesodérmicos: células somáticas del testículo.

La vimentina y la desmina participan en la funcionalidad de los túbulos seminíferos. La vimentina, propia de células no musculares de origen mesenquimático y algunos epitelios, se distribuye de forma similar a la citoqueratina, y se ha descrito en las células de Sertoli<sup>4,6</sup>, donde participa en un citosqueleto complejo y se distribuye en las regiones yuxtanucleares, periféricas, y hacia las proyecciones laterales y apicales, incluyendo los recessos de sostén de la espermatogenia<sup>7</sup>. El hallazgo de vimentina en las células de Sertoli y peritubulares sugiere un origen mesenquimático<sup>5,8</sup>. Algunos autores han descrito un aumento en la expresión de vimentina en las células de Sertoli de túbulos seminíferos seniles gravemente dañados y sin línea germinal. Si embargo, la expresión de la vimentina en los túbulos seminíferos se asocia con una espermatogenia completa<sup>9</sup>.

Por otra parte, la desmina es exclusiva del tejido muscular<sup>3</sup>, principalmente en el músculo liso, donde forma haces finos unidos a los cuerpos densos. La desmina participa en la transmisión del estímulo de las proteínas contráctiles, y garantiza la distribución uniforme de las fuerzas tensoras<sup>10</sup>. Además, en células musculares embrionarias, está asociada a la vimentina. Tung y Fritz<sup>11</sup> demostraron que la desmina estaba presente en las células peritubulares del testículo y ausente en las células de Sertoli y la línea germinal, mientras que Davidoff et al<sup>8</sup> describen la presencia combinada de desmina-vimentina en el compartimiento peritubular y de desmina exclusiva en las 2 capas celulares más internas.

La ENE está en las neuronas cerebrales humanas<sup>12,13</sup>, los nervios periféricos y el sistema neuroendocrino, y además en las células de Leydig y los tumores puros y mixtos de testículo<sup>14-16</sup>. En el metabolismo energético intracelular, la ENE cataliza irreversiblemente el paso de 2-fosglicerato a fosfoenolpiruvato. Por tanto, debería estar en la línea germinal, principalmente en las espermatogonias. No obstante, durante la proliferación de la línea germinal testicular, se

observa una redistribución y una pérdida progresiva del citoplasma y de las mitocondrias.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se planteó describir la presencia y la distribución de los filamentos intermedios tipo vimentina y desmina en el tejido testicular humano senil y, paralelamente, analizar la presencia y la distribución de ENE en la línea celular del epitelio seminífero.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Se obtuvieron testículos de 3 pacientes de 72, 74 y 75 años, con diagnóstico confirmado de cáncer prostático y sometidos a orquiectomía subalbugínea bilateral terapéutica, sin tratamiento previo, y con el conocimiento informado de los pacientes y según las normas de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### Anticuerpos

Antivimentina monoclonal (Dako, Vim 3B4), IgG<sub>2</sub>, subclase kappa, que reacciona con la vimentina de células mesenquimáticas. Antidesmina monoclonal (Dako, D33), IgG<sub>1</sub>, subclase kappa, que reacciona en células musculares humanas. Anti-ENE monoclonal (Dako, N1516), que reacciona con las subunidades gamma de origen neuronal (Tris-HCl 0,05 mol, pH 7,6, 15 mmol de acida de sodio, y complejo avidina-biotina, Kit Dako, LSAB-2, K0677).

### Procedimiento

Fijación testicular en formol neutro (10%), durante 12 h, e impregnación en parafina (a 56 y 58 °C). Se obtuvieron secciones de 5 μm de espesor en portaobjetos pretratados (Vectabond® Vector Labs®). Las secciones se dividieron en: a) tinción de hematoxilina-eosina (H-E); b) inmunohistoquímica, subdividido en: antivimentina, antidesmina y ENE (incubación durante 10 min a 22 °C en cámara húmeda y revelados por sistema avidina-biotina<sup>17</sup>, y 3-amino-9-etilcarbazol [AEC], con montaje en Paramount®, Dako, S3025). Se usaron controles (+) y (-) e inhibición de peroxidasa endógena. Se cuantificó el número de células (+) y (-), según población celular, en los túbulos seminíferos cortados transversalmente (n = 90).

### Células positivas para la vimentina

Se cuantificó el número de células mioídes, de Sertoli y espermatogonias, considerando células positivas

(color café-cromógeno) y negativas (moradas-hematoxilina de contraste).

### Células positivas para la desmina

Se cuantificó el total de células peritubulares (+) y (-). Las células mioideas del túbulos seminífero, con una distribución periférica y centrífuga circular, se subdividieron en 4 estratos, comenzando desde la lámina basal y considerando las células: *a*) estrato circular interno; *b*) estrato circular medio interno; *c*) estrato circular medio externo, y *d*) estrato circular externo.

### Células positivas para la enolasa neuronal específica

Se cuantificaron las células del epitelio seminífero con reacción (+) y (-), clasificadas en: *a*) gonias (A + B); *b*) espermatocitos I (paquiteno); *c*) espermátidas y espermatozoides, y *d*) células de Sertoli. Los resultados se expresan en porcentaje de células positivas respecto al total de células contadas (promedio ± desviación estándar). Las diferencias se trataron con la prueba de la t de Student ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

La vimentina se expresó fuertemente en células de origen mesenquimático. Las células peritubulares mioideas presentaron la mayor reactividad (18,7%); en las células de Sertoli hubo una ligera expresión (0,1%), y se observó ausencia de expresión en la línea germinal (fig. 1).

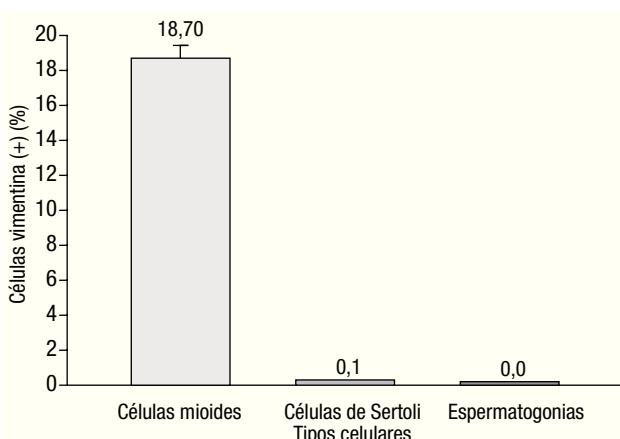


Figura 1. Porcentaje de células con inmunorreacción positiva a vimentina en el testículo senil humano: células mioideas (compartimiento peritubular), células de Sertoli y espermatogonias (compartimiento tubular). Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar.

Con la desmina (fig. 2), se obtuvo una distribución diferencial de las células reactivas, restringida sólo a células del compartimiento peritubular, con un 10 a 15% de células positivas, principalmente hacia la lámina basal (un 81% de estrato circular basal interno más estrato circular medio interno, células de carácter muscular), que hacia la periferia del peritúbulo alcanzó un 19% (estrato circular medio externo más estrato circular externo, células tipo fibroblastos).

La enolasa no se expresó en las células de Sertoli, mientras que la línea germinal mostró una positividad del 76% en espermatogonias (A + B) y un 10%, en espermatocitos I (principalmente paquiteno). Sin embargo, en las espermátidas y los espermatozoides, que están en actividad de reducción del citoplasma, no hubo reactividad (fig. 3).

## DISCUSIÓN

En la división celular, los filamentos intermedios se reordenan por fosforilación y desfosforilación, y se distribuyen hacia la región perinuclear y periférica. En la célula de Sertoli, se ha demostrado que la vimentina está presente durante toda la vida del individuo, con distribución diferencial antes de la pubertad, durante el envejecimiento y en algunos estados histopatológicos<sup>18</sup>. Esta descripción coincide con la reacción débil de la vimentina presente y observada por inmunohistoquímica durante la senilidad testicular humana. Comparativamente, las células mioideas mostraron

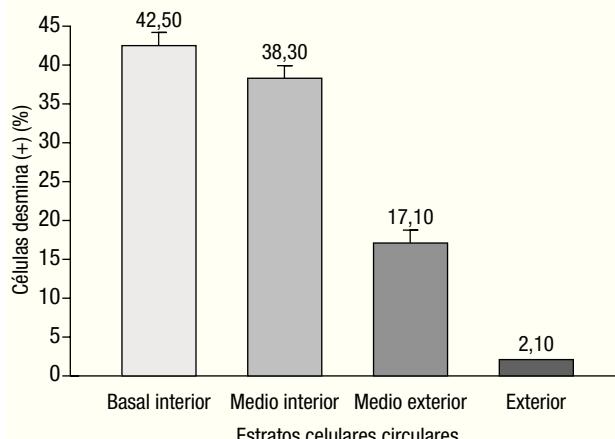


Figura 2. Porcentaje de células del compartimiento peritubular del testículo senil humano, con inmunorreacción positiva a desmina (promedio ± desviación estándar). Las células del peritúbulo fueron clasificadas en estratos celulares según su posición desde el centro hacia la periferia: *a*) estrato circular interno; *b*) estrato circular medio interno; *c*) estrato circular medio externo, y *d*) estrato circular externo, respectivamente.

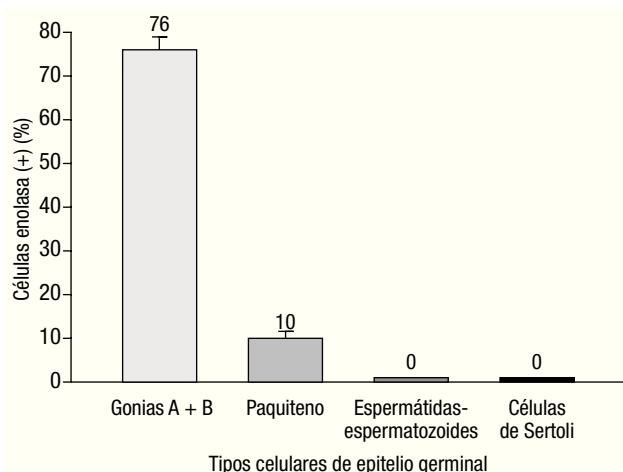


Figura 3. Porcentaje de células con inmunorreactividad positiva a la enzima enolasa neuronal específica (ENE), en células del compartimiento tubular del testículo senil humano (promedio ± desviación estándar).

una fuerte reacción a la vimentina, que coincidía también con la presencia de daño histopatológico, como el taponamiento tubular, la vacuolización y la discontinuidad del epitelio germinal, lesiones que son características de la senilidad testicular<sup>2</sup>.

En la reorganización de los filamentos intermedios durante la división celular, una enfermedad o el envejecimiento, se alteran las uniones intercelulares y la organización de los tejidos epiteliales. Estos estados son de mayor relevancia durante la espermatogenia, si se considera la sincronía con la que progresó la proliferación espermatogonial en los espacios inter-Sertoli y la barrera hematotesticular. Según Wang et al<sup>19</sup>, en un estado de depresión de la espermatogenia podrían ocurrir un aumento de la inmunorreactividad a la vimentina, asociado a estados histopatológicos testiculares, y alteraciones en la distribución e integridad de la vimentina en las células de Sertoli. Esta característica de los filamentos intermedios de las células de Sertoli aparentemente está relacionada con la integridad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

Según Johnson et al<sup>1</sup>, la célula de Sertoli y su citosqueleto permiten la organización del tejido seminífero mediante la organización de microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos, lo que facilita la estructuración de las uniones inter-Sertoli, Sertoli y células germinales, y entre Sertoli y la lámina basal del epitelio. En la célula de Sertoli, la vimentina se dispone alrededor del núcleo, se irradia centrífugamente hacia la periferia celular y alcanza la región lateral de la membrana plasmática en asociación a microfilamentos de actina y a las uniones inter-Sertoli; también se extienden hacia la región basal de la célula, para relacionarse indirectamente con la matriz extracelular.

En las células de Sertoli, la vimentina hace recordar su origen mesenquimático que, junto con la coexpresión ocasional de citoqueratinas (en etapas de desarrollo temprano), la vinculan, por definición, al tejido epitelial. Sin embargo, Rodríguez et al<sup>2</sup> describen que la célula de Sertoli presenta un citosqueleto complejo, de organización perinuclear y también en la región periférica, constituido por filamentos tipo vimentina. Esto sugiere que la célula de Sertoli no es una célula epitelial verdadera, sino que sólo presenta diferenciaciones epitelioideas de origen mesenquimático.

Según Johnson et al<sup>1</sup> y Rodríguez et al<sup>2</sup>, el patrón histológico más frecuente en el testículo senil corresponde a una mezcla de diferentes patrones de organización en la celularidad del túbulos seminífero, que varía desde túbulos con espermatogenia completa hasta túbulos con detención total de la espermatogenia en las espermatogonias o los espermatocitos, normalmente asociados a características histopatológicas, como la esclerosis tubular, la vacuolización y la discontinuidad del epitelio.

Paralelamente, los filamentos de vimentina asociados a los cambios histopatológicos del testículo senil modifican su concentración y su organización. La identificación de la presencia de vimentina en el testículo senil permite identificar una población reducida de células de Sertoli con reacción positiva, y se asocia a túbulos seminíferos con espermatogenia completa, mientras que la presencia de células de Sertoli negativas se encuentra asociada a túbulos seminíferos, con diversos grados de alteraciones histopatológicas. Sin embargo, Johnson et al<sup>1</sup> describen una reactividad a la vimentina moderada en túbulos seminíferos con espermatogenia completa, y una inmunorreactividad aumentada en túbulos con detención de la espermatogenia, aunque sólo describen la intensidad de la reacción y no el número de células de Sertoli inmuno-reactivas.

Según Alberts et al<sup>3</sup>, las células intersticiales, del periódulo y las de Sertoli deben ser reactivas a la vimentina, mientras que las células germinales, no. Resultados similares se describen en el presente trabajo, con la diferencia de que las células de Sertoli presentaron una reacción positiva extremadamente ligera. Más aún, esta leve positividad está asociada a túbulos seminíferos con la espermatogenia desorganizada, lo que podría indicar que, durante la espermatogenia, las células de Sertoli del adulto se distancian de su carácter mesenquimático, en asociación con las células de la línea germinal. Por tanto, la presencia de inmunorreactividad de la vimentina estaría asociada positivamente a la condición de una espermatogenia completa. Sin embargo, en un estado tumoral de las células de Sertoli, éstas adquieren un carácter más mesenqui-

mático y una inmunoexpresión de mayor intensidad, semejante a un estado de inmadurez<sup>20</sup>. Por el contrario, y de acuerdo con los resultados mostrados aquí, parecería que, durante la senilidad, en las células de Sertoli simplemente se dañan la vimentina y el citosqueleto.

La desmina, un FI de fibras musculares, se encontró ausente del tejido germinal citogénico, específicamente en las células de Sertoli, las germinales y las intersticiales, tal como describen otros autores<sup>3</sup>. Sin embargo, la positividad en las células peritubulares parece ser dependiente de la especie animal en estudio. Segundo estos autores<sup>3</sup>, las células peritubulares humanas dan reacción positiva a la desmina. Esta misma situación se describe en los resultados del presente trabajo, agregando, además, que el peritúbulo testicular humano presenta una inmunorreacción positiva dependiente de la posición de las células: el área peritubular más cercana a la lámina basal presenta el número más elevado de células inmunorreactivas (42,5%) y constituye una fracción celular de carácter muscular, lo que disminuye a medida que la posición de la célula se hace más periférica, donde adquiere un carácter más propio de las células de tipo fibroblasto.

Aparentemente, la estrecha asociación funcional entre las células intersticiales y las de Sertoli y una asociación moduladora de las células de la espermatogénesis parecen definir los patrones de organización del citosqueleto en los diferentes tipos celulares del testículo, con sus FI característicos, según el origen embrionario.

En el testículo, está claro que el origen embrionario de las células de Sertoli y las peritubulares es mesenquimático. Sin embargo, para las células intersticiales, como las de Leydig, se postula un origen neuroectodérmico, ya que expresan una fuerte inmunorreactividad a ENE<sup>16</sup>. Esta ENE corresponde a un marcador para células del sistema nervioso central y periférico, y células neuroendocrinas del sistema APUD.

En el presente trabajo se describe que las células del tejido germinal, específicamente espermatogonias tipos A y B, presentaron una fuerte inmunorreactividad a ENE (un 76% del total de las espermatogonias). Mientras progresan los procesos de división celular, mitosis y meiosis, la inmunorreactividad disminuye en citos I (10%), y no está presente durante la meiosis (espermáticas redondas y elongadas, y espermatozoides). Mientras que en las células de Sertoli hubo ausencia total de inmunorreactividad. Sin embargo, algunos autores<sup>21</sup> demostraron que células en cultivo *in vitro* de tumor testicular (células de Sertoli), expresaron una fuerte inmunotinción para ENE y una inmunotinción variable para vimentina.

Probablemente, la inmunorreactividad de las células de la línea germinal a ENE refleja el origen embrionario de las células germinales desde el embrión temprano: macizo celular interno, hipoblasto, neuroectoderma y células germinales.

## AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Prof. Dr. Werner W. Franke, del German Cancer Research Center, Divison of Cell Biology/A0100; al Prof. Dr. Michail Davidoff, del Anatomisches Institut Uke, Alemania, y al Prof. Dr. Kenneth Roberts, del Department of Urologic Surgery, University of Minnesota Medical School, Estados Unidos, por la valiosa colaboración, así como al Prof. Dr. Keiichi Moriguchi, del First Department of Anatomy, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, de Japón.

## Bibliografía

- Johnson L, Nguyen H, Petty C, Neaves W. Quantification of human spermatogenesis: germ cell degeneration during spermatogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. Biol Reprod 1987;37:739-47.
- Rodríguez H, Salazar P, Schmidt N, Torres P, Ossandon E. Human testicular histology in young and senile men. Rev Chil Anat 1999;17:183-8.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. El Citoesqueleto. En: Alberts B, Bray D, Lewis J, editores. La biología molecular de la célula. Cap 16. 3.<sup>a</sup> ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1994; p. 852-60.
- Franke W, Grund C, Schmid E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. Eur J Cell Biol 1979;19:269-75.
- Kierszenbaum A, Crowell J, Shabanowitz R, Smith E, Spruill W, Tres L. A monoclonal antibody recognizes a form of intermediate filament protein in rat Sertoli cells that is not present in seminiferous peritubular cells. Biol Reprod 1986;35:227-38.
- Rodríguez A, Rojas M, Bustos-Obregón E, Urquieta B, Regadera J. Distribution of keratins, vimentin, and actin in the testis of two south american camelids: Vicuna (*Vicugna vicugna*) and Llama (*Lama glama*). An immunohistochemical study. Anat Rec 1999;254:330-5.
- Ross M, Romrell L, Kaye G. Male reproductive system. En: Histology text and atlas. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995; p. 646-54.
- Davidoff M, Breucker H, Holstein A, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. Cell Tissue Res 1990;262:253-61.
- De Miguel M, Bethencourt F, Arenas M, Fraile B, Paniagua R. Intermediate filaments in the Sertoli cells of the aging human testis. Virchows Arch 1997;431:131-8.
- Ross M, Romrell L, Kaye G. The cell. En: Histology text and atlas. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995; p. 39-41.
- Tung P, Fritz I. Characterization of rat peritubular myoid cells in culture: smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. Biol Reprod 1990;42:351-65.
- Marangoz P, Zis A, Clark R, Goodwin F. Neuronal, nonneuronal and hybrid forms of the nervous system specific protein 14-3-2 from rat brain. Purification, subunit composition and comparison to the beef brain protein. J Biol Chem 1978;250: 1884-91.
- Moore B, Mac Gregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. J Biol Chem 1965;240:1647-50.

14. Davidoff M, Middendorff R, Holstein A. Dual nature of Leydig cells of the human testis. *Biomed Rev* 1996;6:11-41.
15. Davidoff M, Schulze W, Middendorff R, Holstein A. The Leydig cell of the human testis-a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 1993;271:429-39.
16. Schulze W, Davidoff M, Ivell R, Holstein A. Neuron-specific enolase-like immunoreactivity in human Leydig cells. *Andrologia* 1991;23:279-83.
17. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
18. Gulkesen K, Erdogru T, Sargin C, Karpuzoglu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian J Androl* 2002;4:55-60.
19. Wang Z, Watanabe Y, Toki A, Kagawa T. Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *J Pediatric Surg* 2002;37:648-52.
20. Al Nazer M, Al Dayel F. Tubular seminoma: case report and literature review. *Ann Saudi Med* 2001;21:334-6.
21. Scudamore C, Meredith A. Sertoli cell tumor in an Amur tiger. *J Comp Pathol* 2001;124:79-82.