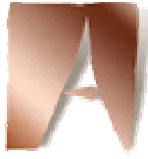


Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Facultat de Veterinària



Universitat Autònoma de Barcelona

**EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB TUNGSTAT
SÒDIC SOBRE LA FUNCIO REPRODUCTIVA EN
RATES DIABÈTIQUES INDUÏDES AMB
ESTREPTOZOTOCINA**

Joan Ballester i Casals

Bellaterra, abril de 2002

Joan Enric Rodríguez i Gil i Teresa Rigau i Mas, Professors Titulars del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN:

Que la memòria titulada "**Efectes del tractament amb tungstat sòdic sobre la funció reproductiva en rates diabètiques induïdes amb estreptozotocina**" presentada per **Joan Ballester i Casals** per obtenir el grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació per tal de ser jutjada per la comissió corresponent.

I per tal que així consti, signen la present a Bellaterra a 26 d'Abril de 2002.

Dr Joan Enric Rodríguez i Gil

Dra Teresa Rigau i Mas

Resum

RESUM

Aquest treball s'emmarca dins de l'estudi sobre l'ús del **tungstat de sodi** com a agent antidiabètic. On s'ha estudiat la capacitat normogluceyant d'aquest compost així com els possibles efectes no desitjats que es puguin derivar del tractament.

Tenint-ne en compte aquestes indicacions, s'ha estudiat les alteracions reproductives lligades a una diabetis tipus I, induïda per estreptozotocina, durant un període de tres mesos, alhora que s'ha observat la capacitat del **tungstat sòdic** per a contrarestar les alteracions reproductives lligades a la diabetes i si aquesta substància és capaç d'alterar la funció reproductiva "*per se*".

Els resultats en mascles i femelles mostren com el tungstat té un efecte normogluceyant. En els **mascles**, s'observa com el tractament amb tungstat causa una pèrdua de pes, més marcat en els animals diabètics. Els nivells sèrics de totes les hormones estudiades (insulina, FSH, LH i testosterona) cauen amb la diabetis, i el tractament amb tungstat aconsegueix recuperar-los a nivells normals. Els animals diabètics tractats mostren una aturada en mosaic de l'espartogènesi deguda a una potenciació dels efectes tòxics de l'estreptozotocina. Amb aquest resultat es plantejaria l'ús de models animals diferents als diabètics STZ.

La cèl·lula de Leydig és la més afectada amb la diabetis, presentant acumulació de lípids, precursors dels andrògens, la síntesi dels quals està disminuïda, implicant una alteració en els nivells de testosterona, situació que afectarà negativament a la libido, la fertilitat i la prolificitat. Així mateix, aquestes cèl·lules tenen una disminució en l'expressió de diferents marcadors de funcionalitat reproductiva, com l'SCF i els receptors d'andrògens. Un altre paràmetre afectat és l'expressió del receptor d'IGF-I, el qual disminueix amb la diabetis. Amb aquests resultats es pot comprovar com hi ha efectes directes sobre el testicle i altres d'indirectes, via eix hipotàlam-hipòfisi.

L'epiteli epididimari s'ha mostrat resistent a qualsevol canvi causat per la diabetis amb els paràmetres avaluats en aquest treball.

En les **femelles** també s'observa una pèrdua de pes deguda al tractament amb tungstat. Els paràmetres més afectats són els hormonal. Tots cauen amb la diabetis. El tractament amb tungstat els recupera, llevat de la progesteronèmia. Aquestes alteracions hormonal condicionaran els cicles estrals i les possibles gestacions.

Les femelles diabètiques control no han obtingut descendència. El tractament amb tungstat aconsegueix millorar molt la libido, comparant amb les diabètiques control, però la prolificitat està marcadament disminuïda. Aquesta caiguda de la prolificitat estarà causada per la suma de diferents etiologies, sobretot de tipus hormonal. En el cas dels mascles, la prolificitat dels animals diabètics disminueix respecte als sans, i entre els diabètics, els tractats amb tungstat tenen menys cries, per efecte de l'aturada parcial de l'espermatogènesi que presenten aquests animals. Finalment, l'estudi del pas del tungstat al fetus durant la gestació mostra com hi ha una acumulació molt marcada en les cries de mares que han estat tractades durant la gestació.

Abstract

ABSTRACT

This work is framed inside the study of the sodium tungstate as an antidiabetic agent, which its normoglycemic capacity has been studied as well as the not desired potential effects which can be derived of the treatment.

Considering these indications, we have studied the alterations associated to a diabetes type I induced with streptozotocin (STZ) in rats, during a period of three months, observing the capacity of the sodium tungstate counteracts these reproductive alterations. Moreover, we have studied the effect of this compound on the reproductive function by itself. The results in male and female rats show us that tungstate has a normoglycemic effect. In the males, one can observe as the treatment with tungstate causes a loss of weight, more evident in the diabetic animals. The serum levels of the studied hormones (insulin, FSH, LH and testosterone) fall in the diabetic rats, and the treatment with tungstate is able to recover them until normal levels. The treated diabetic animals suffer an interruption in mosaic of the spermatogenesis, probably, to an increase of the toxic effects of the STZ. According to these results we suggest to use another animal model, different to the STZ diabetic.

Leydig cells are the most affected cells by the diabetes, presenting a vacuolized cytoplasm for lipid accumulation (androgen precursors), also the synthesis is diminished, implying an alteration in testosterone levels, situation which will affect negatively to the libido, fertility and prolificity. Likewise, these cells show a decrease in the expression of different markers of reproductive function, as SCF and androgen receptors. Another affected parameter is the expression of the IGF-I receptor, which diminishes in diabetic rats. These results show that there are direct and indirect effects on the testicle, via hypophysis.

The epididymis structure has been shown resistant to any change caused by the diabetes in all parameters evaluated in this work. In the female rats, a loss of weight is also observed due to the treatment with tungstate. However, the parameters affected by diabetes as the decrease of

hormonal levels are recovered by the treatment with tungstate except progesterone levels in serum. These hormonal alterations will condition the oestrous cycles and the possible gestations.

Diabetic females did not have descendant. We have also observed that the treatment with tungstate is able to improve the libido, comparing with the diabetic control animals, but the prolificity is diminished markedly. This fall of the prolificity would be caused by the sum of different aetiologies, mainly of hormonal type. In the case of the males, the prolificity of the diabetic animals diminishes regarding the healthy ones, and between the diabetic animals, the tungstate treated animals have less breedings, for effect of the partial interruption of the spermatogenesis on these animals. Finally, the study of the across of the tungstate to the fetus during the gestation shows that there is accumulation in the breedings of mothers that have been treated during the gestation.

Agraiments

Mirant aquest treball veig que no hauria estat possible realitzar-lo sense l'ajuda d'amics i companys que he anat trobant des de que vaig començar aquesta cosa de la investigació.

Gràcies els meus directors, la Teresa i en Joan Enric, els qui m'estan guiant en el camí de la investigació. Sí Joan Enric, quantes vegades t'hauré sentit "*it's science*" quan surt un resultat que ningú espera i t'embolica més del que ja estàs?, segurament més de les que voldria, però que hi farem, "*it's science*". Si al final ho acabaré aprenent!!.

Seria imperdonable oblidar-me de la meva gran família que formem els de repro: la Xus, còmplice de westerns, excursions a químiques i de bones estones, la Teresa M., la meva consciència ortogràfica i gramatical; gràcies per els bons moments i l'ajuda amb "powerpoin". Tota la tropa llatino-americana, que m'ha permès conèixer diferents països, noves cultures i noves tradicions sense sortir del laboratori (¡muchas gracias por vuestra amistad y vuestro compañerismo!): Armando, el veterà i l'amo i senyor del regne SAS, a la parella FIV; el Jose Luís i la Clàudia, als inseparables Fanny i Antonio i a l'Olga, sempre cap aquí i cap allà per poder tirar endavant la tesi. Álex, no me he olvidado de ti, el súper técnico, gracias por tu ayuda y por descubrirme los secretos del laboratorio. I tota la colla del burro català (i no va amb segones), gràcies al Jordi, al Sergio i a l'aire nou i fresc portat per la Núria. Seria imperdonable no recordar-me dels qui han passat per repro deixant una mica d'ells en les nostres vides: la Cristina, la Fefi, la Dolors, la Sílvia i la Meritxell.

Gràcies gent de Calier, Gemma, Montse i Rosa, pel vostre suport econòmic dels darrers mesos

Des de fa anys que anem junts i ara seguim igual, no és així Joaquín i Jaume?. Gràcies per la vostra ajuda i consells, i sobretot per la vostra amistat i bones estones que estem passant plegats, juntament amb la resta de nutrició, en Dani, la Lucia, en Jaume R, la Ceci, l'Edgar i

les novetats, la Montse i la Marisol. No m'oblido d'en Sígrfid, encara que estiguis en terres llunyanes, tot i que Jaume, tu ets el que està més lluny (què vagi bé per Alabama!). Sense deixar la tercera planta, que faríem sense les millors veïnes que es podien haver tingut, l'Elisabeth, l'Ester, la Mariajo i la Maria; i els veïns de pato mèdica: Jordi, David i Jorge. I a la planta baixa, i no per això menys importants, la Mar i la Clara.

Pràcticament un 50% d'aquest treball l'he fet a Barcelona, a Cal Guino (químiques, 7^a planta, 1^a porta a la dreta). Vull agrair al Dr. Guinovart, amb ell i en Joan Enric ara sóc un més dels "niños tungstat". A ciutat he rebut, a més d'ajut i explicacions científiques moltes bones estones, gràcies "sucres": a la Mar, qui m'ha ensenyat "lo habido y por haber" dels Western blot (¿sigo siendo tu niño?), en Roger, l'Emili, la Núria, la Cristina i el Dani, sempre disposats a donar-me un cop de mà. Als senyors del laboratori, en Joan Carles i en Josep Maria, quines bones estones a Sevilla!, treballant, per descomptat!; i els tècnics, en Pep i la Susanna, a punt per donar suport tècnic i moral quan feia falta. Finalment, i no menys important, gràcies Anna, per ajudar-me amb els animals de laboratori (els de l'estabulari) i per ensenyar-me a moure'm dins un laboratori de bioquímica, i les bones estones passades i que espero que seguirem passant, junt amb l'Albert, la M^a Carmen, la Belén i el Jorge, els grans amics/companys de la família tungstat, al final podríem formar un club, gràcies per l'ajuda que m'heu donat davant dels molts maldecaps que ens dóna el tungstat i els informes Bayer; seguirem endavant!!!.

Una part important d'aquest treball experimental l'he realitzat a bioquímica de veterinària, pel que vull agrair a la Dra Fàtima Bosch per obrir les portes del seu laboratori perquè pogués acabar els meus experiments. Aquí he descobert el món de les immunohistoquímiques, i també he trobat ajuda, algun consell i una amiga, gràcies Marta. Tot i

que no era el meu lloc, aviat el vaig fer meu, gràcies a l'Alba (ho sento per no poder esperar a presentar la tesi junts!), la Maria, la Sylvie, la Mireia, el Sergio, l'Àlex, l'Antonio, el Pedro, en Carles, la Tura i les Annes.

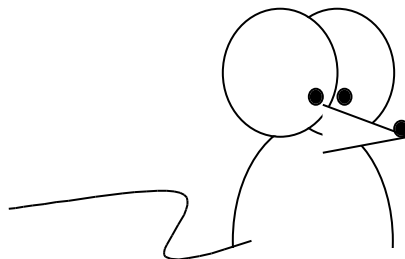
Gràcies amics, tot i no estar relacionats amb la ciència sempre que us he necessitat, sempre us he trobat, gràcies Xavi, Elina i Quim, i al club del cinc de copes: Lídia i Miguel, Ferran, Cisco i Elena (+ un o una), Joaquín i Anna (chè!), Jorge i Dani. I la resta de tropa: Andrés, David, Diego i Montse.

Per acabar vull agrair als qui m'han donat suport i m'han animat des d'un principi, de fet, des de que vaig néixer, gràcies pares, senzillament per tot.

A la Marga, la meva cunyadíssima, i gràcies David, per fer tan bé de germà gran, que és el que et toca!.

Gràcies, sense vosaltres no ho hauria aconseguit.

Joan.



Aquesta tesi s'ha realitzat amb fons d'investigació sanitària (FIS: 97/2040), amb una beca predoctoral per a l'acabament de tesis doctorals (TDOC) de la Generalitat de Catalunya (2000-2001) i inversions de l'empresa Química Farmacèutica Bayer, S.A.

Índex

I. INTRODUCCIÓ

1.1. La diabetis	1
1.1.1. Definició.....	1
1.1.2. Tipus de diabetis.....	2
1.1.2.1. Diabetis tipus I (IDDM).....	3
1.1.2.2. Diabetis tipus II (NIDDM).....	5
1.1.3. Importància de la diabetis.....	5
1.2. Models animals diabètics	8
1.2.1. Models de diabetis tipus I.....	8
1.2.2. Models de diabetis tipus II.....	9
1.3. Les sals inorgàniques com a agents antidiabètics orals	9
1.4. El tungstat sòdic	10
1.4.1. Presentació.....	10
1.4.2. Efectes de l'administració oral del tungstat.....	11
1.5. Diabetis i reproducció	12
1.5.1. Efectes de la diabetis en el sistema reproductor masculí.....	12
1.5.2. Efectes de la diabetis en el sistema reproductor femení.....	13
1.6. Endocrinologia reproductiva: Eix hipotalàmic-hipofisari	15
1.7. Estudi del sistema reproductor MASCULÍ	17
1.7.1. Eix hipòfisi-gònada masculina.....	17
1.7.2. Espermatogènesi.....	20
1.7.3. Cèl·lules de Sertoli.....	25
1.7.4. Cèl·lules de Leydig.....	26
1.7.5. Cèl·lules epididimàries.....	27
1.7.6. Receptors d'andrògens	30
1.7.7. Altres receptors hormonals	32
1.7.8. Altres indicadors de la funcionalitat reproductiva.....	32
1.7.8.1. IGF-I, Insulina i els seus receptors.....	32
1.7.8.2. Residus de Tirosines fosforilats.....	37
1.7.8.3. <i>c-kit</i> / SCF.....	38
1.7.8.4. Glut 3.....	39

1.8. Estudi d el sistema reproductor FEMENÍ	40
1.8.1. Eix hipòfisi-gònada femenina.....	40
1.8.2. Oocitogènesi.....	42
1.8.3. Cicles estrals.....	44
1.8.4. Gestació i part.....	47
1.8.5. Receptors d'estrògens.....	49
1.8.6. Altres receptors hormonals.....	50
1.8.7. Altres indicadors de la funcionalitat reproductiva.....	51
1.8.7.1. IGF-I, Insulina i els seus receptors.....	51
1.8.7.2. Residus de Tirosines fosforilats.....	53
1.8.7.3. <i>c-kit</i> / SCF.....	53
1.8.7.4. Glut 3.....	53

II. OBJECTIUS

Objectius	55
------------------------	----

III. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Animals	57
3.2. Tinció d'hematoxilina i eosina	58
3.2.1. Anàlisi estructural.....	58
3.2.2. Anàlisi morfològic.....	58
3.3. Tinció d'àcid periòdic de Schiff (PAS)	59
3.4. Microscopia electrònica de transmissió	60
3.5. Determinacions d'hormones sèriques	60
3.5.1. Extracció d'hormones esteroidees sèriques.....	60
3.5.2. "Kits" de determinació.....	61
3.6. Immunohistoquímiques	61
3.7. Western immuno-blotting	62

3.7.1. Homogenització de les mostres.....	62
3.7.2. Electroforesi.....	63
3.7.3. Tinció amb Blau de Coomassie.....	63
3.7.3.1. Tinció del gel.....	63
3.7.3.2. Secatge del gel.....	63
3.7.4. Tinció amb Roig de Ponceau.....	64
3.7.5. Western Immunoblotting.....	64
3.7.6. Deshibridació de membranes.....	65
3.7.7. Relació d'anticossos.....	65
3.8. Expressió d'ARNm.....	66
3.8.1. Extracció d'ARN.....	66
3.8.2. Sondes.....	66
3.8.2.1. RT-PCR.....	66
3.8.2.2. Oligonucleòtids.....	67
3.8.2.2.1. Receptor d'LH.....	67
3.8.2.2.2. Receptor de prolactina (PRL-R).....	67
3.8.2.2.3. Receptor d'FSH.....	67
3.8.2.2.4. Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.....	68
3.8.3. Electroforesi.....	68
3.8.3.1. Electroforesi.....	68
3.8.3.2. RT-PCR semi-quantitativa.....	68
3.8.4. Marcatge de sondes producte de PCR.....	69
3.8.5. Hibridació 'in situ'.....	69
3.9. Dades d'eficiència reproductiva.....	70
3.10. Bioacumulació del tungstat sòdic.....	71
3.11. Anàlisi estadístic.....	72
3.12. Reactius.....	72

IV. RESULTATS

4.1. EFECTES DE LA DIABETIS I EL TRACTAMENT AMB TUNGSTAT SÒDIC SOBRE LA FUNCIO REPRODUCTIVA MASCULINA.....	73
---	-----------

4.1.1. Paràmetres corporals i sèrics	73
4.1.2. Anàlisi estructural	73
4.1.2.1. Testicle.....	73
4.1.2.2. Epidídim.....	75
5.1.2.3. Tinció de PAS.....	75
4.1.3. Anàlisi ultraestructural	78
4.1.4. Patró de distribució de proteïna	80
4.1.5. Expressió del receptor d'andrògens	81
4.1.6. Expressió del receptor de progesterona	82
4.1.7. Expressió del receptor d'FSH	83
4.1.8. Expressió del receptor d'LH	85
4.1.9. Expressió del receptor de prolactina	86
4.1.10. Expressió del receptor d'IGF-I	86
4.1.11. Nivells d'expressió d'IGF-I	87
4.1.12. Expressió del receptor d'insulina	88
4.1.13. Nivell de fosforilació en residus de tirosines	89
4.1.14. Nivells d'expressió del SCF/ <i>c-kit</i>	90
4.1.14.1. Nivells d'expressió del SCF.....	90
4.1.14.2. Nivells d'expressió del receptor de <i>c-kit</i>	91
4.1.15. Glut 3	92
4.2. EFECTES DE LA DIABETIS I EL TRACTAMENT AMB TUNGSTAT SÒDIC SOBRE LA FUNCIO REPRODUCTIVA FEMENINA	95
4.2.1. Paràmetres corporals i sèrics	95
4.2.2. Anàlisi estructural	96
4.2.2.1. Ovari.....	96
4.2.2.2. Banyes uterines.....	97
4.2.2.3. Tinció de PAS.....	98
4.2.3. Anàlisi ultraestructural	99
4.2.4. Patró de distribució de proteïna	99
4.2.5. Expressió del receptor d'estrògens	100
4.2.6. Expressió del receptor d'andrògens	101

4.2.7. Expressió del receptor de progesterona.....	103
4.2.8. Expressió del receptor d'FSH.....	104
4.2.9. Expressió del receptor d'LH.....	106
4.2.10. Expressió del receptor de prolactina.....	106
4.2.11. Expressió del receptor d'IGF-I.....	107
4.2.12. Nivells d'expressió d'IGF-I.....	108
4.2.13. Expressió del receptor d'insulina.....	108
4.2.14. Nivell de fosforilació en residus de tirosines.....	110
4.2.15. Nivells d'expressió del SCF/ <i>c-kit</i>.....	111
4.2.15.1. Nivells d'expressió del SCF.....	111
4.2.15.2. Nivells d'expressió del receptor de <i>c-kit</i>	112
4.2.16. Glut 3.....	113
4.3. DADES D'EFICIÈNCIA REPRODUCTIVA.....	117
4.4. BIOACUMULACIÓ de tungstat en rates nounates.....	119

V. DISCUSSIÓ

5.1. Efectes de la diabetis i el seu tractament amb tungstat sòdic sobre el sistema reproductor masculí.....	121
5.2. Efectes de la diabetis i el seu tractament amb tungstat sòdic sobre el sistema reproductor femení.....	130

VI. CONCLUSIONS

Conclusions.....	137
-------------------------	------------

VII. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia.....139

VIII. ADRECES WEB

Adreces web.....155

Abreviatures

ACTH:	adenocorticotropina
ADN:	àcid desoxiribonucleic
AMPC:	monofosfat d'adenosina cíclic
AR:	receptor d'andrògens
ARN:	àcid ribonucleic
ARNm:	àcid ribonucleic missatger
BSA:	albúmina de sèrum de boví
CHO:	cèl lules de hámster xinès
DAB:	tetrahydroclorat de diaminobenzidina
DC:	rata diabètica control
DT:	rata diabètica tractada amb tungstat sòdic
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	àcid etilendiaminotetracètic
EGF:	factor de creixement epidèrmic
ELISA:	assaig immunològic per reacció enzimàtica
ER:	receptor d'estrògens
FSH:	hormona estimulant del creixement fol licular
GH:	hormona del creixement
Glut 3:	transportador d'hexoses tipus 3
GnRH:	hormona alliberadora de gonadotropines
hCG:	gonadotrofina coriònica humana
Hepes:	àcid 2-[4-(2-hidroximetil) -1-piperazinil]-etanosulfònic
IDDM:	diabetis mellitus insulinodepenent
IGF-I:	factor de creixement semblant a la insulina I
IGF-II:	factor de creixement semblant a la insulina II
IGFBP:	proteïnes lligants d'IGF
IGF-IR:	receptor del factor de creixement semblant a la insulina I
IL:	interleuquina
IR:	receptor d'insulina
IRS-I:	substrat I del receptor d'insulina
LH:	hormona luteinizant
NBT:	4-nitro blau tetrazolium clorhidre

NIDDM:	diabetis mellitus no insulinodepenent
PAS:	àcid periòdic de Schiff
PBS:	tampó fosfat salí
PCOS:	síndrome de l'ovari poliquístic
PGF ₂ :	prostaglandina F2
PMSF:	fluorur de fenil-metil-sulfonil
PRL:	prolactina
PRL-R:	receptor de prolactina
REL:	reticle endoplasmàtic llis
RER:	reticle endoplasmàtic rugós
rCG:	gonadotrofina coriònica de rata
RPG:	receptor de progesterona
RT-PCR:	transcriptasa inversa acoblada a la reacció en cadena de la polimerasa
SDS:	dodecil sulfat sòdic
SC:	rata sana control
SCF:	factor de cèl lules no diferenciades
SSC:	solució salina de citrat sòdic
SSJC:	complex d'unió Sertoli-espermàtida
TSH:	tirotropina
ST:	rata sana tractada amb tungstat sòdic
STZ:	estreptozotocina, [2-deoxy-2-(3-metil-3-nitrosourea)1-D-glucopiranos]
TEA:	tri-etanol-amina
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
W:	tungstè