

Resultats I: MASCLES

4.1. EFECTES DE LA DIABETIS I EL TRACTAMENT AMB TUNGSTAT SÒDIC SOBRE LA FUNCIÓ REPRODUCTIVA MASCULINA

4.1.1. Paràmetres corporals i sèrics

La diabetis induïda amb estreptozotocina té un efecte directe sobre el pes corporal, causant una pèrdua de pes de 43,1 g (taula 3). Els animals DT tenen un guany de pes, però aquest es queda lluny dels valors dels animals sans (taula 3). Així mateix, el tractament amb tungstat disminueix significativament el guany de pes dels animals sans (taula 3).

En els paràmetres sèrics es pot observar com la diabetis causa una disminució de tots els paràmetres analitzats: insulina, LH, FSH i testosterona. El tractament amb tungstat recupera els valors de totes les hormones en els animals diabètics i no afecta cap valor en els animals sans (taula 3). Estudiant les correlacions entre aquests paràmetres sèrics s'han trobat correlacions significatives entre **glicèmia** i **insulinèmia** ($r=0,8454$, $p<0,001$ entre la glucosa i el logaritme de la insulina), entre **glicèmia** i **testosteronèmia** ($r=0,7969$, $p<0,001$ entre la glucosa i el logaritme de la testosterona), entre la **insulinèmia** i l'**LH** ($r=0,7728$, $p<0,001$ entre la insulinèmia i el logaritme d'**LH**) i entre els valors sèrics d'**LH** i d'**FSH** ($r=0,6618$, $p<0,005$ entre l'**LH** i el logaritme d'**FSH**).

4.1.2. Anàlisi estructural

4.1.2.1. Testicle

Els talls histològics tenyits amb hematoxilina i eosina no mostren diferències evidents entre les rates sanes controls i tractades amb tungstat (figures 24 A-D). Les rates DC tenen uns testicles lleugerament més petits que les SC. En canvi, el diàmetre dels túbuls seminífers no mostra diferències significatives (taula 4 i dades no mostrades). D'altra banda, les rates diabètiques tractades amb tungstat presenten la mateixa disminució de la mida testicular que les DC, a més d'una disminució en el diàmetre dels túbuls

	SC (n= 15)	ST (n = 15)	DC (n = 8)	DT (n = 15)
Guany de Pes Corporal (g/període de tractament)	234,1±7,5 ^a	195,2±8,6 ^b	-43,1±5,5 ^c	27,2±4,2 ^d
Glucosa sèrica (g/dL)	100,5±2,8 ^a	94,2±2,3 ^a	533,0±14,1 ^b	111,4±5,7 ^c
Insulina sèrica (nmol/mL)	1,22±0,1 ^a	1,1±0,15 ^a	0,06±0,01 ^b	0,73±0,27 ^a
FSH sèrica (ng/mL)	115,5±17,2 ^a	124,5±13,4 ^a	76,7±8,3 ^b	119,0±9,9 ^a
LH sèrica (ng/mL)	4,4±0,5 ^a	3,8±0,2 ^a	1,5±0,1 ^b	3,9±0,4 ^a
Testosterona sèrica (ng/mL)	3,3±0,2 ^a	3,8±0,3 ^a	1,4±0,1 ^b	4,1±0,3 ^a

Taula 3. Efectes del tractament amb Tungstat sobre diferents paràmetres corporal i sèrics. El guany de pes corporal està expressat com la diferència entre el pes corporal a l'inici i el final de l'experiment. Totes les dades estan expressades com mitjana±SEM. Diferents superíndexs en una fila indiquen diferències significatives (P<0.05) entre els grups. El grau de significació es va comprovar utilitzant el Test d'Students-Neumann-Keuls. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

seminífers (taula 4 i dades no mostrades). Com es pot apreciar en la taula 4, hi ha una correlació entre el diàmetre i la densitat de túbuls, ja que quant més petits són els diàmetres més túbuls s'observen per àrea estudiada. A més, en moltes zones de les DT s'observa una menor presència d'espermatozoides dins la llum dels túbuls seminífers (figures 25 A-C). En el seu lloc s'observen espermàtides secundàries, la identificació de les quals s'ha aconseguit mitjançant l'anàlisi ultraestructural (figura 30). Comparant la mida de les mateixes cèl·lules amb la resta de tractaments, no s'observen diferències significatives (dades no mostrades).

Les cèl·lules de Leydig de les rates diabètiques presenten una vacuolització del seu citoplasma (figura 24 E). Així mateix, dins l'espai intersticial dels animals diabètics s'observa una major presència de material eosinòfil. El tractament amb tungstat disminueix el seu contingut però sense arribar als nivells dels animals sans (figura 25 B).

	Diàmetre dels túbuls seminífers (μm)	Densitat (túbuls/ dm^2 teixit testicular)
SC	258,1 \pm 43,0 ^a	7,42 \pm 0,32 ^a
ST	223,85 \pm 12,5 ^a	12,55 \pm 1,67 ^b
DC	255,8 \pm 27,1 ^a	7,91 \pm 0,15 ^a
DT	92,7 \pm 36,42 ^b	36,42 \pm 17,15 ^c

Taula 4) Anàlisi morfomètric dels diàmetres i densitat dels túbuls seminífers. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.2.2. Epidídim

En l'epiteli epididimari no trobem cap diferència rellevant entre els quatre grups d'animals (figures 24 F-G, 25 D-E; i dades no mostrades). En canvi, en la llum de l'epidídim d'algunes rates diabètiques tractades amb tungstat podem veure un contingut inespecífic, de material eosinòfil, amb algunes cèl·lules gegants multinucleades i restes d'espermatozoides (figures 25 D, E). L'anàlisi morfomètric no mostra diferències significatives entre cap dels grups experimentals (dades no mostrades).

4.1.2.3. Tinció de PAS

La tinció de PAS no mostra diferències entre els quatre grups experimentals. En el testicle, el marcatge es localitza en la zona intersticial, entre les cèl·lules de Leydig i en la làmina basal dels túbuls seminífers (figura 26 A). En l'epidídim, el marcatge es localitza en l'estroma i polaritzat en la zona apical de les cèl·lules epididimàries (figures 26 E, F).

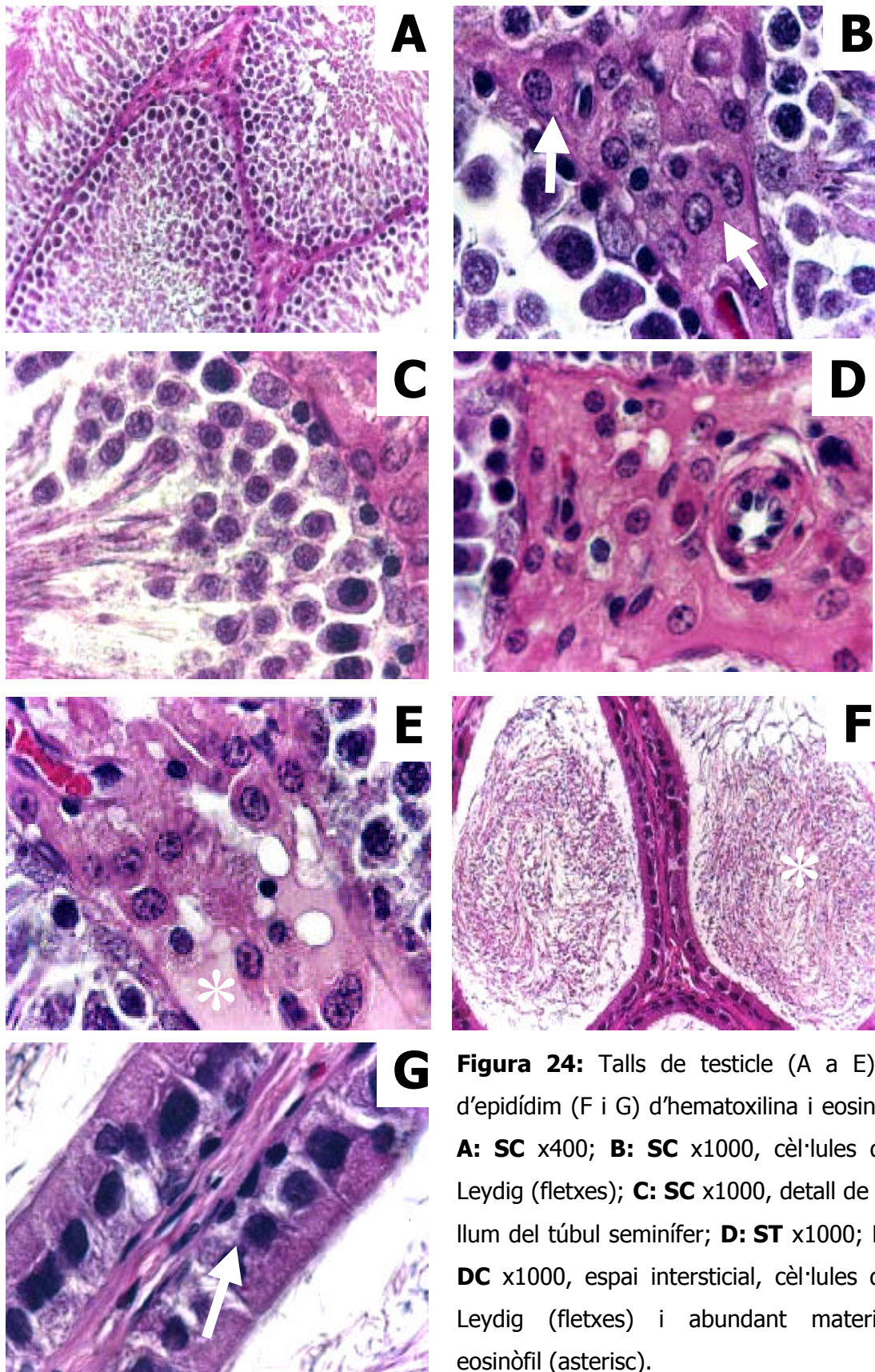


Figura 24: Talls de testicle (A a E) i d'epidídim (F i G) d'hematoxilina i eosina. **A:** SC x400; **B:** SC x1000, cèl·lules de Leydig (fletxes); **C:** SC x1000, detall de la llum del túbul seminífer; **D:** ST x1000; **E:** DC x1000, espai intersticial, cèl·lules de Leydig (fletxes) i abundant material eosinòfil (asterisc).

F: SC x400 llum dels túbuls epididimaris plens d'espermatozoides (asterisc); **G:** SC x1000 epiteli epididimari (fletxa).

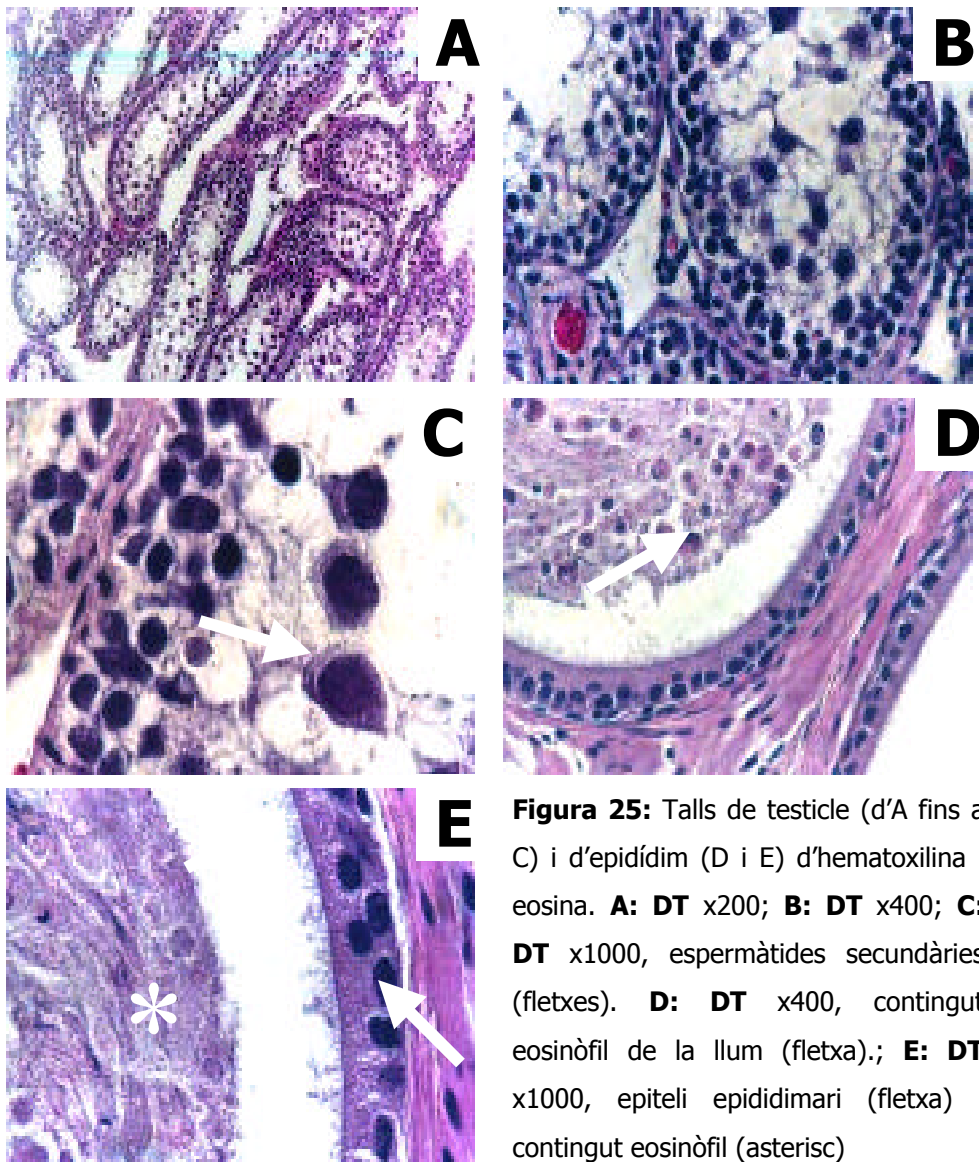


Figura 25: Talls de testicle (d'A fins a C) i d'epidídim (D i E) d'hematoxilina i eosina. **A:** DT x200; **B:** DT x400; **C:** DT x1000, espermatides secundàries (fletxes). **D:** DT x400, contingut eosinòfil de la llum (fletxa).; **E:** DT x1000, epiteli epididimari (fletxa) i contingut eosinòfil (asterisc)

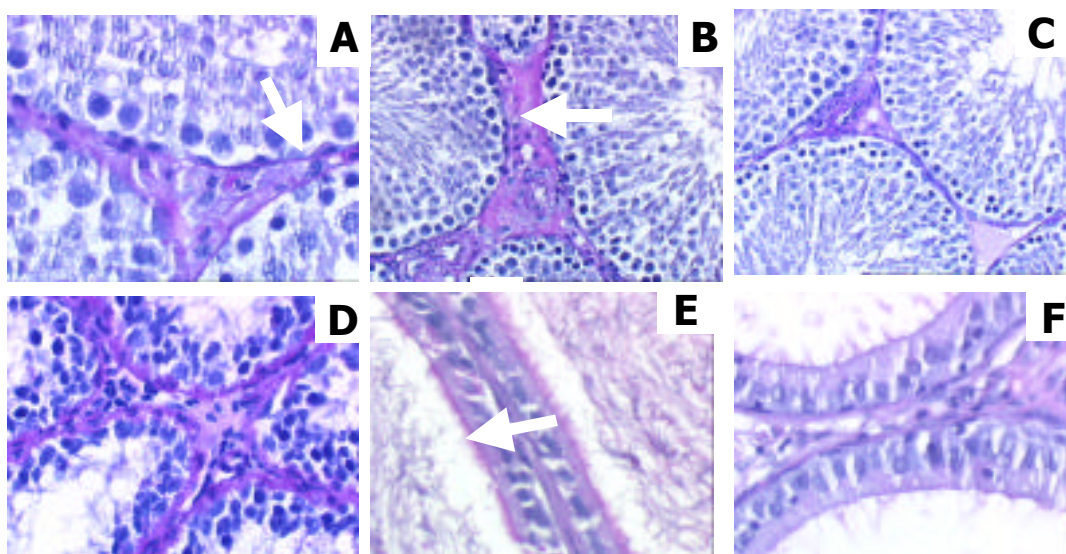


Figura 26: Tinció de PAS. **A:** Testicle SC x400, làmina basal (fletxa); **B:** Testicle ST: x400, espai intersticial (fletxa); **C:** Testicle DC x200; **D:** Testicle DT x400; **E:** Epidídim SC x400, marcatge en regió apical (fletxa); **F:** Epidídim DT x400.

4.1.3. Anàlisi ultraestructural

L'anàlisi ultraestructural mostra, a l'igual que la tinció d'hematoxilina i eosina, que no hi ha diferències significatives entre les rates sanes i les diabètiques control. En canvi, on si trobem importants diferències és en el grup de rates diabètiques tractades amb tungstat.

En els testicles de les rates sanes, tractades i controls, i les diabètiques control, trobem espermatozoides en diferents graus de formació i maduració; des de cèl·lules germinals fins espermatozoides amb cos residual, passant per espermatogònies, espermatòcits i espermatides (figures 27-30). Igualment, en l'epidídim podem observar espermatozoides madurs (figures 27-30).

Les rates diabètiques tractades amb tungstat presenten uns túbuls seminífers amb pocs espermatozoides immadurs i un domini de les espermatides secundàries (figura 30). Aquestes cèl·lules, de nucli arrodonit i molt descondensat, presenten les seues mitocondris bastant vacuolitzats i alineats al voltant de la membrana citoplasmàtica. Aquesta situació serà més o menys dominant depenent de l'individu, apareixent sectors testiculars amb espermiogènesi plenament funcional i d'altres amb espermatogènesi aturada (figura 30).

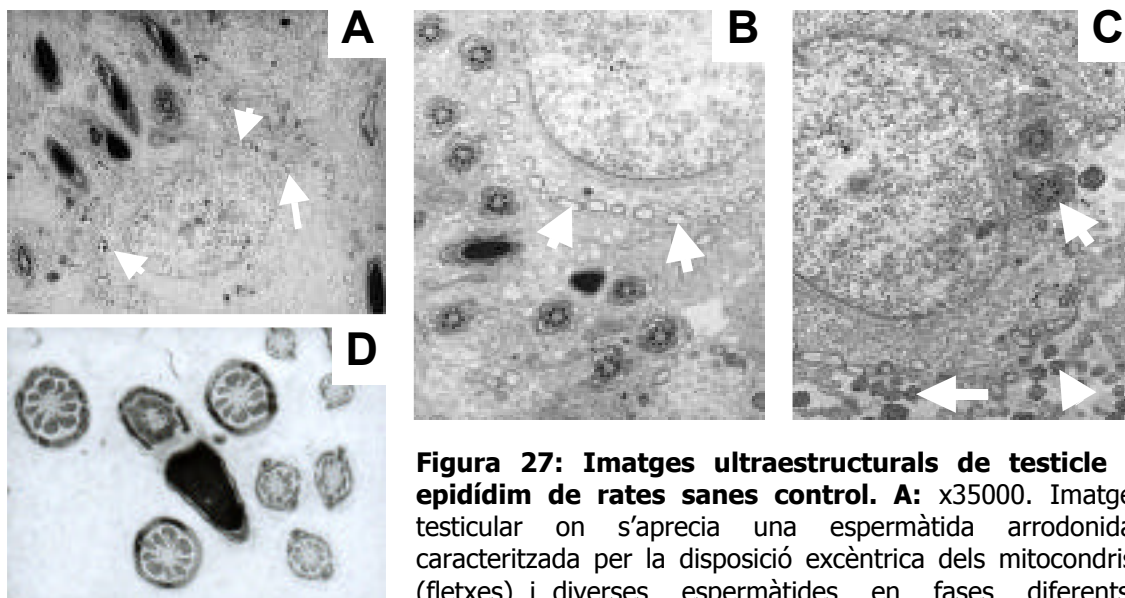


Figura 27: Imatges ultraestructurals de testicle i epidídim de rates sanes control. A: x35000. Imatge testicular on s'aprecia una espermatida arrodonida caracteritzada per la disposició excèntrica dels mitocondris (fletxes) i diverses espermatides en fases diferents d'elongació. **B:** x5000. Imatge semblant a l'anterior, on s'observa la vacuolització dels mitocondris de les espermatides arrodonides (fletxes). **C:** x5000. Epiteli testicular, amb talls d'espermatides allongades en diverses fases de maduració (fletxes) al voltant d'una espermatida. **D:** x12000. Epidídim. En la seva llum s'observen espermatozoides en diverses disposicions.

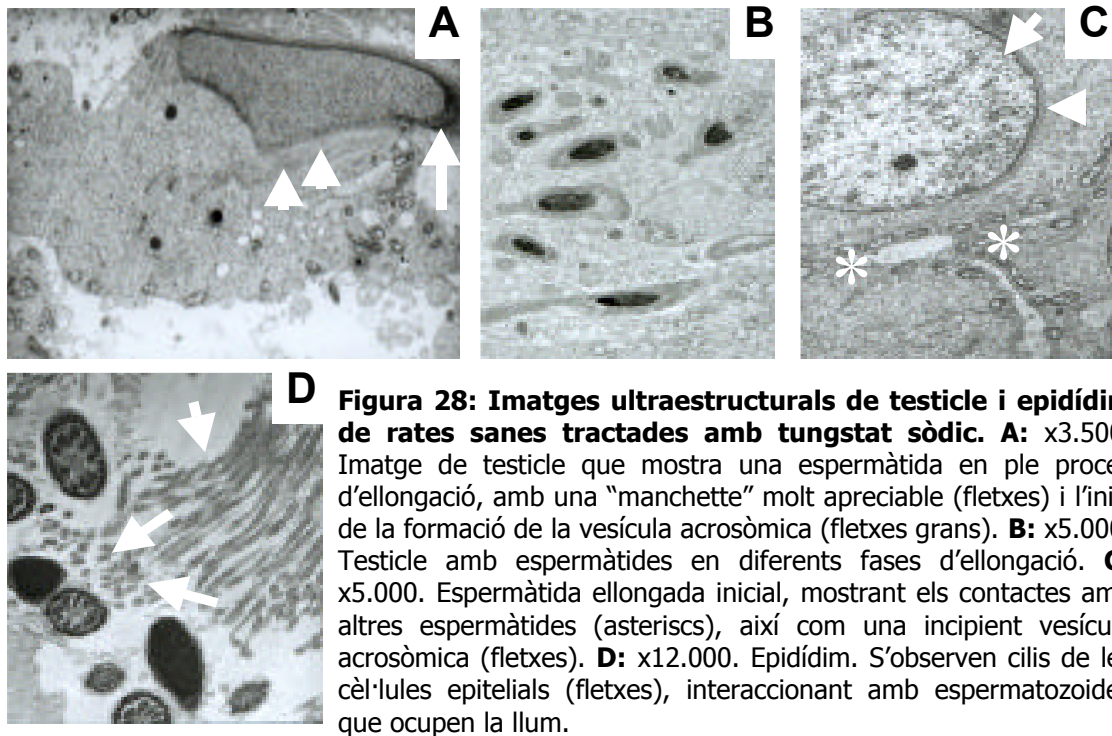


Figura 28: Imatges ultraestructurals de testicle i epidídim de rates sanes tractades amb tungstat sòdic. A: x3.500. Imatge de testicle que mostra una espermàtida en ple procés d'elongació, amb una "manchette" molt apreciable (fletxes) i l'inici de la formació de la vesícula acrosòmica (fletxes grans). **B:** x5.000. Testicle amb espermàtides en diferents fases d'elongació. **C:** x5.000. Espermàtida elongada inicial, mostrant els contactes amb altres espermàtides (asteriscs), així com una incipient vesícula acrosòmica (fletxes). **D:** x12.000. Epidídim. S'observen cilis de les cèl·lules epitelials (fletxes), interaccionant amb espermatozoides que ocupen la llum.

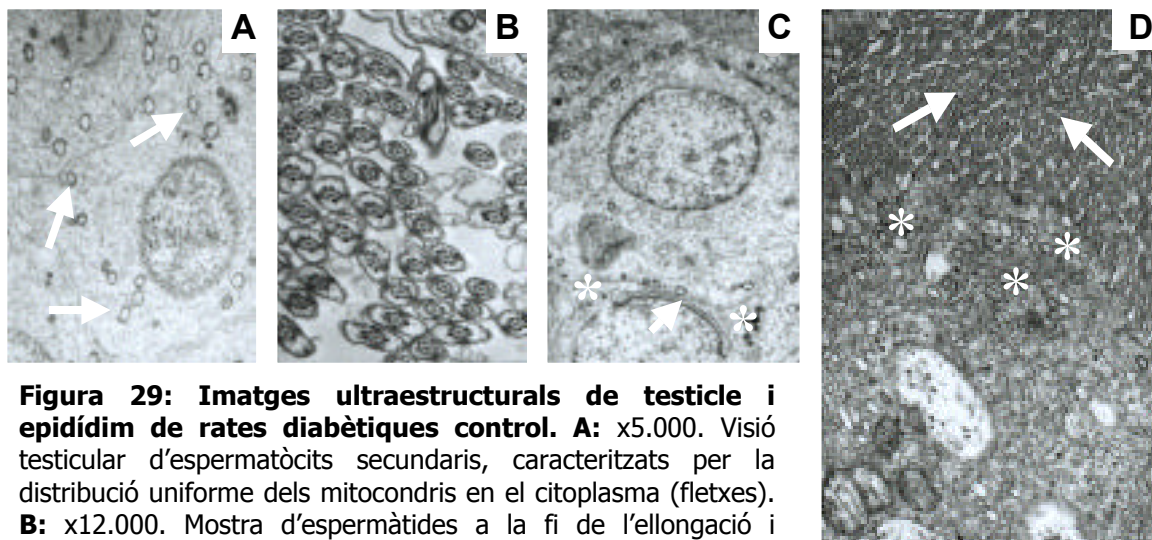


Figura 29: Imatges ultraestructurals de testicle i epidídim de rates diabètiques control. A: x5.000. Visió testicular d'espermàtòcits secundaris, caracteritzats per la distribució uniforme dels mitocondris en el citoplasma (fletxes). **B:** x12.000. Mostra d'espermàtides a la fi de l'elongació i espermatozoides immadurs vora la llum del túbul. **C:** x4.000. Espermàtides elongades, separades pel citoplasma d'una cèl·lula de Sertoli (asteriscs), i que mostren l'inici de la vesícula acrosòmica (fletxes). **D:** x10.000. Cèl·lula epitelial de l'epidídim, amb un citoplasma extremadament ric en vesícules de secreció (asteriscs). Destaquen també els nombrosos cilis (fletxes).

En l'epidídim d'aquests animals no trobem res que els diferenciï de la resta de grups, només la presència de material inespecífic en la llum de l'epidídim, però també podem trobar espermatozoides, depenent de l'animal (figura 30).

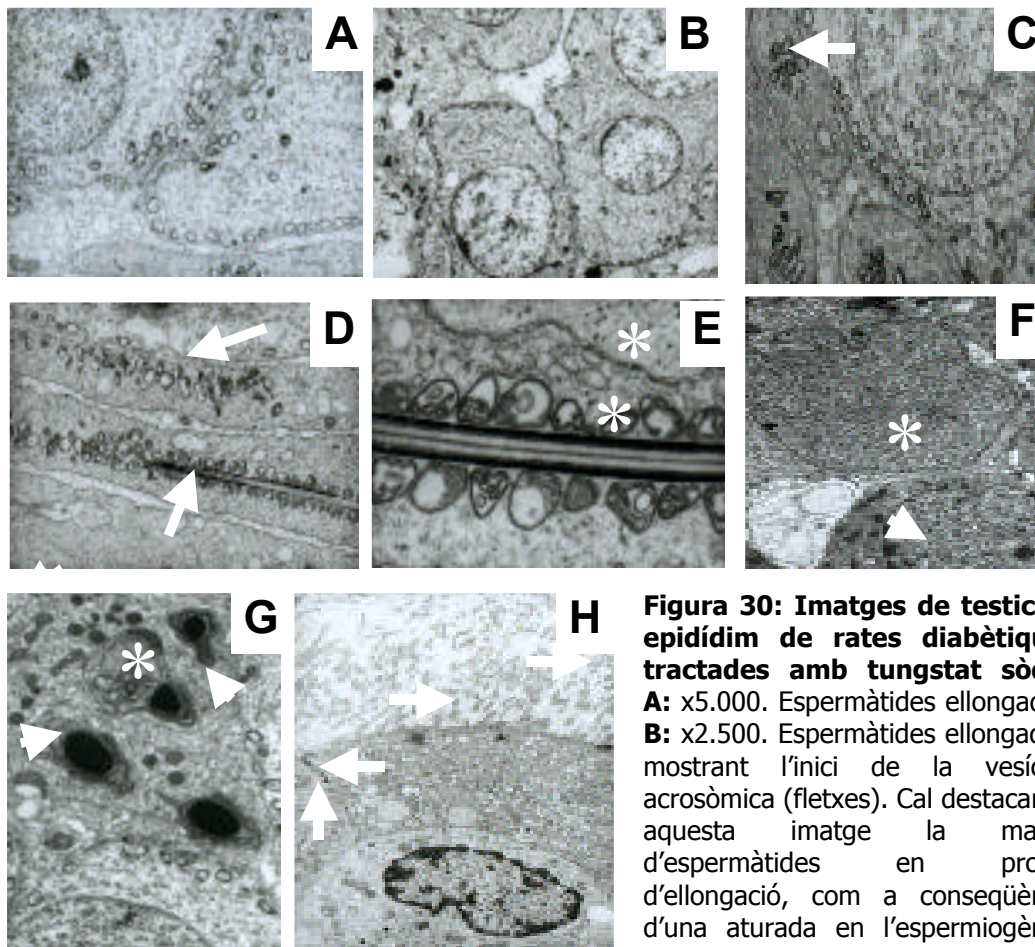


Figura 30: Imatges de testicle i epidídim de rates diabètiques tractades amb tungstat sòdic. **A:** x5.000. Espermatòides allongades. **B:** x2.500. Espermatòides allongades, mostrant l'inici de la vesícula acrosòmica (fletxes). Cal destacar en aquesta imatge la manca d'espermatòides en procés d'elongació, com a conseqüència d'una aturada en l'espermiogènesi d'aquest sector testicular.

C: x6.000. Imatge d'un altre sector testicular amb espermatogènesi no interrompuda, com mostra el començament de l'organització dels mitocondris al voltant del flagell d'espermatòides en procés d'elongació (fletxes). **D:** x5.000. Espermatòides allongades mostrant la part intermitja de la cua en formació (fletxes). **E:** x7.000. Ampliació de la imatge anterior, mostrant la vacuolització dels mitocondris i la presència de vesícules membranoses de material eliminable (asteriscs). **F:** x4.000. Cèl·lula de Sertoli, amb nucli irregular (asterisc) i espermatogònia (fletxa) del túbul seminífer. **G:** x6.000. Espermatòides en procés d'elongació, mostrant l'inici del flagell (fletxes) i de la vesícula acrosòmica (asteriscs). **H:** x4.000. Cèl·lula ciliada de l'epiteli epididimari, mostrant les unions tipus desmosoma entre les cèl·lules epitelials (fletxes). Cal destacar l'absència d'espermatozoides en la llum epididimària.

4.1.4. Patró de distribució de proteïna

L'observació del patró de distribució de proteïna de les mostres de testicle i epidídim detecta la presència d'una banda principal de proteïna de 66 kDa, la qual és més intensa en els animals tractats amb tungstat (figura 31). En l'epidídim destaquen dues bandes, una d'uns 90 kDa i l'altre d'uns 60 kDa. En aquest cas, les dues bandes són més marcades en els animals diabètics (figura 31).

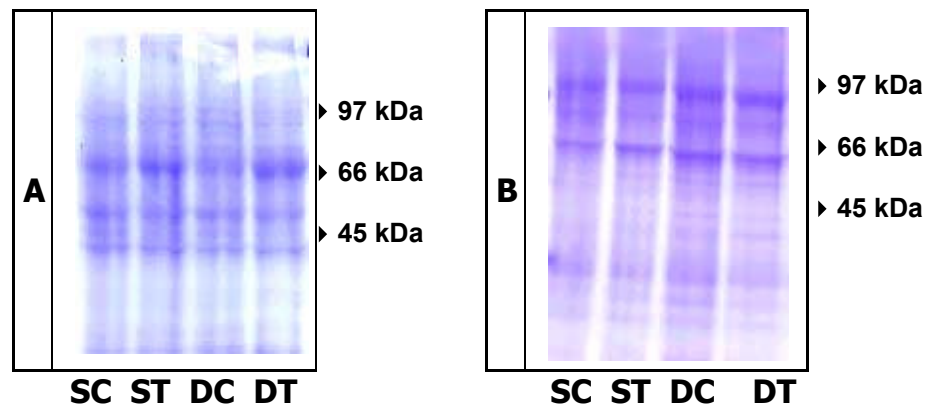


Figura 31) Patró de distribució de proteïna en testicle (A) i epidídim (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.5. Expressió del receptor d'andrògens

El Western Blot mostra dues bandes específiques de 105 kDa i de 160 kDa, les quals corresponen amb el publicat per Johnson *et al* (1987). S'aprecia un lleu augment de l'expressió en els animals diabètics respecte als sans (figura 32).

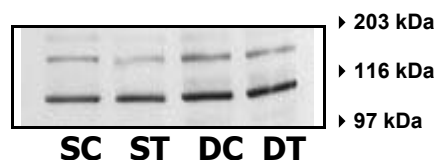


Figura 32) Western blot de l'expressió del receptor d'andrògens en testicle de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

En l'estudi immunohistoquímic del testicle de rates SC i ST observem un marcatge generalitzat en cèl·lules de Leydig, cèl·lules de Sertoli, cèl·lules peritubulars, algunes cèl·lules germinals i espermatozoides (figura 45). En les rates DC i DT, el marcatge és similar al de les sanes, però en algunes zones el marcatge a Leydig disminueix o arriba a desaparèixer (taula 5, figura 45).

L'epidídim de tots els grups presenta un marcatge similar, polaritzat en la zona apical de l'epiteli epididimari (taula 5, figura 45).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++	+++	+++
LEYDIG	+++	+++	++	++
Cèl. Germinals	+++	+++	+++	+++
EPIDÍDIM	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)

Taula 5) Nivells d'expressió del receptor d'andrògens en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.6. Expressió del receptor de progesterona

El Western Blot de testicle mostra tres bandes específiques entre 50 kDa i 70 kDa, la qual cosa concorda amb el publicat per Tai *et al* (1986). Els animals ST mostren una lleu disminució de l'expressió respecte els SC. En canvi, els animals diabètics, tant els DC com els DT, mostren un augment en l'expressió respecte els SC (figura 33). El Western Blot d'epidídim mostra uns resultats similars però restringits a una banda específica de uns 70 kDa (figura 33).

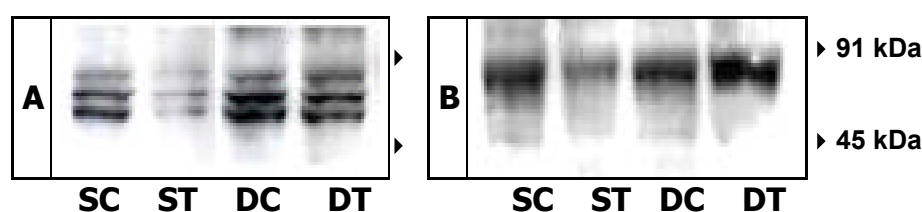


Figura 33) Expressió del receptor de progesterona en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic mostra un marcatge general suau en tots els diferents grups d'animals. Destaca el marcatge en les cèl·lules de Leydig, el qual disminueix lleugerament en els animals ST. Aquesta disminució no es apreciable en els animals diabètics. Cal destacar l'intens marcatge del material

linfoid de l'espai intersticial (Taula 6).

L'epidídim mostra un marcatge no polaritzat, no observant-se diferències entre els diferents tractaments (Taula 6).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	++	++	++	++
LEYDIG	+++	++	+++	+++
Cèl. Germinals	++	++	++	++
Espai intersticial	+++	+++	++++	++++
EPIDÍDIM	+++	+++	+++	+++

Taula 6) Nivells d'expressió del receptor de progesterona en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.7. Expressió del receptor d'FSH

El Western Blot de testicle mostra una banda específica de 90 kDa, que equival al publicat per Reichert i Dattatreymurty (1989). La diabetis causa una disminució en la intensitat de la marca respecte als animals SC. El tractament amb tungstat, en els animals diabètics, recupera la intensitat de la senyal, la qual també s'incrementa en el grup ST respecte els animals SC. En canvi, en l'epidídim, trobem igualment una banda específica de 90 kDa. S'aprecien diferències en el nivell d'expressió, sobretot en els DT on augmenta. (figura 34).

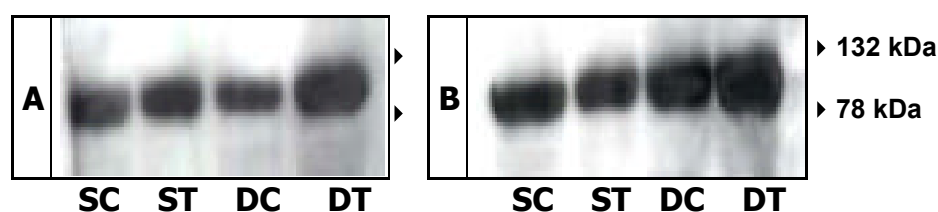


Figura 34) Expressió del receptor d'FSH en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic mostra un marcatge general suau en tots els diferents grups d'animals. Dins de la llum dels túbuls seminífers es distingeixen les cèl·lules de Sertoli amb un marcatge més intens que el de la resta de cèl·lules de dins de la llum del túbul seminífer. El marcatge de les cèl·lules de Sertoli sembla mantenir-se igual en els diferents tractaments. Destaca el marcatge en les cèl·lules de Leydig, el qual disminueix lleugerament en els animals diabètics. Cal destacar l'intens marcatge del material linfoide de l'espai intersticial. Aquest, és particularment intens en els animals diabètics tractats amb tungstat sòdic (taula 7).

L'epidídim mostra un marcatge no polaritzat, no observant-se diferències entre els diferents tractaments (taula 7).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	++	++	++	++
LEYDIG	+++	+++	++	++
Cèl. Germinals	+	+	+	+
Espai intersticial	++	++	+++	++++
EPIDÍDIM	+++	+++	+++	+++

Taula 7) Nivells d'expressió del receptor d'FSH en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi dels nivells d'ARNm del receptor d'FSH en testicle mostra un nivells similars entre els grups SC i ST. La diabetis causa una disminució aproximada del 60% en els nivells d'ARNm. El tractament amb tungstat els recupera parcialment, arribant-se a un 75%, aproximadament, dels valors normals (figura 35). En l'epidídim els grups control tenen un 20% menys d'ARNm que els animals tractats (figura 35).

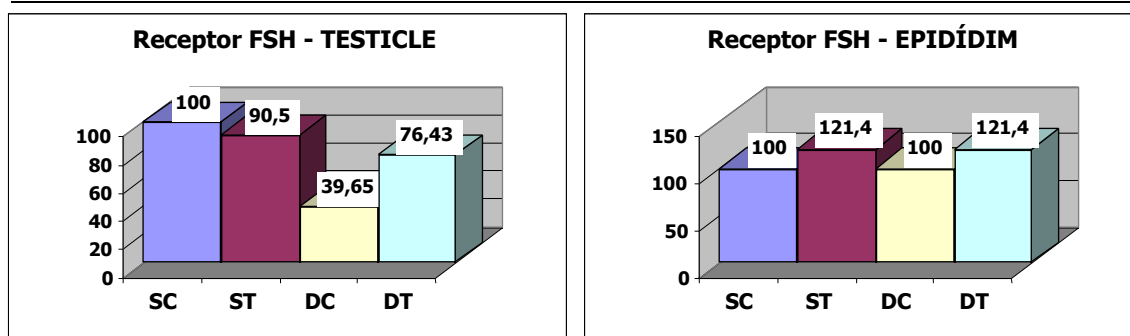


Figura 35) PCR semi-quantitativa pel receptor d'FSH en testicle i epidídim. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com el 100. La resta de grups es comparen sobre la base dels SC. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.1.8. Expressió del receptor d'LH

L'estudi dels nivells d'ARNm pel receptor d'LH en els testicles per PCR semi-quantitativa mostra una igualtat entre els animals sans i els DC. En canvi, el grup DT mostra, aproximadament, un 30% més d'expressió dels nivells d'ARNm (figura 37).

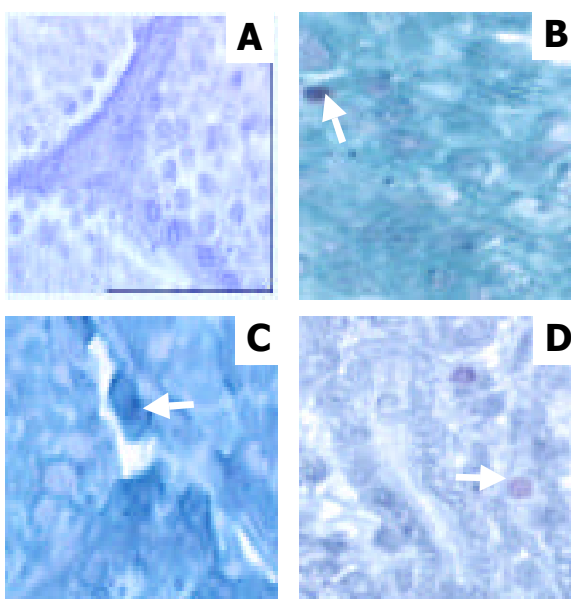


Figura 36) Hibridació *in situ* pel receptor d'LH:

A: Testicle SC control negatiu x400; **B:** Testicle SC x1000, cèl·lula de Leydig (fletxa); **C:** Testicle DC x1000, cèl·lula de Leydig (fletxa); **D:** Testicle DT x1000, cèl·lula de Leydig (fletxa).

Per ambdues figures: **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

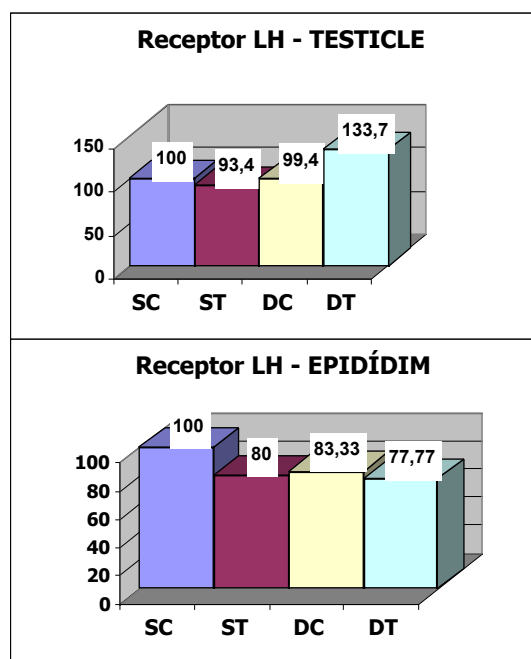


Figura 37) PCR *semi-quantitativa* pel receptor d'LH. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com a 100. La resta de grups es comparen sobre la base dels SC.

Aquest resultat es confirmaria amb l'anàlisi de la hibridació *in situ* realitzada pel mateix receptor (figura 36). En les mostres de testicle s'ha localitzat l'ARNm pel receptor d'LH en les cèl·lules de Leydig, sobretot en els animals DT (figura 36).

La PCR semi-quantitativa de mostres d'epidídim mostra una disminució de tots els grups experimentals respecte als SC. Aquesta disminució, la qual va d'un 12% fins a un 22%, és més marcada en els DT.

4.1.9. Expressió del receptor de prolactina

L'estudi dels nivells d'ARNm per PCR semi-quantitativa del receptor de PRL en testicle no mostra diferències prou significatives, ja que les variacions es mouen dins un marge d'un 15% (figura 38).

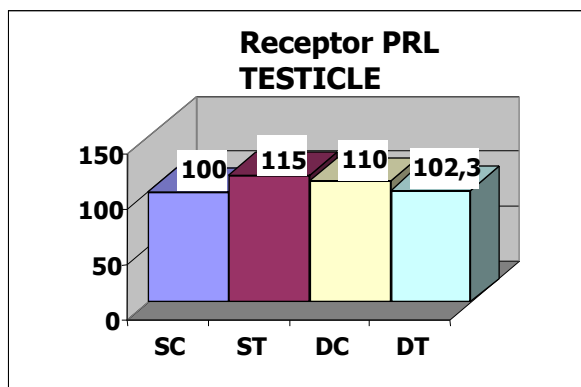


Figura 38) PCR semi-quantitativa pel receptor de PRL. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com a 100. La resta de grups es comparen sobre la base dels SC. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.1.10. Expressió del receptor d'IGF-I

El Western Blot per la subunitat del receptor d'IGF-I de testicle mostra un banda de 160 kDa, més gran que el descrit en humana per Steele-Perkins *et al* (1988), que va observar una banda de 135 kDa. S'observa una disminució en l'expressió de l'IGF-IR en la diabetes, la qual no es recupera en els animals DT (figura 39).

En el Western Blot d'epidídim no es van detectar nivells d'expressió significatius (dades no mostrades).



Figura 39) Expressió del receptor de l'IGF-I en testicles de rates. Els carrils corresponen a: **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

La immunohistoquímica del testicle de les rates sanes mostra un marcatge general molt marcat de totes les cèl·lules. Aquesta expressió generalitzada del receptor disminueix marcadament i de forma general en les rates diabètiques (taula 8; figura 46).

En l'epidídim no s'observen diferències entre diabètiques i els controls, sent-ne el marcatge fortament polaritzat (taula 9; figura 46).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++	++	++
LEYDIG	+++	+++	++	++
Cèl. Germinals	+++	+++	++	++
EPIDÍDIM	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)

Taula 8) Nivells d'expressió del receptor per a l'IGF-I en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.1.11. Nivells d'expressió d'IGF-I

El Western Blot del peptid d'IGF-I mostra una banda de pes inferior a 15 kDa, amb la mateixa expressió en els animals sans, controls i tractats. En els animals diabètics control disminueix l'expressió i el tractament amb tungstat el recupera sensiblement (figura 40).



Figura 40) Expressió de l'IGF-I en testicle de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.1.12. Expressió del receptor d'insulina

El Western Blot de testicle ens mostra dues bandes clarament separades d'uns 105 i 160 kDa, tot i que l'anticòs només reconeix la subunitat , segons la casa comercial, podrien correspondre a les bandes de 95 kDa i 135 kDa d'ambdues subunitats, descrites per Nemenoff *et al* (1984). En les rates tractades amb tungstat, tant sanes com diabètiques, s'aprecia un lleuger augment de l'expressió d'aquestes bandes respecte els respectius controls (figura 41). En el Western Blot d'epidídim no es van detectar nivells d'expressió significatius.

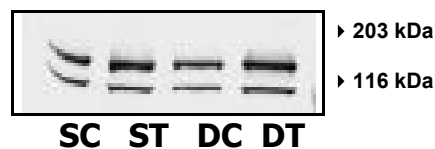


Figura 41) Expressió del receptor d'insulina en testicle de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic no mostra grans diferències entre els tractaments. En el testicle de rates SC i ST, les cèl·lules de dins la llum dels túbuls seminífers tenen un marcatge intens, ressaltant les cèl·lules germinals, de nucli molt rodó i fortament tenyit de blau que destaca dins d'un citoplasma molt marcat pel DAB (figura 48). Aquest contrast no és tant evident en la resta de cèl·lules del túbul seminífer, i tampoc el trobem en les rates diabètiques (figura 48). El marcatge en les rates DC sembla tenir una menor expressió respecte a la resta de tractaments (figura 48; taula 9).

En l'epidídim trobem un marcatge homogeni dèbil en tots els talls, tant en rates sanes com en les diabètiques (dades no mostrades). No trobem polarització del senyal, i, comparant amb les immunohistoquímiques d'altres anticossos, el marcatge és més suau. (taula 9)

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	++	++	+	++
LEYDIG	++	++	+	++
Cèl. Germinals	+++	+++	+	++
EPIDÍDIM	+	+	+	+

Taula 9) Nivells d'expressió del receptor per a la insulina en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.13. Nivell de fosforilació en residus de tirosines

El Western Blot de testicle ens presenta un patró de bandes característic i similar en tots els grups, amb una banda majoritària d'uns 55 kDa. En els ST i DT hi han una major expressió de la banda de 55 kDa. En l'epidídim s'observa un patró de bandes similar, si bé, en aquest teixit la banda majoritària és d'uns 80 kDa. En aquest cas només s'observa un augment de l'expressió en els animals DT (figura 42).

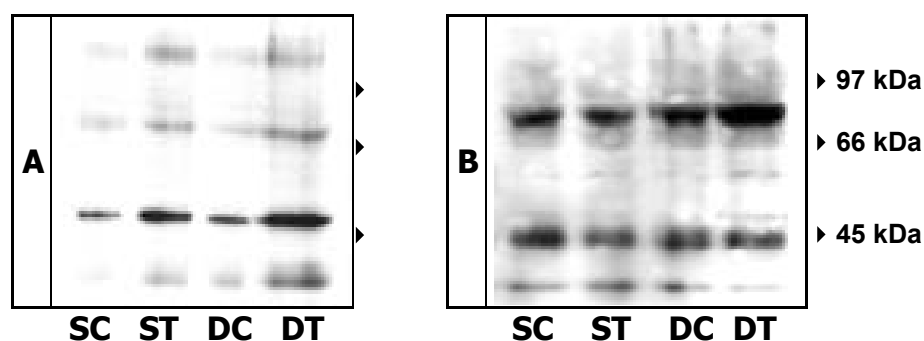


Figura 42) Expressió de la fosforilació en els residus de tirosines en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

En les immunohistoquímiques de les rates SC i ST apareix un marcatge generalitzat dels diferents tipus cel·lulars del testicle, però en les rates diabètiques el marcatge de Leydig pràcticament desapareix, mantenint-se la resta de senyal (taula 10; figura 47). En l'epidídim no hi ha diferències en el marcatge polaritzat de les cèl·lules de l'epiteli epididimari dels quatre grups

d'animals (taula 10; dades no mostrades).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++	+++	+++
LEYDIG	+++	+++	-	-
Cèl. Germinals	+++	+++	+++	+++
EPIDÍDIM	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)

Taula 10) Nivells d'expressió de la fosforilació en els residus de tirosines en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica.

SC: rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.1.14. Nivells d'expressió del *c-kit* /SCF

4.1.14.1. Nivells d'expressió del SCF

El Western Blot va donar com a resultat una banda específica d'uns 50 kDa molt dèbil en tots els animals, la qual, si bé no va ser suficientment clara com per a esbrinar possibles canvis entre els grups d'animals, si va ser prou intensa per a garantir la bondat de l'anticòs emprat (dades no mostrades), ja que el seu pes molecular és similar al mostrat per Sandlow *et al* (1997).

En la immunohistoquímica, els testicles dels grups SC i ST mostra un marcatge generalitzat. En l'epidídim, el marcatge de l'epiteli epididimari no està polaritzat, marcant-se també els espermatozoides i el múscul (taula 11 i dades no mostrades).

En els testicles dels grups DC i DT les cèl·lules de Leydig perden molt marcatge respecte als grups SC i ST, mestres la resta de cèl·lules no mostren canvis respecte als animals sans (taula 11 i dades no mostrades). No s'observen canvis significatius en l'expressió del SCF en l'epidídim dels grups DC i DT (taula 11 i dades no mostrades).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++	+++	+++
LEYDIG	+++	+++	+	+
Cèl. Germinals	+++	+++	+++	+++
EPIDÍDIM	+++	+++	+++	+++

Taula 11) Nivells d'expressió del SCF en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.1.14.2. Nivells d'expressió del *c-kit*

El Western Blot, tant en testicle com en epidídim, mostra un banda de 100 kDa, que coincideix amb els estudis publicats per Sandlow *et al* (1997) i Dym *et al* (1995). En el testicle i en l'epidídim, aquesta banda és més intensa en els animals SC i DC. Al determinar el nivell de fosforilació en residus de tirosina específic de *c-kit* s'observa el nivell de fosforilació de *c-kit* és més alt en el grup d'animals DC (figura 43). En l'epidídim la banda no és suficientment intensa per poder-se apreciar (figura 43).

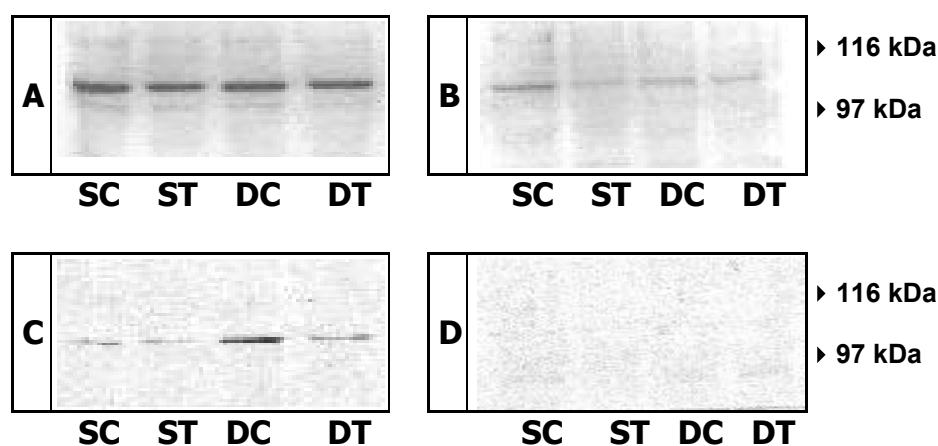


Figura 43) Expressió del *c-kit* en testicle (A) i epidídim (B) i l'expressió de la fosforilació en els residus de tirosines de *c-kit* en testicle (C) i epidídim (D). **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic mostra un marcatge general en els grups d'animals sans. On s'observen diferències importants és en les rates diabètiques, on apareix marcatge no generalitzat, concentrat en cèl·lules germinals aïllades (taula 12).

En l'epidídim hi ha polarització apical del marcatge, sense observar-se diferències entre tots 4 grups experimentals (taula 12).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++		
LEYDIG	+++	+++		
Cèl. Germinals	+++	+++		
EPIDÍDIM	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)

Taula 12) Nivells d'expressió del receptor *c-kit* en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*. canvi en el patró de marcatge.

4.1.15. Glut 3

El Western Blot mostra una banda específica d'uns 45 kDa, la qual correspond al publicat per Haber *et al* (1993) i Burant i Davdson (1994). No s'observen diferències significatives en la presència de Glut 3 entre grups (figura 44).

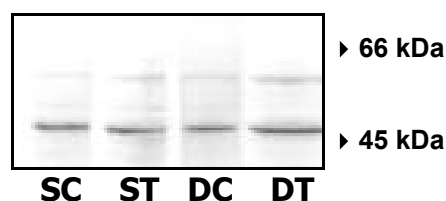


Figura 44) Expressió del transportador d'hexoses Glut 3 en testicle de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

En l'estudi immunohistoquímic, les rates sanes presenten un marcatge generalitzat, destacant el marcatge en les cèl·lules de Leydig. En les rates diabètiques, tant en les tractades com en les control, es perd el marcatge de les cèl·lules de Leydig, però es manté la resta del marcatge (taula 13).

En l'epidídim hi ha polarització apical del marcatge en les cèl·lules de l'epiteli, sense observar-se diferències entre els grups experimentals (taula 13).

	SC	ST	DC	DT
SERTOLI	+++	+++	+++	+++
LEYDIG	+++	+++	-	-
Cèl. Germinals	+++	+++	+++	+++
EPIDÍDIM	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)	+++ (polaritzat)

Taula 13) Nivells d'expressió del transportador d'hexoses Glut 3 en testicle i epidídim de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímic. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

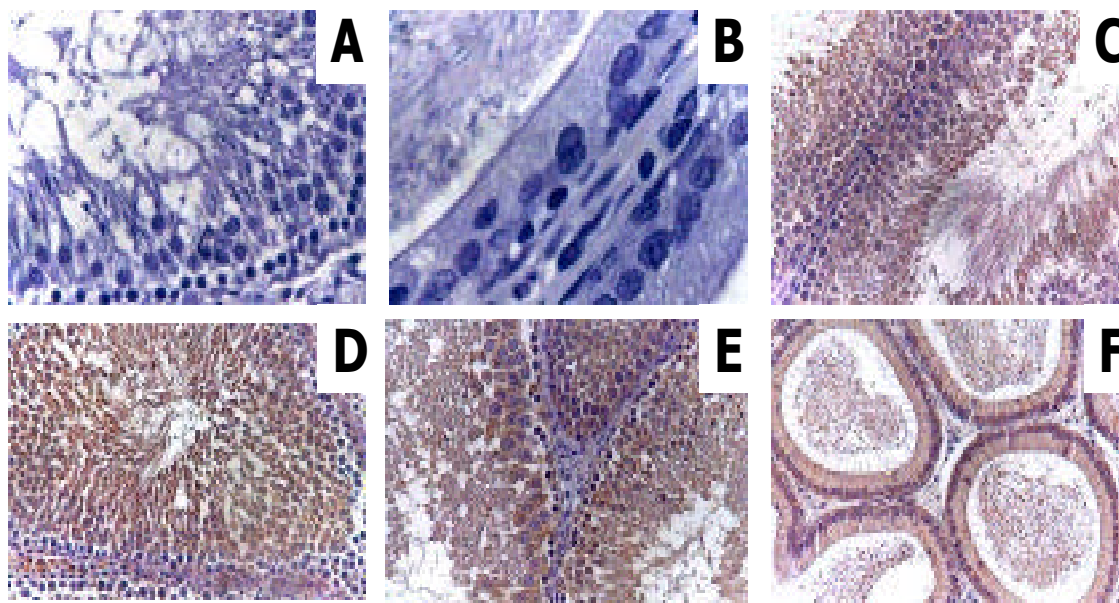


Figura 45) Immunohistoquímica per al receptor d'andrògens: **A: Testicle SC control negatiu** x400; **B: Epidídim SC control negatiu** x1000; **C: Testicle SC** x400, el marcatge és similar a l'observat en les immunohistoquímiques per als SCF, fosforilació en residus de tirosines i IR de SC i ST; **D: Testicle ST** x400; **E: Testicle DC** x400, l'espai intersticial, incloent-ne les cèl·lules de Leydig, perd el marcatge específic (fletxa); **F: Epidídim SC** x400.

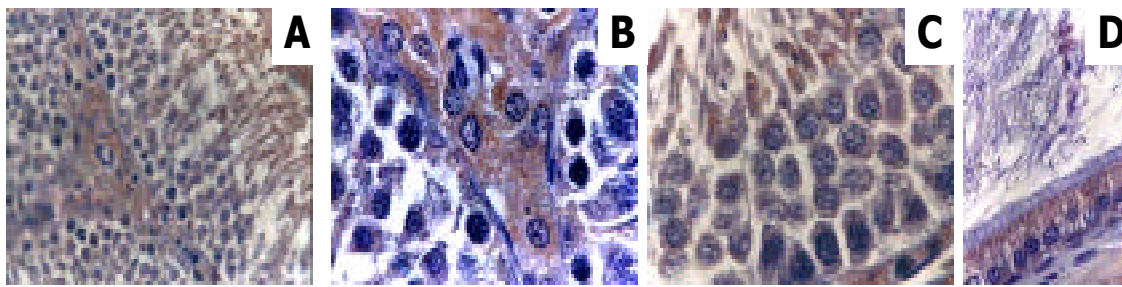


Figura 46) Immunohistoquímica per l'IGF-IR: A: Testicle SC x400, el marcatge es similar en els animals ST; B: Testicle SC x1000. C: Testicle SC x1000; D: Epidídim SC x1000.

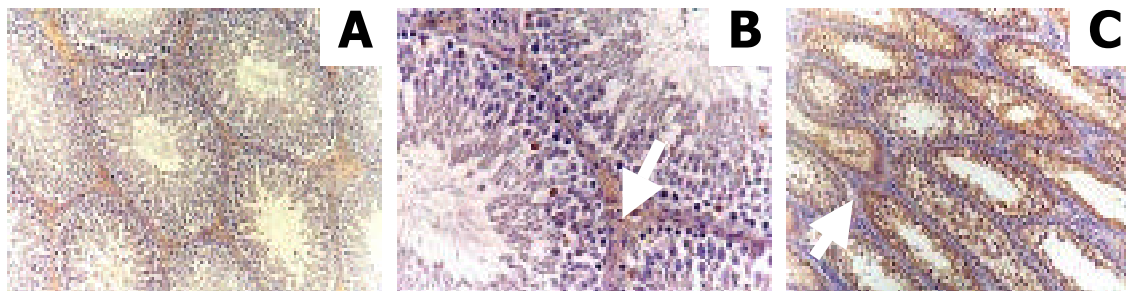


Figura 47) Immunohistoquímica pels nivells de fosforilació en tirosines: A: Testicle SC x200, el marcatge es similar en els animals ST; B: Testicle SC x400, marcatge visible en tots els tipus cel·lulars, destacant el d'algunes cèl·lules germinals i de les cèl·lules de Leydig (fletxa). C: Testicle DT x200, el marcatge es manté exceptuant en la zona intersticial, on sobretot les cèl·lules de Leydig el perden el marcatge (fletxa); D: Testicle DT x400, les cèl·lules de la llum del túbul seminífer mantenen el seu marcatge (fletxa).

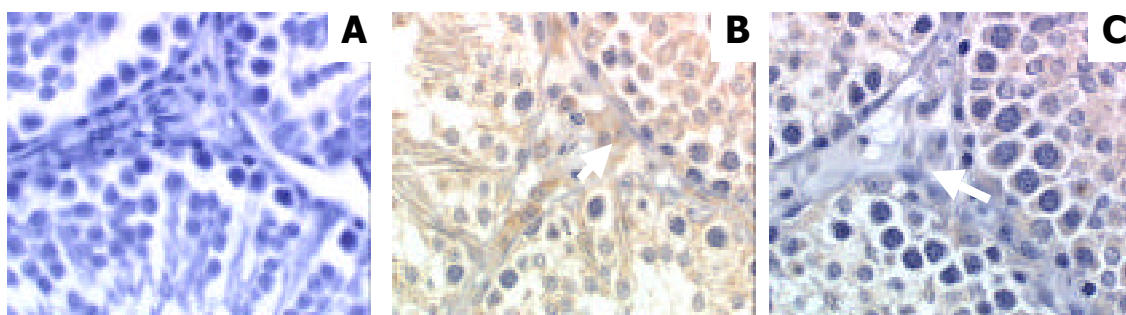


Figura 48) Immunohistoquímica pel receptor d'insulina: A: Testicle control negatiu SC x400; B: Testicle SC x400. C: Testicle DC x400, disminució del marcatge de les cèl·lules de Leydig (fletxa); D: Testicle DT x400, recuperació del marcatge en les cèl·lules de Leydig (fletxa).