

Objectius

Els objectius principals d'aquest treball són:

⇒ Valorar la possible alteració de la funció reproductiva de rates adultes per efecte de la diabetis tipus I induïda amb estreptozotocina.

La funció reproductiva s'ha valorat mitjançant l'observació dels següents paràmetres:

- Anàlisi morfològic estructural i ultraestructural.
- Nivells sèrics d'LH, d'FSH, de testosterona i de progesterona.
- Expressió del receptor d'andrògens, d'estrògens, LH, FSH i progesterona.
- Expressió d'IGF-I i el seu receptor.
- Expressió d'insulina i del receptor d'insulina.
- Nivell de fosforilació de residus de tirosina
- Expressió del SCF i del seu receptor *c-kit*
- Expressió del Glut 3.

⇒ Estudiar com afecta a la funció reproductiva de rates adultes el tractament durant tres mesos amb **tungstat sòdic**, agent mimètic de la insulina, tant en rates sanes com en rates diabètiques tipus I.

⇒ Comprovar la importància de les relacions entre els paràmetres de funció reproductiva i les interaccions entre els diferents tipus cel·lulars dels diferents teixits en rates sanes i en rates diabètiques, sempre comparant rates tractades i no tractades amb **tungstat sòdic**.

⇒ Intentar determinar com el tractament amb **tungstat sòdic** pot afectar a la fertilitat així com el seu possible pas als fetus durant la gestació.

⇒ Fer una valoració de la idoneïtat del model emprat, rates Wistar inoculades amb estreptozotocina, per l'estudi del tractament de la diabetis mellitus tipus I amb **tungstat sòdic**.

Material i mètodes

3.1. Animals

L'estudi s'ha fet amb rates Wistar mascles i femelles, amb un pes inicial de 200 g. Es van allotjar en grups de 3, amb disposició de menjar i beure *ad libitum*. Les condicions ambientals de temperatura, humitat i llum estaven controlades a 22°C, 40-60 % d'humitat i un règim de llum de 12 hores.

Cada grup estava format per 15 animals. La diabetis es va induir amb una dosi única d'estreptozotocina de 70 mg/Kg per via intraperitoneal, administrada als 7 dies de l'arribada dels animals a l'estabulari. De mitjana, s'aconseguia un estat de diabetis controlat per la glucèmia als 7 dies.

La supervisió d'aquests animals es basava en el control setmanal del seu pes i de la seva glucèmia, mesurada amb 'Glucometer Elite' de Bayer per punció a la cua, així com mitjançant l'observació del seu aspecte i comportament.

A les rates tractades se'ls hi va administrar tungstat sòdic (Analyticals CARLO ERBA) via oral, dissolt en l'aigua de beguda, a una dosi de 2 mg/mL, durant 3 mesos.

Passats els tres mesos de tractament tots els animals van ser sacrificats mitjançant decapitació rera anestèsia profunda amb èter.

Identificació dels animals:

SC	<i>rata sana control, no tractada</i>
ST	<i>rata sana tractada amb tungstat sòdic</i>
DC	<i>rata diabètica control, no tractada</i>
DT	<i>rata diabètica tractada amb tungstat sòdic</i>

3.2. Tinció d'hematoxilina i eosina

Immediatament rera el sacrifici i dissecció de la rata, es van extreure el testicle sencer i parts de l'epidídim dels mascles i els ovaris i parts de les banyes uterines de les femelles. Tots els teixits que tenien que ser inclosos en parafina es van fixar en formol al 4% tamponat amb 0,14 mM Na_2HPO_4 i 0,27 mM NaH_2PO_4 a pH 7,4 i es van guardar a 4°C. Després de la inclusió en parafina, es van fer talls de 3-4 μm sobre portes pre-tractats amb una solució de silane al 2% en acetona. Per desparafinar, es van banyar els talls en xilol durant 10 minuts, dues vegades. La rehidratació dels teixits es va realitzar mitjançant una gradació decreixent d'etanol: 100%, 96%, 70% i 50%.

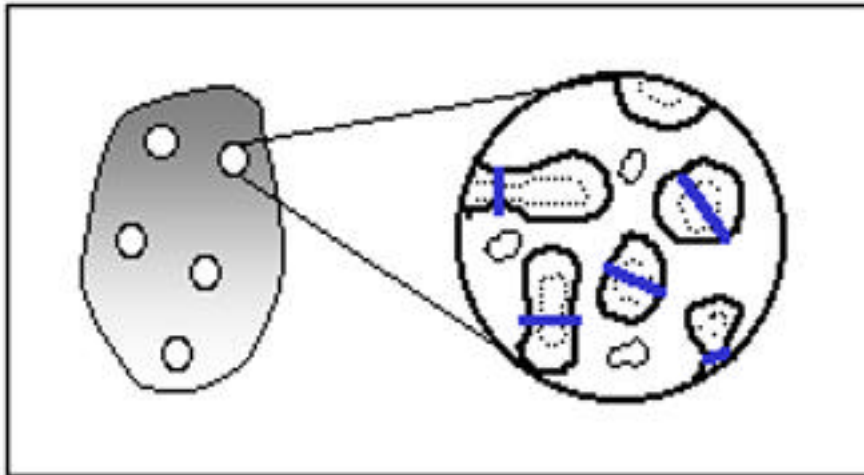
3.2.1. Anàlisi estructural

Per l'estudi estructural dels teixits es va fer una tinció d'hematoxilina en solució de Mayer i eosina (Di Fiore, 1986). Després, els teixits es van deshidratar en una gradació creixent d'etanol: 96% i 100%, acabant amb dos banys en xilol durant 10 minuts. Per la seva conservació, les mostres es van muntar amb un medi permanent compost per isòmers de xilane i per ftalat de dietihexilè (Adh CLINIC ; CLINIC SERVICES).

Les mostres es van observar amb un microscopi OLYMPUS , model BX50; i les fotografies es van fer amb una càmera fotogràfica OLYMPUS C-35AD-4.

3.2.2. Anàlisi morfomètric

La mesura morfomètrica es va realitzar sobre 5 àrees diferents de talls testiculars tenyits amb hematoxilina i eosina par cada animal, seguint la metodologia descrita per Anderson i Thliveris (1986). En total es van mesurar uns 250-300 túbuls seminífers per animal, mesurant-ne sempre el diàmetre més curt (Figura 23). Es va utilitzar un microscopi Nikon Eclipse E800 acoblat a una càmera digital SONY 3CCD . El sistema informàtic *analySIS 2.1 de Soft Imaging System GmbH* va ser utilitzat per mesurar els diàmetres i àrees. Els càlculs estadístics es van realitzar amb l'analitzador de dades Microsoft® Excel 97 SR-1.



3.3. Tinció d'àcid periòdic de Schiff

Per l'estudi de la presència de glicogen en els teixits estudiats es va realitzar la tinció d'àcid periòdic de Schiff (PAS; Inaba *et al*, 1998). Dins d'aquesta tinció, es va realitzar un tractament amb α -amiloglicosidasa per diferenciar entre el marcatge de glicogen del de glicoproteïnes. Els talls de les mostres es van desparafinar amb dos canvis de xilol de 10 minuts cada un. La hidratació dels teixits es va realitzar amb una gradació decreixent d'etanol de 100°, 96°, 70°, i 50°, on les mostres van estar submergides 5 minuts en cada alcohol. Seguidament es van rentar les mostres en aigua corrent. Tot seguit es va realitzar la incubació durant tota la nit a 37 °C en cambra humida d' α -amiloglicosidasa 0,5 mg/mL en acetat sòdic 0,4 M a pH 4,8. Després d'un rentat amb aigua es van tractar les mostres amb una solució d'àcid periòdic al 5% durant 10 minuts. Passat aquest temps es van rentar tres vegades durant 1 minut amb aigua. A continuació es va aplicar el reactiu de *Schiff* (SIGMA) durant 4 minuts a temperatura ambient. Les restes del colorant es van rentar amb aigua corrent durant 10 minuts. La tinció de contrast es va realitzar amb hematoxilina durant un minut i mig. Seguidament, les mostres van ser rentades, deshidratades i muntades com es va realitzar en la tinció d'hematoxilina i eosina.

3.4. Microscopia electrònica de transmissió

Rera el sacrifici i dissecció de l'animal es va procedir a tallar una part del testicle i l'epidídim dels mascles i una part de l'ovari i de les banyes uterines de les femelles. Els talls es van fixar amb glutaraldehyd al 2,5 % en tampó cacodilat sòdic 0,1 M, pH 7,4, durant 2 hores a 4°C. Les mostres es van tenyir amb OsO₄ al 1 % en tampó cacodilat sòdic 0,1 M, pH 7,4, 2 hores a 4°C. Un cop tractades les mostres es va incloure en Resina Spurr (25% de diòxid de vinilciclohexè, 15% de diglicidil èter de polipropilen glicol, 55% de anhidride nonenil succínic, 2% de dimetilaminoetanol i 3% phtalat de dibutil; Spurr, 1969) i els talls es dipositaren sobre reixetes de níquel. L'observació es va realitzar amb un microscopi Hitachi H-7000 del Servei de Microscopia Electrònica de la U.A.B.

3.5. Determinacions d'hormones sèriques

La sang dels animals es va recollir immediatament rera el sacrifici directament del coll. Les mostres es van deixar coagular a 4°C durant 5 hores. Després es va centrifugar a 1300 *xg* durant 10 minuts per separar el sèrum. El sèrum es va guardar a -20°C fins el seu anàlisi.

3.5.1. Extracció d'hormones esteroidees sèriques

Per l'anàlisi de les hormones esteroidees sèriques es va realitzar un pas previ amb èter per concentrar les mostres. El tractament s'iniciava barrejant completament 230 µl de sèrum amb 1 mL de dietilèter. Seguidament les mostres es centrifugaren durant 5 minuts a 1200 *xg* fins que les dues fases van estar clarament separades. Un cop separades les fases es van congelar els tubs a -70°C, submergint les mostres en un recipient amb alcohol de 96° al que s'hi anava afegint neu carbònica. El sobrenedant es va recollir en un altre tub es va deixar evaporar a temperatura ambient fins que quedaren uns 100 µl de mostra. Llavors s'hi van afegir 150 µl d'èter dietílic i les mostres es van posar en un bany d'ultrasons durant 10 minuts. Finalment es van deixar evaporar les mostres fins a obtenir uns 20 µl de l'extracte, guardant- a -20°C fins el seu anàlisi.

3.5.2. "Kits" de determinació d'hormones sèriques

Tots els *kits* utilitzats es basen en tècniques d'assaig immunològic per reacció enzimàtica (ELISA), i eren els següents:

	<i>nº catàleg</i>	<i>Casa comercial</i>
TESTOSTERONA	EIA-1559	DRG International, Inc
PROGESTERONA	DSL-10-3900 ACTIVE	Diagnostic Systems Laboratories, Inc
LH	RPN 2562	Amersham pharmacia biotech, Inc
FSH	RPN 2560	Amersham pharmacia biotech, Inc
INSULINA	INSKR020	CRYSTAL CHEM, Inc

En tots els casos es van seguir els protocols que recomanava cada casa comercial pel seu *kit*.

3.6. Immunohistoquímiques

Les mostres de teixit que es van utilitzar per l'estudi immunohistoquímic estaven tractades d'igual manera que per l'anàlisi estructural.

Un cop desparafinades i rehidratades les mostres, es va fer servir el "rabbit /goat/mouse Immunoperoxidase Kit" de SANTA CRUZ Biotechnology , seguint el protocol que recomanava la casa comercial (Research Applications, SANTA CRUZ Biotechnology). L'anticòs primari es va fer servir a una dilució 1/100 - 1/200 en tampó fosfat salí (PBS: 9,1 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 1,7 mM NaH₂PO₄·H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,4) amb 1,5% de sèrum d'una espècie diferent a la utilitzada per la producció de l'anticòs. La incubació amb l'anticòs primari es va fer a 4°C durant tota la nit. L'anticòs secundari anti-conill conjugat amb biotina, es va diluir amb PBS i un 1,5% de sèrum de bloqueig. En canvi, els anticòs secundaris anti-cabra i anti-ratolí es van diluir només amb PBS, per evitar la presència de marcatge inespecífic. La presència de l'anticòs es va

revelar amb una solució de 2 mM de tetrahidroclorat de diaminobenzidina (DAB) de SIGMA , en 65 mM d'imidazol a pH 7,1 i 0,12% H₂O₂ durant 15 a 20 segons. Les mostres es van contrastar amb hematoxilina, durant 1 minut. El muntatge i observació de les preparacions es va fer igual que per l'estudi histològic.

3.7. Western immuno-blotting

3.7.1. Homogenització de les mostres.

Les mostres es van obtenir immediatament rera el sacrifici. Es van tallar de 0,5 a 1 g de teixit. Totes les mostres es van congelar en nitrogen líquid, i es van conservar a -80°C.

Per l'homogenització de les mostres per estudiar amb els anticossos d'IGF-I, progesterona, GLUT 3 i EGF, es va utilitzar un tampó compost de 1 % dodecil sulfat sòdic (SDS), 1 mM Na₂VO₄ i 10 mM Tris-HCl (pH: 7,4) a una proporció de 1/5 pes/volum. Per l'estudi de la fosforilació de residus de tirosina es va utilitzar un tampó que evités fosforilacions degudes a la manipulació de les mostres. Aquest tampó estava format per 1 mM Na₂VO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₂MoO₄, 10 mM Na₄P₂O₇, 10 mM Tris-HCl (pH: 7,4), 150 mM NaCl, 1% Tritó X-100, aprotinina 1 U/ml, fluorur de fenil-metil-sulfonil (PMSF) 0,2 mM, leupeptina 1 µM i pepstatina A 1 µM a una proporció de 1/10 pes/volum. Les mostres es van homogeneïtzar en fred i seguidament es van escalfar amb microones durant 10 segons. A continuació, es van centrifugar a 12000 *xg* durant 15 minuts en fred, recollint-ne el sobrenedant. Per estudiar els receptors d'andrògens, d'estrògens, d'insulina, d'IGF-I i *c-kit* es va tamponar amb una solució d'àcid 4-[2-hidroxiètil]-1-piperazinetà-sulfònic (Hepes) 25 mM, àcid tetraamino di-acètic (EDTA) 4 mM, sacarosa 250 mM, aprotinina 1 U/mL, PMSF 0,2 mM, leupeptina 1 µM i pepstatina A 1 µM, a pH 7,4, homogeneïtzant 0,3-1 g de teixit en 8 ml de tampó i mantenint-ne la mostra en gel (Ullrich *et al*, 1986). Els homogenats es van centrifugar durant 15 minuts a 10000 *xg*. Els precipitats es van descartar i els sobrenedants es van centrifugar a 200000 *xg* durant 1,5 hores. Els precipitats es van resuspendre finalment amb 1 mL de tampó d'homogenització.

3.7.2. Electroforesi

La detecció de les proteïnes específiques mitjançant la tècnica del Western Immunoblotting es va realitzar a partir d'una electroferesi vertical en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Els gels pels receptors d'IGF-I, d'insulina, d'andrògens, d'estrògens, de progesterona, d'FSH, *c-kit* i el Glut 3 tenien un percentatge de poliacrilamida del 8%, mentre que els de l'IGF-I i residus fosforilats de tirosina tenien un 15% de poliacrilamida. Per l'electroforesi es van carregar 15 µg de proteïna. La quantitat de proteïna es va mesurar pel mètode de Bradford (Bradford, 1976). La transferència del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocel·lulosa es va realitzar a 100 V durant 30 minuts amb els gels de 8% de poliacrilamida i durant una hora amb els gels de 15% de poliacrilamida.

3.7.3. Tinció amb Blau de Coomassie

3.7.3.1. Tinció del gel

Per l'observació del patró de bandes de proteïna en els gels amb SDS dels diferents teixits es va realitzar una tinció amb Blau de Coomassie. Els gels eren del 10% de polimerització i es van carregar 15 µg de proteïna. El primer pas va consistir en un rentat del gel amb una solució al 10% d'àcid acètic i 20% d'etanol durant 15 minuts. Seguidament es va tenyir el gel amb la solució de Blau de Coomassie [50% metanol, 10% àcid acètic, 0,24% Blau de Coomassie (Bio-Rad)] durant 30 minuts. Un cop tenyit, el gel es va destenyir amb una solució al 10% d'àcid acètic fins a observar que el gel tingués la coloració adient per ser secat.

3.7.3.2. Secatge del gel

Un cop tenyit el gel, es va realitzar un equilibrat amb una solució del 20% d'etanol i 10% de glicerol durant 30 minuts. Seguidament es va embolicar el gel amb cel·lofana i es va col·locar sobre un suport de plàstic dur per poder fer pressió amb un pes. Els gels es van deixar a

temperatura ambient fins a comprovar que estiguessin completament deshidratats.

3.7.4. Tinció amb Roig de Ponceau

Per comprovar que la càrrega dels 15 µg de proteïna i la transferència eren correctes es tenyien totes les membranes un cop transferides i abans de realitzar el Western Immunoblotting. Primer es rentava la membrana amb aigua destil·lada breument. Seguidament es tenyia amb la solució de Roig de Ponceau [3% àcid triclor-acètic i 0,2% Roig de Ponceau (SIGMA)] durant un minut en agitació. Es rentava la membrana amb aigua destil·lada per treure l'excés de colorant fins a observar el patró de bandes de proteïna correctament. Acabada l'observació, es rentava la membrana completament amb la solució de PBS amb un 0,05% de poli-oxietilen-sorbitan monolaurat (Tween 20; SIGMA) fins que marxés tot el Roig de Ponceau.

3.7.5. Western Immunoblotting

La tècnica de Western Immunoblotting va ser la descrita per Burnet (1981). La membrana de nitrocel·lulosa es va bloquejar amb albúmina sèrica bovina (BSA) al 3% en PBS/Tween 20 al 0,05% durant 1 hora a temperatura ambient. Després, la membrana es va submergir en la solució de l'anticòs primari, a una dilució 1/200 (quedant a una concentració final d'1 µg/ml) en PBS/0,05% Tween 20/3% BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Acabada la incubació amb l'anticòs primari, es van fer rentats amb PBS/Tween 20, per després incubar amb l'anticòs secundari a una dilució 1/40.000 en PBS/0,05% Tween 20/3% BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es va rentar la membrana amb PBS/Tween 20 durant tota la nit a temperatura ambient. Per revelar la membrana es va utilitzar un producte quimioluminiscent d'elevada sensibilitat, el *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Mattson i Bellehumeur, 1996), de *PIERCE* . La membrana va estar en contacte amb el revelador durant 2 minuts. Immediatament es va procedir a

revelar la membrana amb exposició sobre pel·lícula fotogràfica (AGFA), de 15 segons a 1 minut.

3.7.6. Deshibridació de membranes

Les membranes de Western Blot podien ser deshibridades per a reutilitzar-les amb un altre anticòs. Per això, es rentaven amb PBS/Tween 20 durant un temps mínim de 30 minuts. Seguidament s'incubaven a 50°C durant 1 hora amb una solució 100mM de 2-mercapto-etanol, 2% SDS i 62,5 mM Tris-HCl a pH 6,7. Després es rentaven amb abundant volum de PBS/Tween 20 durant 30 minuts com a mínim. Rera això, les membranes podia tornar a emprar-se per a un nou Western Immunoblotting.

3.7.7. Relació d'anticossos

Anticòs	identificació	nº catàleg	casa comercial
Receptor d'IGF-I	IGF-IR	N-20 sc-712	Santa Cruz Biotechnology
IGF-I	IGF-I	C-20 sc7144	Santa Cruz Biotechnology
Receptor Insulina	IR	N-20 sc-710	Santa Cruz Biotechnology
SCF	SCF	G-19 sc-1303	Santa Cruz Biotechnology
<i>c-kit</i>	<i>c-kit</i>	C-19 sc-168	Santa Cruz Biotechnology
Receptor Andrògens	AR	C-19 sc-815	Santa Cruz Biotechnology
Receptor Estrògens	ER	C-314 sc-786	Santa Cruz Biotechnology
Receptor Progesterona	PR	C-20 sc-539	Santa Cruz Biotechnology

Receptor d'FSH	FSHR	N-20 sc-7798	Santa Cruz Biotechnology
Fosforilació Residus Tirosina	PY20	P11120	Transduction Laboratories
Transportador d'hexoses GLUT 3	GLUT 3	AB 1354	Chemicon International

3.8. Expressió d'ARNm

3.8.1. Extracció d'ARN

Les mostres de teixit es van congelar amb nitrogen líquid immediatament rera al sacrifici. Per la seva conservació es van guardar a -80°C . L'extracció de l'ARN es va realitzar amb *TriPure Isolation Reagent* (cat. 1667157; Roche, Inc), seguint el protocol que recomanava la casa comercial. La concentració d'ARN es va obtenir mesurant l'absorbància a una longitud d'ona () de 260 nm en cubetes de quars.

3.8.2. Sondes

Les sondes d'ARN van ser amplificades per a poder emprar-se en la resta de tècniques de biologia molecular. L'amplificació es va fer mitjançant la transcriptasa reversa de la reacció encadenada de la polimerasa (de l'anglès: RT-PCR).

3.8.2.1. RT-PCR

Per la realització de la RT-PCR es va fer servir un *kit* de Life Technologies S.A. (SUPERScript One-Step RT-PCR with PLATINUM *Taq*; cat. 10928-042). Es va seguir el protocol de la casa comercial afegint MgCl_2 a una concentració final de 2 mM. El termociclador utilitzat era el GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Inc). El programa que es va seguir va ser el següent:

- 1) Reacció de la transcriptasa inversa (RT): les mostres es van incubar amb la *Taq* ADN polimerasa a 50°C durant 30 minuts i seguidament van estar a 95°C durant 3 minuts per aturar la reacció.
 - 2) Reacció en cadena de la polimerasa (PCR): es van realitzar 40 cicles de 3 temperatures. Una desnaturalització a 95°C durant un minut i mig, seguida d'una incubació a 60°C durant un minut i mig per acabar amb una extensió d'1,5 minuts a 72°C.
 - 3) Per acabar la PCR, es va realitzar una extensió de 10 minuts a 72°C.
- Un cop acabada la PCR, les mostres es van guardar a 4°C.

3.8.2.2. Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids que es van utilitzar per la realització de la RT-PCR van ser els següents:

3.8.2.2.1. Receptor d'LH

L'oligonucleòtid de l'extrem 5' (5'-CGAGTCCCAGCTCTGAGACA-3') correspon als nucleòtids 10 a 29. L'oligonucleòtid de l'extrem 3' (5'-ACAGCGCACTGAGGAGAACT-3') correspon als nucleòtids 962 a 943. La regió que amplificarà la PCR correspondrà al domini extracel·lular del receptor (Zhang *et al*, 1994).

3.8.2.2.2. Receptor de prolactina (PRL-R)

L'oligonucleòtid de l'extrem 5' (5'-TCTTTGGAATGGGATGGCATTAGCCGCTCG-3') correspon als nucleòtids 1158 a 1187. L'oligonucleòtid de l'extrem 3' (5'-TTCAGGAACCCCAGGCTTCTCTGTCTGGTT-3') correspon als nucleòtids 1765 a 1794. La regió que amplificarà la PCR correspondrà al domini intracel·lular del receptor (Ouhtit *et al*, 1993).

3.8.2.2.3. Receptor d'FSH

L'oligonucleòtid de l'extrem 5' (5'-ATCTGGATGTCATCACTGGCT-3') correspon als nucleòtids 45 a 65. L'oligonucleòtid de l'extrem 3' (5'-

AATGCATCTGGCTTTGGTGAG-3') correspon als nucleòtids 1035 a 1055. Els oligonucleòtids es van obtenir mitjançant el programa informàtic Vector NTI , versió 5.2.1.3 (1999; InforMax, Inc) a partir de la seqüència sencera del receptor (Sprengel *et al*, 1990).

3.8.2.2.4. Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa

La glucosa 6-fosfat deshidrogenasa es va utilitzar com a control intern de la PCR, considerant que el seu nivell d'expressió no variaria significativament en els diversos grups experimentals. Aquest és un element imprescindible per la semi-quantificació dels receptors hormonals en estudi. L'oligonucleòtid de l'extrem 5' (5'-GACCTGCAGAGCTCCAATCAAC-3'). L'oligonucleòtid de l'extrem 3' (5'-CACGACCCTCAGTACCAAAGGG-3').

Per poder semi-quantificar els productes de la PCR els oligonucleòtids de l'extrem 5' dels receptors hormonals es van marcar amb FAM (Applied Biosystems, Inc). El del control intern, la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa, es va marcar amb un fluorocrom diferent, HEX (Applied Biosystems, Inc). Els oligonucleòtids de l'extrem 3', no marcats, es van obtenir de l'empresa Genset S.A.

3.8.3. Electroforesi

3.8.3.1. Electroforesi

Per analitzar el resultat de la PCR es van carregar les mostres en un gel d'agarosa a l'1% amb una concentració final de 0.5 µg/mL de bromur d'etidi. Per l'estudi de l'electroforesi es va utilitzar Gel Doc 2000 – Multi-Analyst /PC, versió 1.1 (Bio-Rad Laboratories S.A.).

3.8.3.2. RT-PCR semi-quantitativa

L'RT-PCR semi-quantitativa es va realitzar emprant 2 µL de producte de la PCR als quals es va afegir 5 µL de tampó de càrrega

(Formamida 5:1 amb 25 mM d'EDTA a pH 8 i 50 mg/mL Blau Dextrà) i 0,5 µL de marcador de pes (GeneScan 2500 ROX Size Standard; ABI PRISM, Applied Biosystems). Les mostres es van desnaturalitzar durant 2 minuts a 95°C. Seguidament es van carregar en un gel de poliacrilamida al 6% en vidres de 12 cm en el sistema d'Applied Biosystems 373 DNA Sequencer STRETCH. Els càlculs es van realitzar amb el suport informàtic GeneScan Analysis 3.1 d'Applied Biosystems.

3.8.4. Marcatge de sondes producte de PCR

El producte de la PCR de la mostra de testicle de rata sanes sense tractar (SC) es va utilitzar com a sonda per a la realització d'hibridació *in situ*. Les sondes es van purificar carregant-les en un gel d'agarosa amb bromur d'etidi per localitzar-les i seguidament es van extreure del gel mitjançant el kit comercial de la casa TaKaRa (Recochip, cod. 9039) per posteriorment purificar-les amb un kit de la casa comercial PROMEGA (Wizard PCR Preps DNA Purification System A7170), sempre seguint el protocol de la casa comercial. El marcatge amb dioxigenina-11-dUTP es va realitzar amb el *kit* DIG-Nick Translation Mix (cat. 1745816, Roche, Inc) seguint també el protocol que recomanava la casa comercial.

3.8.5. Hibridació 'in situ'

Per l'estudi mitjançant la hibridació *in situ* amb sondes de ADN producte de la PCR es van utilitzar les mostres incloses en parafina. La desparafinació i posterior rehidratació es va realitzar seguint els passos descrits en la tinció d'hematoxilina i eosina. Un cop hidratades les mostres, es van submergir en 2x solució salina de citrat sòdic (SSC) durant 15 minuts a 70°C (la solució 1x de SSC es compon de 150 mM NaCl i 15 mM citrat sòdic a pH 7,2). Seguidament es van permeabilitzar les mostres durant 20 minuts a 37°C amb 20 µg/mL de proteïnasa K en tampó TE (100 mM Tris-HCl i 50 mM EDTA, ajustat a pH 8,0). Després es van fixar amb una solució al 4% de paraformaldehid en PBS durant 10 minuts a 4°C. A continuació es van acetilar les mostres durant 10 minuts

amb una solució 0,1 M de Tri-etanolamina (TEA) amb 0.25% d'anhidric acètic. Tot seguit es van incubar amb el tampó de prehibridació (4x SSC i 50% formamida) durant un temps mínim de 10 minuts a 37°C. Es va decantar el tampó de prehibridació per col·locar sobre el portes el tampó d'hibridació (40% formamida, 10% dextrà sulfat, 4x SSC, 10 mM de 1,4-ditiothreitol (DTT), 1mg/mL t-RNA de llevat , 1mg/mL ADN d'esperma de salmó i 1x solució de Denhart [0,02% Ficoll , 0,02% polivinilpirrolidona i 10 mg/mL BSA]) amb un 0.5% del producte de marcatge de la sonda. La hibridació es va realitzar durant tota la nit a 50°C en cambra humida. La solució d'hibridació es va rentar submergint les mostres en 4x SSC durant 10 minuts a 42°C. Tot seguit es va fer un tractament amb 20 µg/mL d'RNasa A en solució de NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris i 1 mM EDTA, a pH 8,0) durant 30 minuts a 37°C. Després es van fer dos incubacions més a 65°C durant 15 minuts cada un, la primera amb 2x SSC i la segona amb 0,1x SSC. Per la detecció de la reacció es va seguir el protocol de la casa comercial del kit de detecció (DIG Nucleic Acid Detection Kit; cat. 1175041; de Roche, Inc) en el qual el substrat del revelador és el blau de 4-nitroclorur de tetrazoli (NBT). La tinció de contrast es va realitzar amb *Fast-Green* (BDH Laboratory Supplies Poole, Inc) durant 2 minuts. Pel muntatge amb medi permanent es va utilitzar un medi aquós, l'*Aquatex* (MERK). Per l'observació de les mostres es va utilitzar el mateix equipament que l'embrat per l'anàlisi morfomètric. Aquest protocol es va desenvolupar a partir de Zhang *et al*, 1995; Ouhtit *et al*, 1993, Tbakhi *et al*, 1998 i Grünwald-Janho *et al*, 1996.

3.9. Dades d'eficiència reproductiva

L'estudi del creuaments entre els diferents grups d'animals es va realitzar sota les mateixes condicions ambientals que les utilitzades pels estudis anteriors (veure punt 3.1.). Un cop passats tres mesos de tractament, totes les rates es van allotjar individualment. Els creuaments es van realitzar passant la femella a la gàbia del mascle a les 20:00 hores i se'ls separava a les 8:00 hores de l'endemà. El procés es va repetir amb la mateixa parella fins a que la femella no fos montada. El nombre màxim de tentatives de monta consecutives va ser de

8. El control de la monta es realitzava mitjançant frotis vaginal, considerant el frotis com a positiu si s'observaven espermatozoides o la presència de tap vaginal. Un mascle que no donés cap frotis positiu després de 8 montes es considerava no fecund. Després de la gestació i part es deixava reposar una setmana als animals i es realitzava una segona prova, seguint el mateix protocol. A més a més, es portava control del nombre de cries que hi havien per part.

3.10. Bioacumulació del tungstat sòdic

Per analitzar la bioacumulació del tungstat sòdic es va seguir la metodologia basada en el treball de M. Verlinden (1982). Rera el sacrifici de les cries d'uns 5 dies d'edat mitjançant CO_2 , aquestes es trituraren individualment amb tisores i es congelaren immediatament amb nitrogen líquid. Les mostres es conservaren a -80°C fins el seu anàlisi. Es va agafar 1 g aproximadament de mostra per cria, que es va dipositar en un digestor amb 3 mL d'àcid nítric pur. Les mostres es van deixar tota la nit digerint a 60°C amb refrigerants d'aire. Després, es va augmentar gradualment la temperatura fins a 120°C . En arribar a aquesta temperatura es van deixar durant una hora. En acabar la digestió es van treure els refrigerants d'aire i es va augmentar la temperatura a 140°C per evaporar les mostres fins a 1 mL aproximadament. Finalment es va afegir 1 mL d'àcid perclòric concentrat per mostra i es van deixar, com a mínim, 1 hora a 210°C amb refrigerants d'aire. Un cop finalitzat el procés de digestió, s'evaporà fins a sequedat traient els refrigerants i augmentant la temperatura gradualment (10°C cada 10 minuts).

El precipitat final, format per totes les sals inorgàniques dels teixits, es va dissoldre amb 5 mL d'àcid nítric a l'1%. Per facilitar la dissolució, es van posar les mostres 5 minuts en un bany d'ultrasons. Seguidament es van guardar a 4°C fins al seu anàlisi. La mesura del tungstat es va realitzar amb un aparell de plasma induït (Inducted Coupled Plasma, ICP; Espectròmetre d'ICP-MS Perkin-Elmer model Elan-6000) dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La corba de calibratge que es va utilitzar fou de 0.5/1, 25/2, 5/5 ppm en HNO_3 a l'1%. Els resultats s'expressen com a ng/g de teixit.

3.11. Anàlisi estadístic

Per l'anàlisi estadístic s'ha utilitzat el suport informàtic *Microsoft Excel 97 SR-1*. La presència de possibles diferències estadísticament significatives entre els paràmetres numèrics es va comprovar mitjançant la T d'Student.

3.12. Reactius

Els reactius genèrics utilitzats van ser subministrats per MERCK (Hematoxilina en solució de Mayer), SIGMA (estreptozotocina, eosina, -amiloglucosidasa, ADN d'esperma de salmó, Ficoll , polivinilpirrolidona, t-RNA de llevat i RNasa A) i BIO-RAD (SDS, poliacrilamida).