

## ***Introducció***

---

Aquest treball s'emmarca dins de l'estudi sobre l'ús del tungstat de sodi com a agent antidiabètic. Dins de l'extens camp de la teràpia antidiabètica s'han estudiat diferents compostos inorgànics com a agents mimetitzadors de l'acció de la insulina; tal i com els derivats del seleni (Becker *et al*, 1996), del molibdat (Özcelikay *et al*, 1996), del vanadi (Heyliger *et al*, 1985; Cros *et al*, 1992) i del tungstè (Barberà *et al*, 1993). Tots aquests estudis analitzen la capacitat normoglicemiant d'aquests composts, així com els possibles efectes no desitjats que es puguin derivar del tractament. En aquest sentit, l'estudi de la funcionalitat reproductiva és important, car l'aparell reproductor, tant masculí com femení, es mostra molt sensible a les agressions, especialment en el cas de que aquestes tinguin una durada llarga. Tenint en compte aquesta indicació, 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 diabetis. Endemés, l'estudi d'animals sans tractats durant tres mesos amb tungstat sòdic ens ha permès estudiar si aquesta substància és capaç d'alterar la funció reproductiva "*per se*".

Per a la valoració de la funció reproductiva s'ha realitzat un estudi morfològic alhora d'un estudi funcional amb marcadors bioquímics i de biologia cel·lular. La valoració morfològica s'ha realitzat mitjançant observacions amb microscopia òptica de talls de testicle, epidídim, ovaris i banyes uterines tenyits amb hematoxilina i eosina, i per aprofundir l'estudi s'ha procedit a l'observació ultraestructural per mitjà de microscopia electrònica de transmissió. L'estudi bioquímic i de biologia cel·lular s'ha fonamentat en tres tipus de proves: les immunohistoquímiques, el "*western immuno-blotting*", la prova de la transcriptasa inversa acoblada a la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) i la hibridació *in situ*.

## **1.1. La diabetis**

### **1.1.1. Definició:**

L'Organització Mundial de la Salut (**OMS**) defineix la diabetis mellitus com *una malaltia crònica causada per una deficiència hereditària i/o adquirida*

*de la producció d'insulina per part del pàncreas, o per ineficàcia de la insulina produïda. Com a resultat d'aquesta deficiència augmenten les concentracions de glucosa en sang, així mateix causa lesions en molts sistemes de l'organisme, en especial, vasos sanguinis i nervis.*

Per estudiar la diabetis s'ha de mirar cap al pàncreas; un òrgan compost per cèl·lules exocrines ( 98%) i cèl·lules endocrines ( 2%). Els illots de Langerhans formen el teixit endocrí que es troba dispers pel pàncreas exocrí. Els diferents tipus cel·lulars majoritaris amb els seus principals productes de secreció són:

<i>cèl·lules <math>\beta</math></i>	insulina
<i>cèl·lules <math>\alpha</math></i>	glucagó
<i>cèl·lules <math>\delta</math></i>	somatostatina
<i>cèl·lules PP</i>	polipèptid pancreàtic

La glucosa estimula a les cèl·lules del pàncreas perquè secretin insulina, la qual promou la captura i emmagatzement de la glucosa en diversos teixits. Així, en nombroses ocasions, la hiperglucèmia es deguda a una deficiència d'insulina en sang, i la hipoglucèmia es deguda a un excés d'aquesta. La diabetis és una síndrome clínica, d'etiologia diversa, caracteritzada per una elevació anormal en els nivells de glucosa en la sang. La hiperglucèmia causa una afectació del metabolisme dels hidrats de carboni, que, de retruc acaba afectant al metabolisme de les proteïnes i dels greixos. Aquestes alteracions causaran lesions secundàries específiques en certs òrgans i teixits, que inclouen malalties micro i macrovasculars, neuropatia, nefropatia i retinopatia. Aquestes complicacions secundàries, són les més importants de cara al benestar del malalt i poden ser les causants de la mort del pacient (Rubin *et al*, 1994).

### **1.1.2. Tipus de diabetis:**

Simplificant, es poden distingir dos grans classes de diabetis: la tipus I (insulinodepenent o juvenil; IDDM; 5 a un 10% de tots els casos) i la tipus II (no insulinodepenent o d'aparició adulta; NIDDM; 90 a un 95% de tots els

casos). Les dues presenten importants complicacions secundàries a llarg termini. Esquemàticament les principals diferències entre elles es mostren en la taula 1:

<b>Tipus I (IDDM)</b>	<b>Tipus II (NIDDM)</b>
-----------------------	-------------------------

### **CARACTERÍSTIQUES CLÍNIQUES**

Edat	< 35 anys	> 35 anys
Obesitat	no	normalment
Aparició	ràpida (dies o setmanes)	lenta (mesos o anys)
Cetosi	si	no
Insulina endògena	baixa o absent	present
Insulina exògena	necessària	necessària en < 30%
Dieta	necessària	control en 30 a 50%
Anticossos contra illots	si	no

### **NOSOLOGIA MÉS PROBABLE**

Etiologia	destrucció autoimmune	resistència a la insulina
Associacions genètiques	feble	forta
Factors ambientals	virus	obesitat

### **SIMPTOMATOLOGIA**

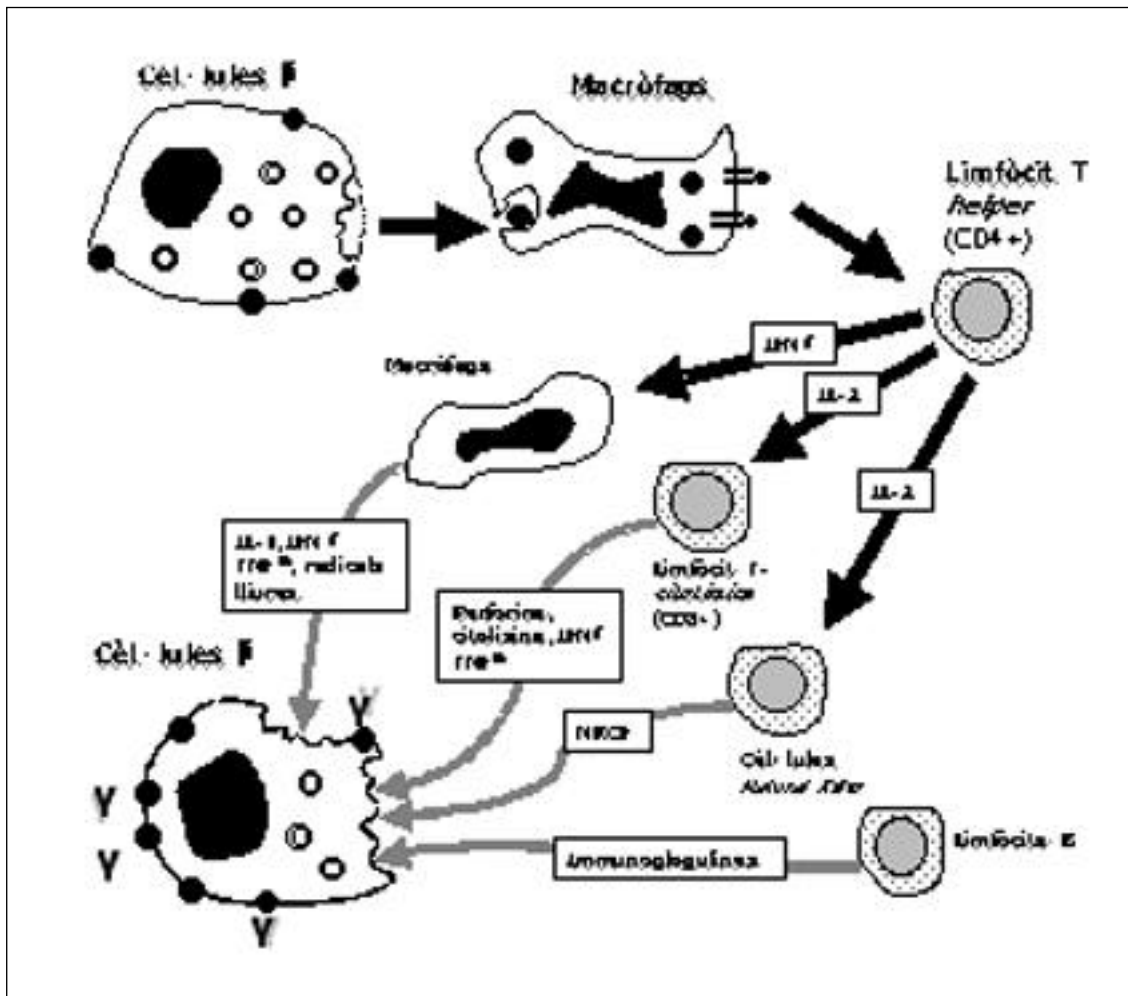
<p>poliúria, polidipsia, polifàgia, fatiga, pèrdua de pes</p>	<p>sovint asimptomàtic al principi. En estadis més avançats, similar al tipus I.</p>
---	--

**Taula 1.** Diferències entre els dos tipus de diabetis (Barberà, 98; Rodrigues *et al*, 99).

#### **1.1.2.1. Diabetis tipus I (IDDM)**

La diabetis tipus I s'associa a una pèrdua específica de les cèl·lules del pàncreas (Foulis i Stewart, 1984). La causa més acceptada avui en dia d'aquesta destrucció és un mecanisme autoimmune. Encara que no està clar

com es desencadena aquesta resposta autoimmunitària, la presència d'infiltració linfoitària en els illots i l'existència d'anticossos contra components de les cèl·lules en sang recolzen aquesta hipòtesi (Gepts, 1965). Molts autors estableixen que una infecció per certs virus (p.e. Coxsackie B<sub>4</sub>) poden desencadenar l'atac autoimmunitari contra les cèl·lules (figura 1; Yoon *et al*, 1979; Yoon, 1997).



**Figura 1)** Esquema de la hipotètica acció dels virus sobre les cèl·lules . El virus actua sobre la cèl·lula modificant els seus antígens o exposant antígens virals. Els macròfags digereixen i processen els antígens i els presenten als limfòcits T-*helpers* (CD4+). Aquests, mitjançant diferents missatgers, actuen sobre altres cèl·lules que a l'hora alliberen altres elements que actuaran sobre les cèl·lules , causant la seva destrucció (Yoon, 1997).

### **1.1.2.2. Diabetis tipus II (NIDDM)**

Aquest tipus és el més freqüent dins de la població diabètica. Entre el 60 i el 90% dels pacients de NIDDM són obesos i presenten hiperinsulinèmia i resistència a la insulina (Ekoe, 1988). La causa primària no està clara, si bé s'ha suggerit que podria relacionar-se amb una fallida de l'acció de la insulina per alteracions en la superfície o en l'interior cel·lular (disminució de l'afinitat dels receptors d'insulina; Rodrigues, 1999), amb problemes en la secreció de la insulina, o una combinació d'ambdós processos (Gepts, 1965). Però donat que una proporció important de la població obesa no és diabètica, això fa pensar que ha d'haver una important predisposició genètica que, juntament amb factors ambientals, facin que es desenvolupi la malaltia (Kahn, 1994).

### **1.1.3. Importància de la diabetis:**

Aquesta malaltia afecta tant als humans com a altres espècies. Els estudis de la *Fundación Española de la Diabetes* realitzats sobre la població espanyola ens mostra la següent situació:

S'han recollit dades de persones diabètiques conegudes i d'altres que han sigut diagnosticades al realitzar l'estudi. La relació entre diabetis coneguda i desconeguda varia entre 1/1 i 2,2/1 depenent dels grups d'edat. Això ens indica que aproximadament la meitat de les persones que pateixen diabetis ho desconeixen. La diabetis Tipus II és més freqüent en edats avançades, quan hi han antecedents familiars amb diabetis i en persones amb obesitat. Per sobre dels 70 anys la prevalença arriba fins el 25% de la població, mentre que la prevalença mitjana total (incloent les diferències entre sexes i grups d'edat) a Espanya està entre el 5.6% i el 10%. S'ha observat també que la incidència, especialment en nens de 0 a 15 anys, és molt semblant en les diferents zones estudiades.

El manteniment del registre de diabetis Tipus I ha permès detectar un augment progressiu de la incidència en els darrers anys.

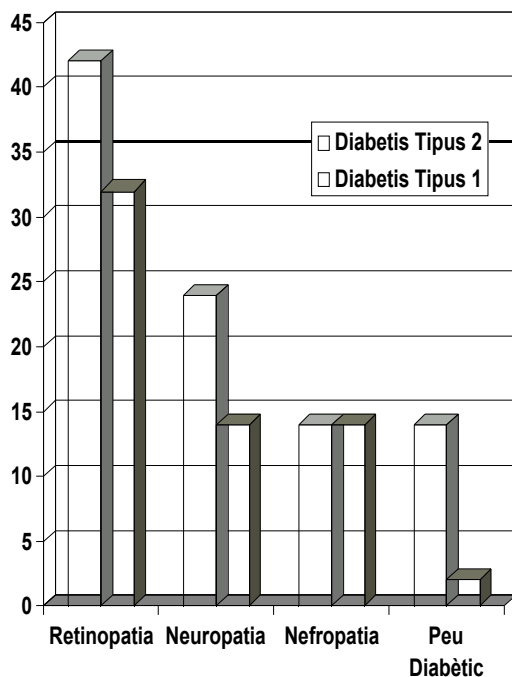
de 0 a 15 anys = 11,3 individus cada 100.000 habitants

de 15 a 29 anys = 9,9 individus cada 100.000 habitants

*Diabetis Mellitus* d'edats de 0 a 15 anys a Espanya.

Prevalença = 29.000 nens

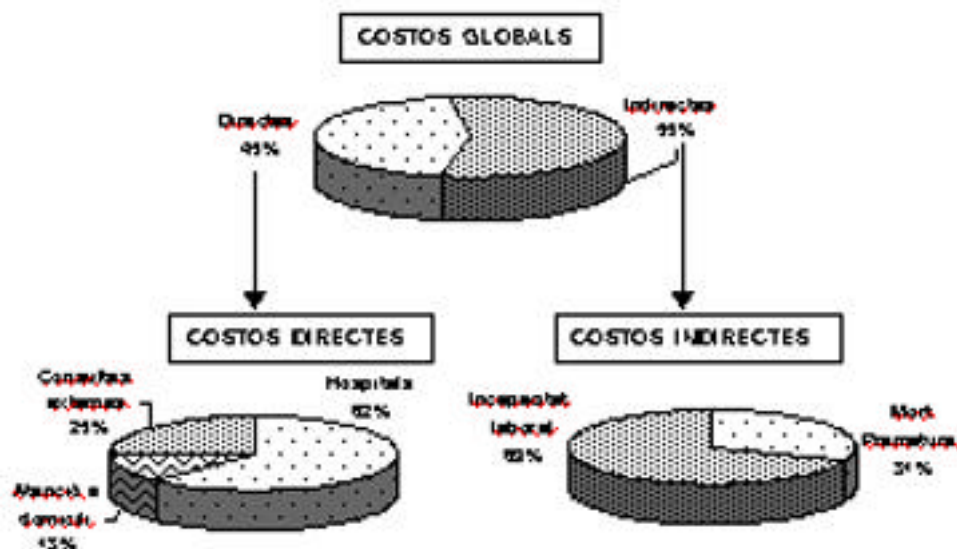
Incidència = 1.104 casos nous per any



**Figura 2)** Prevalença de les complicacions cròniques causades per la diabetis: (pel Dr. *Alberto Goday Amo*).

Un factor a tenir en compte és, a més del de la salut, l'econòmic. Tenint present que es tracta d'una malaltia crònica i que té importants efectes secundaris (figura 2), es fa palesa la seva importància personal i social familiar, sobretot tenint en compte que les previsions del mateix estudi del Dr Goday, el qual pronostica que l'evolució de la diabetis en els propers anys seria d'un augment de 100.000 nous diabètics cada 5 anys.

Segons un estudi de l'any 1998 de l'*American Diabetes Association* (ADA), es calcula que el cost global destinat per la sanitat en els EE.UU. a la diabetis durant l'any 1997 va ser de 98.2 miliards de dòlars (1.500 bilions de pessetes). Aquesta despesa global es pot dividir en costos directes i costos indirectes (figura 3).



**Figura 3)** Divisió en percentatge de les despeses econòmiques causades per la diabetis als Estats Units al 1997 (segons l'ADA).

En la figura 3 es fa evident la importància social de la diabetis. Pels estats suposa una despesa sanitària molt important, tant en atenció hospitalària (62%) com en d'altres aspectes, com les baixes laborals.

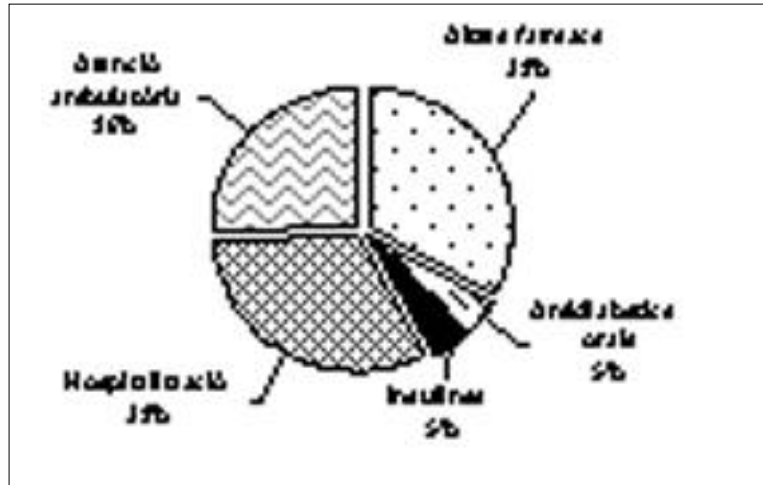
L'estudi CODE2 ha realitzat una aproximació a les despeses econòmiques directes (hospitalitzacions, consum de fàrmacs, tires reactives, etc.) a 8 països europeus, entre ells Espanya (taula 2). Tenint en compte que hi ha 1,5 milions de persones diagnosticades de diabetis Tipus II a Espanya, el cost global anual estimat s'acosta a 326.000 milions de pessetes.

	<b>Espanya</b>	<b>Europa (8 països)</b>
Cost mitjà anual per pacient diabètic	217.000 pts.	480.570 pts.
Cost mitjà anual de la població general	188.00 pts.	-
Promig sobre la despesa sanitària global	4.4%	5%

**Taula 2)** Estudi CODE2 sobre la despesa sanitària per la diabetis a 8 països europeus.



Segons el mateix estudi CODE2, obtingut de la *Fundación Española de la Diabetes*, la distribució aproximada d'aquesta despesa seria la mostrada en la figura 4.



**Figura 4)** Distribució de la despesa econòmica a Espanya segons l'estudi CODE2.

Tot això posa de manifest que la diabetis és un important problema de salut pública i, en conseqüència, un important problema econòmic.

## 1.2. Models animals diabètics

### 1.2.1. Models de diabetis tipus I

Com a models genètics d'IDDM hi ha els ratolins NOD i les rates diabètiques BB. La supervivència d'aquests animals depèn totalment de l'administració exògena d'insulina. Però el model més emprat es basa en la inducció mitjançant fàrmacs. El primer en utilitzar-se va ser l'haloxà, un anàleg cíclic de la urea, per causar un estat diabètic permanent. Però va ser substituït per l'estreptozotocina, el fàrmac més utilitzat actualment. L'estreptozotocina [2-deoxy-2-(3-metil-3-nitrosourea)1-D-glucopiranososa], és un antibiòtic d'ample espectre produït per *Streptomyces Achromogenes*. La seva estructura química inclou una molècula de glucosa i un centre actiu de nitrosourea, que li proporciona la seva toxicitat. La seva especificitat contra les cèl·lules ve donada per la seva afinitat cap al transportador de glucosa Glut 2. Però es

sospita que també actua de forma indirecta sobre aquestes cèl·lules (Rodrigues, 1999). La mort de les cèl·lules la realitza mitjançant tres mecanismes d'acció: procés de metil·lació (producció d'ions  $\text{CH}_3^+$ ), generació de radicals lliures i producció d'NO (Rodrigues, 1999). L'èxit de l'ús de l'estreptozotocina es deu a la seva elevada especificitat cap a les cèl·lules  $\beta$ , la baixa mortalitat i la llarga vida mitjana, d'uns 15 minuts, de l'estreptozotocina en el cos de l'animal (Rodrigues, 1999).

### **1.2.2. Models de diabetis tipus II**

Els models genètics de NIDDM generen un estat diabètic degut a mutacions espontànies o obtingudes per enginyeria genètica. Alguns exemples són: ratolins db/db, ratolins ob/ob, ratolins KK, ratolins NZO i rates fa/fa Zucker. També es pot induir químicament una NIDDM mitjançant fàrmacs, com per exemple l'estreptozotocina. Amb una sola injecció i.v. de 40 ó 50 mg/kg a rates Wistar als dos dies de vida s'aconsegueix una diabetis tipus II. L'efecte de l'estreptozotocina s'aconsegueix entre les 6 i 15 setmanes d'edat degut a una disfunció de la capacitat secretora de les cèl·lules  $\beta$  (Rodrigues, 1999).

### **1.3. Les sals inorgàniques com a agents antidiabètics orals**

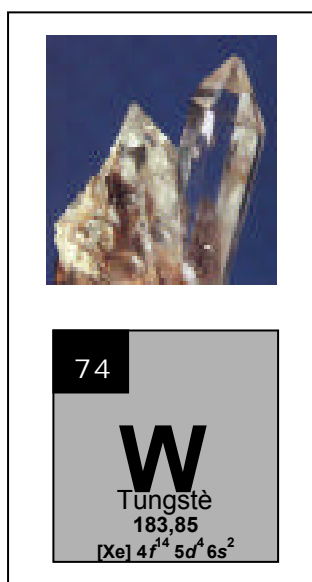
En els darrers anys hi ha una bibliografia creixent referent a la capacitat antidiabètica de diverses sals inorgàniques, com les de seleni, molibdè o vanadi. De totes elles, les més estudiades fins ara són les derivades del vanadi. Des de 1985 es treballa amb el vanadi com a agent mimètic de la insulina, administrat per via oral. Aquest estudi inicial demostrava com el vanadi restablia la glucèmia a valors normals (Heyliger *et al*, 1985). Però, el mateix estudi mostrava alteracions en els nivells d'insulina, una reducció del ritme de creixement, disminució de la ingesta i la beguda, així com una elevada mortalitat i hepatotoxicitat. Estudis més recents han demostrat els efectes beneficiosos del vanadil, el qual reverteix molts dels problemes derivats de la diabetis tipus I i tipus II (Poucheret *et al*, 1998). Amb tot, el llistat d'efectes secundaris segueix sent important, principalment per la seva elevada acumulació tissular: en fetge, ronyó i ós; així com una elevada mortalitat

dosidepenent i la presència de trastorns intestinals (Domingo *et al*, 1995). En aquesta línia s'han estudiat els efectes del vanadil sobre la funció reproductiva, observant-se alteracions importants, tant en mascles com en femelles (Domingo, 1996). Aquestes alteracions són dependents de la dosi, la via d'administració, l'estat d'oxidació del vanadi i del tipus de compost de vanadi. En mascles, en el llistat de problemes derivats de l'administració oral de vanadat es poden trobar diferents alteracions, soles o combinades entre elles, com necrosi testicular, disminució del pes del testicle i alteracions de l'espermatogènesi i alteracions en la funcionalitat de l'espermatozoide, així com alteracions en la seva morfologia. També s'ha observat una disminució de la concentració espermàtica. Els efectes més significatius en femelles s'ha observat en les gestants, observant-se teratogènesi, problemes d'ossificació del fetus, augment de la mortalitat perinatal i alteracions en el desenvolupament (Domingo, 1996).

## 1.4. El tungstat sòdic

### 1.4.1. Presentació

El tungstè, o wolframi (**W**), és un metall, amb el número 74 de la taula periòdica dels elements. El seu pes molecular és de 186.85 g/mol (figura 5).



**Figura 5.** Tungstè.

La valoració de les sals del tungsté, especialment del tungstat sòdic, com a agent mimètic de la insulina va iniciar-se en hepatòcits aïllats (Fillat *et al*, 1992). Posteriorment es van començar a realitzar estudis *in vivo* amb rates Wistar diabètiques induïdes amb STZ, tant per una diabetis tipus I (Barberà *et al*, 1994; Muñoz, 2001) com per una diabetis tipus II (Barberà *et al*, 1997; Muñoz, 2001).

Actualment s'estudien diversos aspectes lligats a un possible ús terapèutic del tungstat sòdic, des dels seus mecanismes d'acció fins la seva bioacumulació, així com els seus efectes sobre la reproducció.

#### **1.4.2. Efectes de l'administració oral del tungstat.**

L'efecte normalitzador de la glucèmia del tungstat sòdic va ser demostrat per Barberà *et al* (1994; 1997) en diferents models animals, com rates diabètiques induïdes amb estreptozotocina (STZ; Barberà *et al*, 1994), rates diabètiques induïdes amb estreptozotocina en etapa neonatal (nSTZ; Barberà *et al*, 1997) i rates diabètiques obeses Zucker (ZDF; Barberà *et al*, 1997). Més endavant, els treballs de Muñoz (2001) i Muñoz *et al* (2001) van seguir incidint en l'estudi del tungstat com a agent antidiabètic en estudis amb ratolins ob/ob, rates BB i estudis *in vitro*.

Tots aquests treballs han demostrat l'efecte normalitzador de la glucèmia del tungstat sòdic, amb major o menor eficàcia segons el model animal, però havent-ne sempre una millora respecte els animals diabètics no tractats. Així mateix, aquests estudis han demostrat que el tungstat sòdic té menor toxicitat que altres compostos que s'estan estudiant amb la mateixa finalitat com els derivats del vanadi. D'altra banda, un altre efecte remarcable associat a l'administració de tungstat és una disminució notable del pes dels animals, sense disminuir la ingesta.

Els estudis de bioacumulació han mostrat com el tungstat s'acumula principalment en l'ós, el qual actua de reservori, així com en l'aparell reproductor (Barberà, 1998). També s'havia demostrat la seva acumulació en l'esquelet fetal, rera l'administració de tungstat a femelles gestants (Wide *et al*, 1986).

Altres grups també s'han interessat per l'estudi del tungstat treballant sobre la farmacocinètica en rata i gos, observant que la vida mitjana del fàrmac en el gos és molt més alta que en rata (de 4 hores en el gos i de 1.7 hores en la rata; Le Lamer *et al*, 2000).

## **1.5. Diabetis i reproducció**

L'estudi dels efectes de la diabetis sobre la funció reproductiva és important pel fet de mostrar-se molt sensible a les agressions, especialment en el cas de que aquestes tinguin una durada llarga. Així mateix, la importància intrínseca dels problemes reproductius causats per la diabetis és prou elevada com per a justificar el seu estudi específic.

### **1.5.1. Efectes de la diabetis tipus I en el sistema reproductor masculí**

Ja en els primers estudis realitzats amb rates diabètiques induïdes amb STZ es van veure lesions en els testicles a mida que passa el temps (Oksanen, 1975). A partir de les dues setmanes després del tractament hi ha una disminució del pes corporal i testicular, acompanyada d'una disminució del diàmetre dels túbuls seminífers. Passats els trenta dies es comença a comprometre l'espermatogènesi i passats els quaranta cinc dies l'aturada de l'espermatogènesi és molt important, però sempre depenent del factor individu, ja que no tots els animals reaccionen igual.

Estudis posteriors van ratificar els efectes de la diabetis induïda amb estreptozotocina sobre el testicle i la funció testicular. Es coneix que dosis altes de STZ (100 mg/kg; Sanguinetti *et al*, 1995), provoquen sobre les cèl·lules de Leydig importants alteracions com cúmuls de gotes lipídiques en el seu citoplasma i disminució del tamany del reticle endoplasmàtic llis. Aquesta situació ens està indicant una disminució de l'activitat secretora per part de les cèl·lules de Leydig, la qual afecta sobretot a la producció de testosterona (Paz i Homonnai, 1979). Aquest és el motiu de l'augment de gotes lipídiques. que venen de l'acumulació d'èsters de colesterol destinats a la síntesi de la testosterona. A les quatre setmanes no s'aprecia una aturada de l'espermioogènesi, però es comencen a veure cèl·lules germinals degenerades (Orth *et al*, 1979; Sanguinetti *et al*, 1995). Endemés, alguns d'aquests estudis han mostrat una disminució del nombre de cèl·lules de Leydig (Paz i Homonnai, 1979; Orth *et al*, 1979).

Les alteracions testiculars induïdes per a la STZ semblen relacionar-se amb deficiències en el ritme de secreció de les hormones gonadotròfiques hipofisàries: l'hormona estimulant del creixement fol·licular (FSH) i l'hormona luteinizant (LH). Així s'ha observat que en animals tractats amb STZ els nivells sèrics de LH disminueixen vora el 35%, mentre que la concentració hipofisària de LH disminueix vora el 15%. El tractament d'insulina restableix els nivells de LH d'aquests animals quasi per complert (Benítez i Pérez Díaz, 1985; Tremblay *et al*, 1985). En aquest respecte, treballs més recents, mostren que hormones com l'FSH, l'LH, la prolactina i l'hormona del creixement pateixen un important caiguda en els animals diabètics, de la qual només es recupera amb tractament d'insulina, la FSH, així com també es restableix, quasi al 100%, els pesos, corporal, testicular, epididimari i de la vesícula seminal (Hutson *et al*, 1983). Tots aquests resultats indiquen una possible arrel hipofisària en les alteracions reproductives lligades a la diabetis.

### **1.5.2. Efectes de la diabetis tipus I en el sistema reproductor femení**

Els efectes de la diabetis sobre el sistema reproductor femení apareixen també tant a nivell ovàric com hipofisari (Valdes *et al*, 1990). Les alteracions reproductives inclouen problemes en els cicles estrals, disminució del pes dels ovaris, disminució del nombre d'òcits ovulats en cada ovulació, disminució dels nivells sèrics d'LH i infertilitat (Bestetti *et al*, 1985; Stein *et al*, 1996). S'especula que les alteracions hipofisàries poden ser degudes a una reducció (Valdes *et al*, 1990) o fins i tot a una pèrdua de l'expressió de la GnRH (Bestetti *et al*, 1985). D'altra banda, els problemes ovàrics podrien deure's a la incapacitat de l'ovari per reaccionar a la presència de les hormones gonadotròfiques hipofisàries o a la disminució de la seva sensibilitat a aquestes hormones (Katayama *et al*, 1984). Aquests paràmetres es poden normalitzar en cert grau mitjançant una teràpia amb administració d'insulina (Bestetti *et al*, 1987). Estudis *in vitro* han demostrat que la secreció d'LH i FSH per part de les cèl·lules gonadotropes és independent dels nivells de glucosa (Adashi *et al*, 1981). En canvi, en cultius de cèl·lules de la granulosa s'ha observat com la insulina estimula l'expressió

d'FSH la qual alhora indueix la producció d'estrògens i progesterona (Davoren i Hsueh, 1984).

Per explicar la disminució dels nivells sèrics d'LH i la conseqüent reducció de la producció de progesterona, s'han estudiat els nivells d'activitat de l'enzim fosfodiesterasa del monofosfat d'adenosina cíclic (AMPc-PDE) la qual està augmentada en els animals diabètics (Stein, 1996). Això provoca una disminució dels nivells d'AMPc amb la qual cosa es podria desencadenar l'esteroidogènesi, que seria la responsable de l'augment dels nivells sèrics d'andrògens que s'observa en la diabetis (Poretsky i Kalin, 1987).

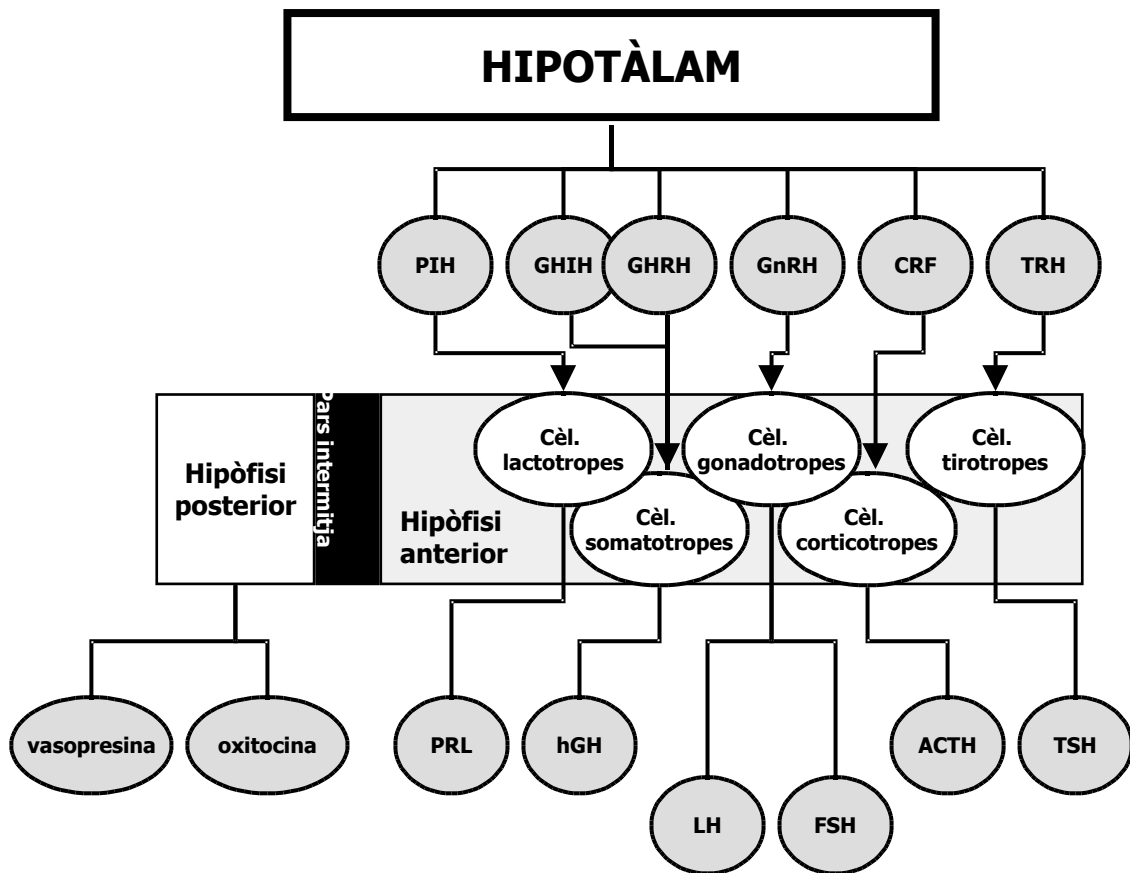
En el cas de les femelles, també són molt importants els efectes que causa la diabetis en la implantació i el desenvolupament embrionari, sobretot si no es realitza cap tractament que reguli el desordre metabòlic que causa la diabetis (Diamond *et al*, 1989). Els problemes davant els quals es pot trobar una femella diabètica van des de reabsorcions embrionàries i augment de malformacions congènites, fins a un augment de la mortalitat perinatal (Diamond *et al*, 1989; De Hertogh *et al*, 1992). Aquests problemes poden ser deguts a una disminució dels nivells d'LH, d'FSH i de prolactina (Diamond *et al*, 1989), així com d'estrògens i progesterona (McLean *et al*, 1996). També s'ha de tenir molt en compte els desordres metabòlics que causa la diabetis, ja que es veuen afectats els nivells de glucosa, d'aminoàcids, de lactat, de lípids i el ritme de síntesi de proteïnes, d'ADN i d'ARN. Aquestes alteracions causen efectes molt greus sobre el fetus, el qual està en ple desenvolupament, necessitant així una elevada disposició de substrats metabòlics per nodrir-se i de substrats estructurals per créixer i diferenciar-se correctament (Diamond *et al*, 1989). La majoria d'aquestes alteracions es poden normalitzar satisfactòriament amb un tractament correcte amb insulina (Diamond *et al*, 1989; De Hertogh *et al*, 1992).

## 1.6. Endocrinologia reproductiva: Eix hipotalàmic-hipofisari

Per estudiar la funció reproductiva s'ha de tenir molt en compte el funcionament de la hipòfisi anterior, ja que d'ella en surten les principals hormones que controlen la funció gonadal, tant en el mascle com en la femella. Així doncs, de la hipòfisi anterior surten, principalment, sis hormones (Figura 6; Guyton i Hall, 1997):

- 1) *Hormona del creixement* (GH), la qual estimula el creixement, la formació de proteïnes i la proliferació i diferenciació cel·lular. La secreció d'aquesta hormona està a càrrec de les cèl·lules somatotropes, les quals representen entre un 30 i un 40% de les cèl·lules de l'hipòfisi anterior.
- 2) *L'adenocorticotropina* (ACTH), que regula les adrenals, actua indirectament sobre el metabolisme de glúcids, proteïnes i lípids. Les cèl·lules corticotropes representen el 20% de les cèl·lules de l'hipòfisi anterior.
- 3) *Tirotropina* (TSH). Aquesta hormona controla la secreció de tiroxina i triiodetironina per part de la glàndula tiroides, les quals regulen la velocitat de múltiples reaccions intracel·lulars. Les cèl·lules tiotropes només representen un 3-5% de les cèl·lules de l'hipòfisi anterior.
- 4) *Prolactina* (PRL), hormona responsable, entre d'altres efectes, del desenvolupament de la glàndula mamària i de la producció de llet. Les cèl·lules lactotropes només representen un 3-5% de les cèl·lules de l'hipòfisi anterior.
- 5) *Hormona estimulant del creixement fol·licular* (FSH), hormona gonadotropa. Les cèl·lules gonadotropes només representen un 3-5% de les cèl·lules de l'hipòfisi anterior. El seu paper es descriu més detalladament més endavant.
- 6) *Hormona luteinizant* (LH), també és una hormona gonadotropa, la qual serà descrita amb més detall en apartats posteriors.





**Figura 6.** Esquema del control de l'hipotàlam sobre la hipòfisi anterior i de les principals hormones implicades.

La regulació de la hipòfisi la realitza l'hipotàlam mitjançant sis hormones. *L'hormona alliberadora de tiotropina* (TRH) que estimula l'alliberació de tiotropina. *L'hormona alliberadora de corticotropina* (CRF) la qual causa l'alliberació d'ACTH. *L'hormona alliberadora de l'hormona del creixement* (GHRH), que produeix l'alliberació de la GH i *l'hormona inhibidora de l'hormona del creixement* (GHIH) o *somatostatina*, la qual inhibeix la secreció de l'hormona del creixement. *L'hormona alliberadora de gonadotropines* (GnRH) que estimula l'alliberació de l'LH i l'FSH. *L'hormona inhibidora de la prolactina* (PIH) la qual inhibeix la secreció de prolactina.

Per tant, per poder estudiar els efectes de la diabetis i el seu tractament amb tungstat sòdic sobre la funcionalitat reproductiva ens vam centrar, a nivell de l'hipòfisi, en l'LH, l'FSH i la PRL.

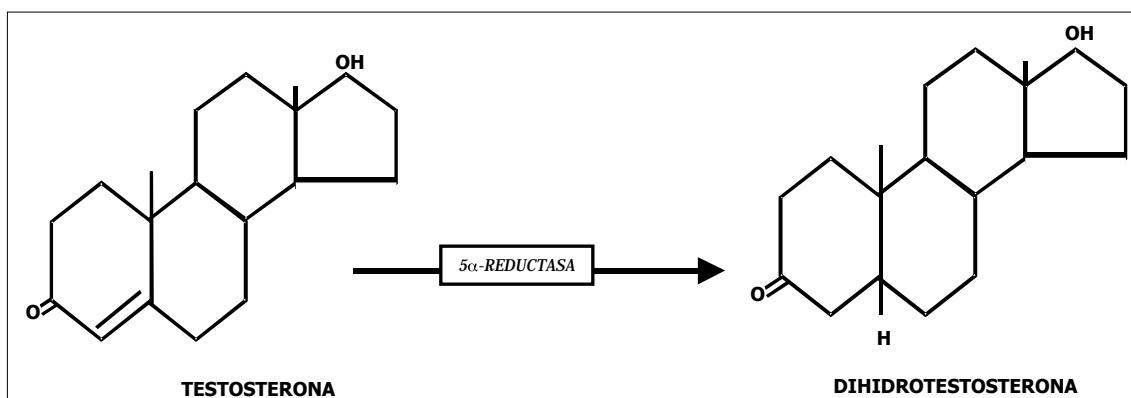
## 1.7. Estudi del sistema reproductor MASCULÍ.

### 1.7.1. Eix hipòfisi-gònada masculina

La gònada masculina té dues funcions principals: la síntesi i secreció d'hormones, principalment andrògens, i la producció d'espermatozoides. El control d'aquestes funcions està a càrrec d'hormones del mateix testicle com per hormones sintetitzades fora d'ell (Ganong, 1992; Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

Dins dels andrògens, els més importants són la **testosterona** (sintetitzada i secretada per les cèl·lules de Leydig), la **dihidrotestosterona** i la **androstendiona**. En els animals adults es produeixen fonamentalment dins de les cèl·lules de Leydig i els seus efectes s'observen en diferents òrgans i sistemes. També es produeixen en diferents llocs de l'organisme, com en les glàndules suprarenals, però no arriben al 5% del total dels andrògens produïts. Són esteroids (Figura 7), sintetitzats a partir del colesterol o directament de l'acetil coenzim A (Norman i Litwack, 1997).

Pràcticament el 97% de la testosterona circula per la sang lligada a l'albumina plasmàtica o amb major afinitat a la globulina (globulina lligadora d'hormones sexuals). Dins dels teixits diana la testosterona es converteix a dihidrotestosterona, mitjançant l'enzim 5 $\alpha$ -reductasa (Figura 7), sent-ne aquesta molt més activa que la testosterona (Norman i Litwack, 1997).



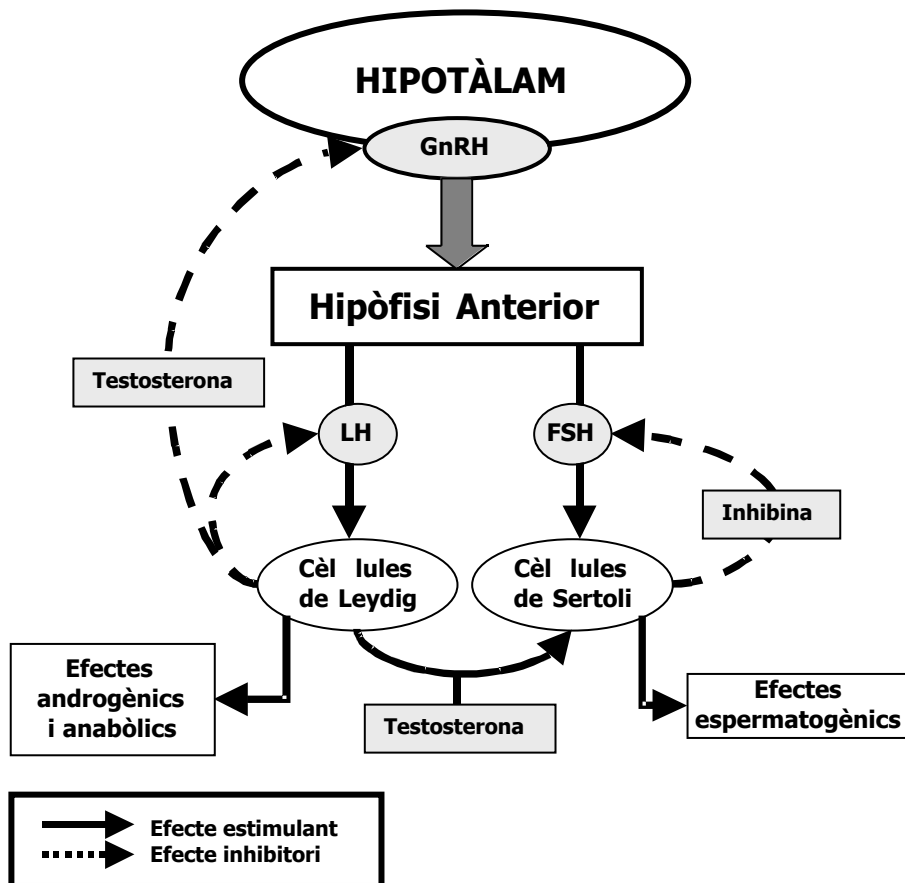
**Figura 7.** Composició molecular de la testosterona i la dihidrotestosterona.

La testosterona que no s'uneix als teixits diana es degradada principalment en el fetge, conjugant-la a glucorònids o sulfats. D'aquí es excretada per la bilis o per l'orina (Ganong, 1992; Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

A més de la seva funció sobre l'espermatogènesi, la testosterona té moltes altres accions, especialment sobre l'aparició dels caràcters sexuals secundaris. Així, en l'espècie humana actua sobre la pell i l'acne i és la responsable de la distribució del pèl corporal, de la calvície, del canvi de veu, del descens dels testicles cap a l'escrot en l'època fetal, etc. També juga un paper molt important en la formació de proteïnes i el desenvolupament muscular. Afecta al creixement ossi i a la retenció de calci. Així mateix, augmenta la taxa metabòlica basal i el nombre d'hematies (Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

D'altra banda, la testosterona també controla la secreció de la GnRH per mitjà d'una retroacció negativa. D'aquesta manera controla tant la secreció d'LH com d'FSH. Es creu que també hi ha un efecte sobre l'adenohipòfisi, directament sobre la secreció d'LH, però aquesta regulació no es considera molt important (Figura 8; Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

El control de l'espermatogènesi per part de l'hipotàlam es realitza mitjançant l'**LH** i l'**FSH** (Figura 8). Aquestes hormones són glucoproteïnes que actuen activant el sistema del segon missatger del AMPc, el qual activa proteïna quinases que fosforilen certes proteïnes. Aquestes proteïnes augmenten la hidròlisi d'èsters de colesterol a colesterol dins els mitocondris. El colesterol passa a pregnolona que és el substrat limitant de la biosíntesi dels andrògens (Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997). L'**LH** estimula la secreció de testosterona mitjançant la seva acció sobre les cèl·lules de Leydig. L'**FSH** actua sobre les cèl·lules de Sertoli i la seva acció és fonamental per l'espermatogènesi.



**Figura 8.** Esquema de les interaccions entre les hormones i les cèl·lules més rellevants del testicle.

L'FSH actua sobre les cèl·lules de Sertoli, on es poden detectar una elevada expressió del receptor d'aquesta hormona. La seva acció sobre aquestes cèl·lules provoca una secreció de substàncies espermatogèniques; com la proteïna lligant d'andrògens (ABP), pèptid similar a la GnRH i el factor inhibidor mülleriana (MIF). L'acció de l'FSH és imprescindible perquè s'iniciï i es mantingui l'espermatogènesi, juntament amb la testosterona, ja que un cop iniciada amb la testosterona n'hi ha prou per mantenir-la (Russell *et al*, 1998; Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

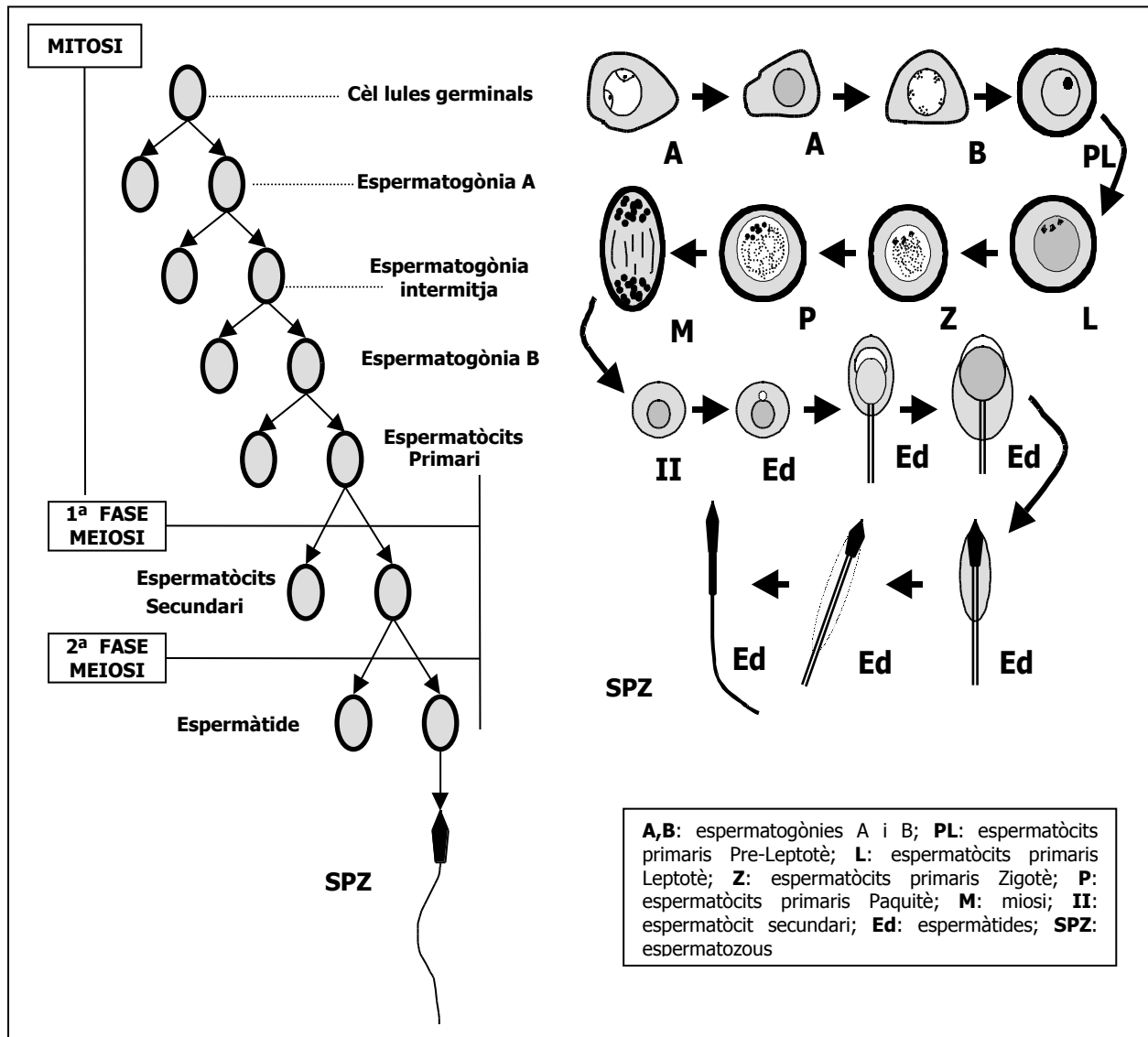
El control de l'FSH el realitza la mateixa espermatogènesi. Quan la producció d'espermatozoides disminueix, augmenta la secreció d'FSH. En canvi,

si hi ha una bona producció d'espermatozoides s'allibera l'hormona inhibina per part de les cèl·lules de Sertoli, la qual actua directament sobre l'adenohipòfisi, fent que decreixi la secreció d'FSH (Figura 8). És, igualment que en el cas de l'LH, un control per retroacció negativa (Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

Altres hormones intervenen en el control de la gònada masculina, com la **PRL**. La seva acció es realitza bàsicament sobre les cèl·lules de Leydig. Augmenta l'acció estimuladora que té l'LH sobre l'esteroidogènesi i, mitjançant, probablement, un augment en el nombre de receptors d'andrògens. Aquest fet s'ha comprovat en la pròstata i en les vesícules seminals (Norman i Litwack, 1997). En el mascle també hi ha uns nivells significatius d'**estrògens**. Aquests es formen a partir de testosterona que passa a estradiol dins de les cèl·lules de Sertoli per estimulació de l'FSH. Es creu que juguen un paper important en la maduració espermàtica (Norman i Litwack, 1997). Finalment, també intervé l'**hormona del creixement**, actuant en el control metabòlic del testicle i en la divisió de les espermatogònies (Norman i Litwack, 1997).

### 1.7.2. Espermatogènesi

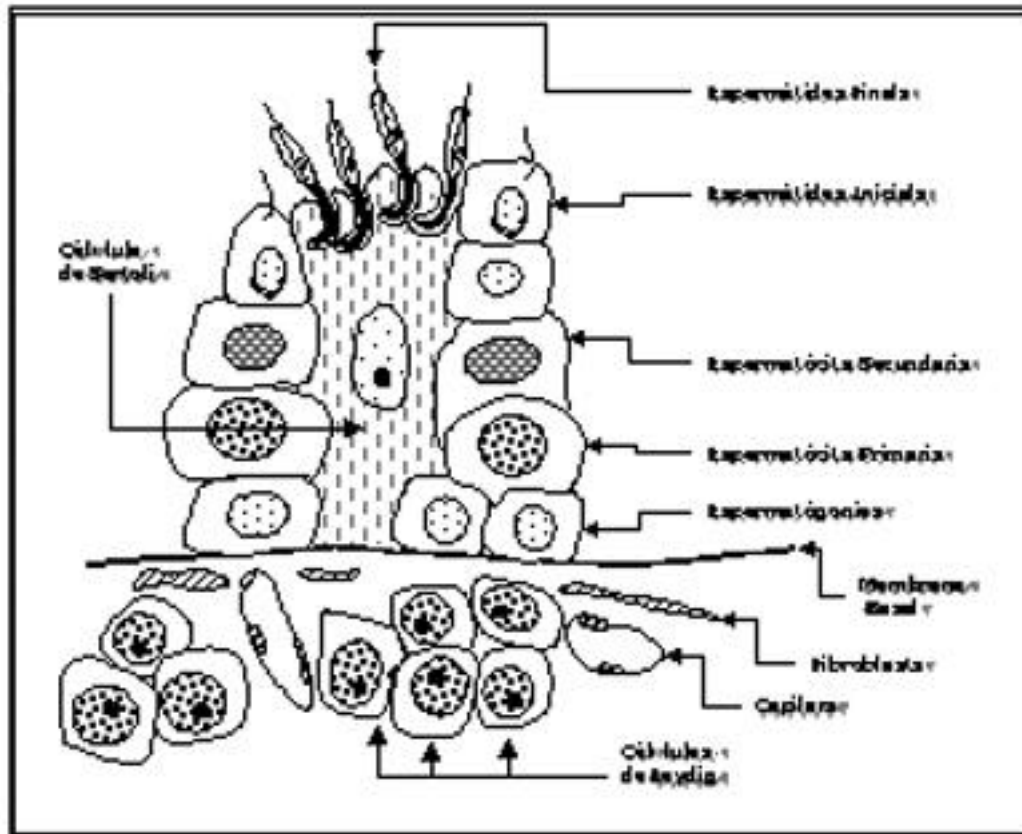
La durada de l'espermatogènesi varia molt depenent de l'espècie. Per exemple, en el ratolí dura 35 dies, 64 en l'home, 49 en el conill i entre 48 i 52 en la rata (Clermont, 1972). A aquests dies s'han d'afegir els que necessita l'espermatozoide per a madurar. La maduració es realitza durant el trànsit per l'epidídim el qual, en la rata és d'entre 10 i 12 dies i en l'home d'entre 5 i 7 dies (Robaire i Hermo, 1988). Per tant, en el cas de la rata, si es volen avaluar els efectes d'algun tractament o malaltia sobre l'espermatogènesi s'ha d'esperar, com a mínim 48-52 més 10-12 dies de maduració per poder estudiar els possibles canvis que s'hagin causat.



**Figura 9.** Esquema de les diferents etapes de l'espermatogènesi.

L'espermatogènesi, és a dir, l'evolució des de cèl·lula germinal fins a espermatozoide immadur, es realitza dins els túbuls seminífers (Figura 9). Els túbuls seminífers desemboquen en la *Rete testis*, que actua com a col·lector dels espermatozoides immadurs i d'aquí passen pels conductes eferents cap a l'epidídim (Kretser i Kerr, 1988). Dins els túbuls dominen dos tipus cel·lulars: les cèl·lules que seran els futurs espermatozoides, en diferents estadis d'evolució, i les cèl·lules de Sertoli (Figura 10).

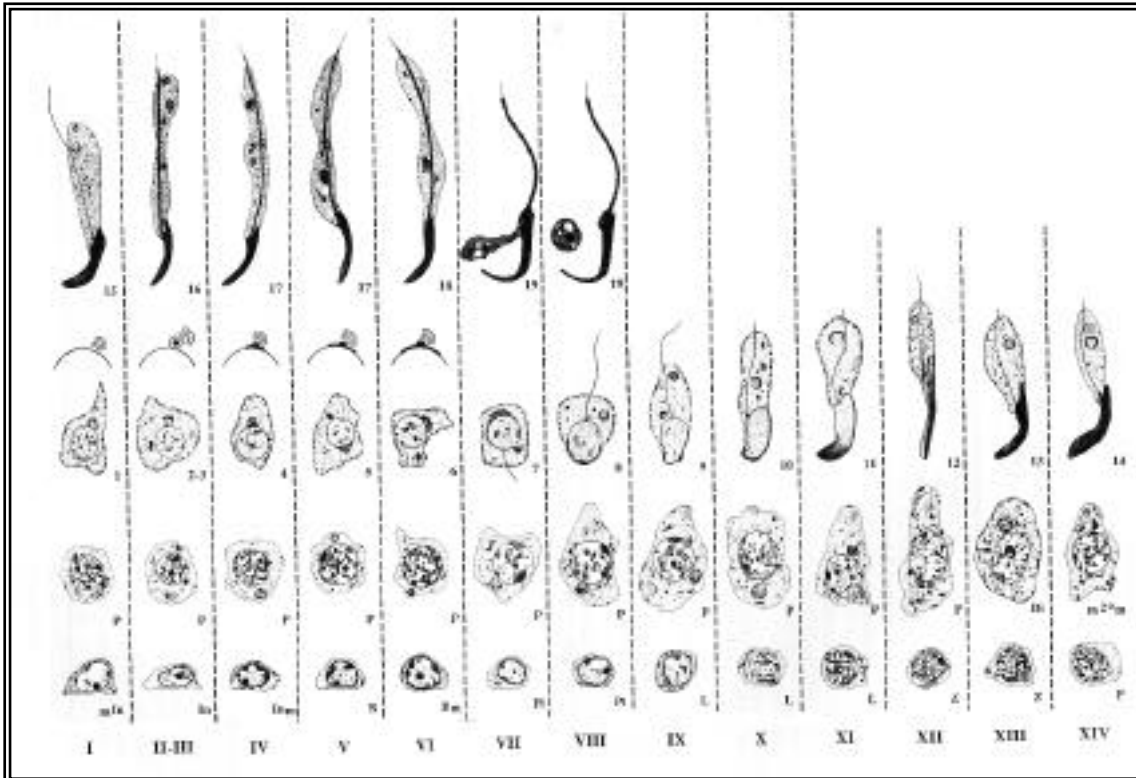
L'espai intersticial queda delimitat entre els túbuls seminífers. En aquesta zona estan les cèl·lules de Leydig, fibroblasts, els capil·lars i un sistema limfàtic important (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema dels diferents tipus cel·lulars dels túbuls seminífers (Kretser i Kerr, 1988; Rusell *et al*, 1990).

**ESPERMATOGÒNIES:** són cèl·lules germinals que es divideixen per *mitosi* i estan recolzades directament sobre la membrana basal (Figura 10). Hi ha dos tipus diferents, les espermatogònies tipus A i les tipus B (Figura 9). Es caracteritzen per la presència de fines làmines de cromatina prop de la membrana nuclear. En rata i alguna altra espècie s'han identificat més tipus diferents d'espermatogònies, anomenades intermitges (Figura 9; Kretser i Kerr, 1988). Els subtipus d'espermatogònies es diferencien pel grau de condensació de la cromatina. El nucli és ovalat, presentant un nucleol petit i situat en la perifèria, a prop de la membrana nuclear. Les mitocondries, amb crestes transversals, estan principalment prop del nucli. El Reticle Endoplasmàtic està

molt desenvolupat, en canvi, el Complex de Golgi és escàs. Dins el citoplasma de les espermatogònies tipus A s'observen grànuls de glicogen (Kretser i Kerr, 1988).



**Figura 11:** Reproducció de Rusell *et al*, 1990, de les diferents fases de l'espermatogènesi en rata. **mIn-Inm:** espermatogònies tipus A; **B i Bm:** espermatogònies tipus B; **P1-Di:** espermatogònies primàries; **m2<sup>o</sup>m:** espermatogònies secundàries; **1-19:** espermàtides.

**ESPERMATÒCITS:** hi ha dos tipus d'espermatòcits; els Primaris i els Secundaris (Figura 9 i 10). En aquesta fase es produeix la *meiosi*. En primer lloc l'espermatogònia tipus B duplica el seu material genètic, entra en una fase de pre-leptotè, passant a ser **espermatòcit primari** amb el material genètic duplicat, preparant-se per la primera divisió mitòtica de la meiosi (Figura 9). Per a la duplicació del material genètic es segueixen les fases de leptotè, zigotè, paquitè i diplotè, passant a ser 4N (Figura 9). Amb la primera mitosi es divideix el material genètic quedant en 2N. Els espermatòcits amb 2N cromosomes són

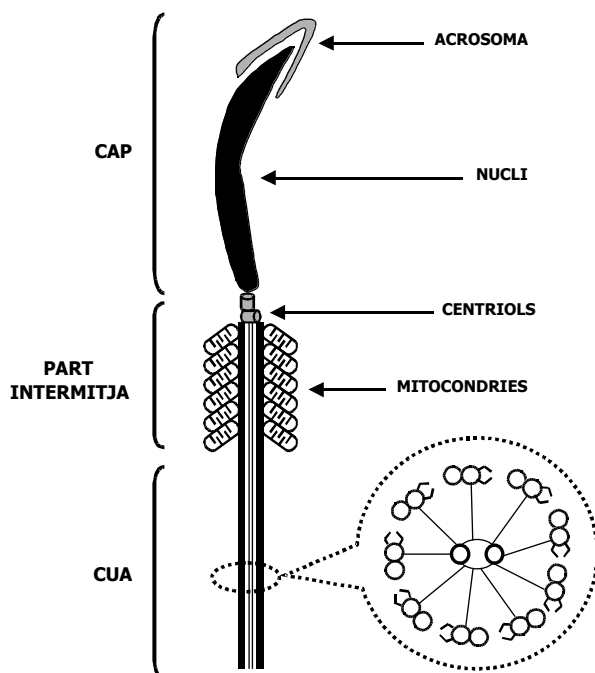


els **espermatoïcits secundaris** (Figura 9; Kretser i Kerr, 1988; Rusell *et al*, 1990).

**ESPERMÀTIDES:** quan els espermatoïcits secundaris acaben la meiosi, queden amb N cromosomes i passen a ser espermàtides (Figura 9). Durant aquesta fase es produeixen els canvis morfològics que transformen aquestes cèl·lules en espermatozoides, és a dir:

1. *la formació de l'acrosoma*
2. *la condensació del nucli*
3. *la formació del flagel*

L'acrosoma és una estructura situada en el cap de l'espermatozoide que prové del Complex de Golgi i dels grànuls elaborats per aquest. Està format per diferents glicoproteïnes, bàsicament enzims lisosomals, i altres proteïnes, totes molt importants per a la reacció acrosòmica imprescindible per a la fecundació de l'òocit.



**Figura 12.** Esquema de l'estructura de l'espermatozoide (Kretser i Kerr, 1988; Rusell *et al*, 1990).

El principal canvi que experimenta el nucli és la condensació de la cromatina i la reestructuració del complex nucleoproteic, substituint-se les histones per protamines. En la rata és molt evident la "manchette", una estructura microtubular que apareix durant l'elongació del nucli. La cua de l'espermatozoide està formada per un flagel, el qual té l'estructura de 9 parelles de microtúbuls situats a la perifèria i 2 en el centre (Figura 12; Kretser i Kerr, 1988; Rusell *et al*, 1990).

### 1.7.3 .Cèl lules de Sertoli

La cèl lula de Sertoli és una cèl lula molt activa que fa de pont entre la sang i les cèl lules germinals (Figura 10). Sintetitzza gran varietat de proteïnes, la majoria destinades a les cèl lules germinals. Normalment no emmagatzema aquestes proteïnes, i un cop sintetitzades aquestes són excretades. L'anàlisi estructural mostra nombrosos lisosomes i vacuoles fagocitàries. Aquestes vacuoles provenen bàsicament de la fagocitosis de les restes cel lulars de les espermatòides, ja que a mida que van madurant van perdent gran quantitat d'òrgànuls cel lulars així com el seu citoplasma (Bardin *et al*, 1988).

Cal destacar les importants concentracions de reticle endoplasmàtic, segurament per a la síntesi d'esteroids (Bardin *et al*, 1988). Les unions entre les cèl lules de Sertoli donen suport estructural al túbul seminífer, i a més organitzen i ordenen les cèl lules germinals. Aquestes unions formen la barrera entre la sang i l'epiteli germinal, deixant en la zona basal les espermatogònies i els espermatòcits en fase de pre-leptotè i la zona de la llum del túbul seminífer la resta d'espermatòcits i les espermatòides (Bardin *et al*, 1988).

D'aquesta manera, durant tota l'espermioogènesi les cèl lules germinals estan en íntim contacte amb les cèl lules de Sertoli (Figura 10). Les anàlisis ultraestructurals de la membrana de les espermatòides no mostren canvis en els punts d'unió amb les cèl lules de Sertoli. La unió estreta entre les cèl lules es realitza mitjançant invaginacions del citoplasma de les cèl lules de Sertoli en la part adluminal; aquest complex d'unió se l'ha anomenat *complex d'unió Sertoli-espermatòida* (*Sertoli-spermatid junctional complex: SSJC*; Cameron i Griffin, 1998). El SSJC determina l'orientació de les espermatòides i la seva elongació. Com es forma, es manté i finalment es dissolt no està clar, però si es coneix que és imprescindible per a tenir una espermiogènesi correcta. Si hi ha algun agent o situació que altera la formació del SSJC apareixen problemes de fertilitat (Cameron i Griffin, 1998). Estudis en homes amb varicocele han demostrat que el citoplasma de les cèl lules de Sertoli està molt vacuolitzat i distès, causant alteracions en la formació del SSJC, fet que causa problemes de fertilitat (Cameron *et al*, 1981).

En homes diabètics amb problemes de fertilitat i rates induïdes amb STZ s'ha observat una mala orientació de les espermàtides així com una formació dels SSJCs alterada. El resultat és una elevada presència d'espermatozoides immadurs en el semen (Murray *et al*, 1983; Cameron i Griffin, 1998).

Estudis *in vitro* han demostrat que l'FSH juga un paper fonamental per l'estructuració del citoesquelet de les cèl·lules de Sertoli per a mantenir estable i/o funcional els SSJCs (Rusell, 1980). Els mateixos estudis mostren com la testosterona estimula i manté la unió entre les cèl·lules de Sertoli i les espermàtides, demostrant-ho en espermàtides de la fase 8 (Figura 11; Rusell, 1980).

#### **1.7.4. Cèl·lules de Leydig**

Les cèl·lules de Leydig ocupen l'espai intersticial que queda entre els túbuls seminífers. Juntament amb aquestes cèl·lules es troben els vasos sanguinis i els vasos limfàtics (Figura 10; Kretser i Kerr, 1988). Depenent de l'espècie, l'espai inter-tubular està més o menys ocupat per cèl·lules o per teixit conjuntiu. En el cas de la rata pràcticament tot l'espai està ocupat per cèl·lules de Leydig i els diferents vasos. Entre aquests elements, donant suport estructural, hi han fibres de col·lagen i fibroblasts (Figura 10; Kretser i Kerr, 1988). Les cèl·lules de Leydig s'agrupen, sobretot, al voltant dels vasos sanguinis, segurament per a facilitar la difusió dels andrògens fins al corrent sanguini. També s'observen altres cèl·lules, com macròfags, limfòcits i cèl·lules plasmàtiques. No està clar si aquestes cèl·lules realitzen cap funció específica (Kretser i Kerr, 1988).

L'anàlisi estructural de les cèl·lules de Leydig mostra un nucli arrodonit o ovalat, depenent, en part, de la forma de la cèl·lula, ja que les cèl·lules que estan íntimament agrupades al voltant dels vasos o dels túbuls seminífers tenen una forma més aviat ovalada. En canvi, les cèl·lules que estan ocupant la resta de l'espai intersticial són més rodones (Kretser i Kerr, 1988). En el citoplasma s'observa un reticle endoplasmàtic llis (REL) amb múltiples llocs d'unió per als enzims necessaris per a la síntesis d'esteroids. En rata, el volum de les cavitats

del REL ocupa el 39% del volum total de la cèl lula. Aquest percentatge pot variar, ja que estudis *in vitro* han demostrat una correlació entre la quantitat de testosterona excretada, per l'estimulació de l'LH, i la quantitat de REL i complex de Golgi (Kretser i Kerr, 1988). Relacionat amb la producció de testosterona, la presència d'inclusions lipídiques, precursors dels esteroides, varia molt en funció de l'espècie animal. Així, en la rata i l'home no s'observen gaires acúmul de lípids, en canvi, en el ratolí, gos i gat es pot apreciar una abundància de lípids dins el citoplasma (Kretser i Kerr, 1988). El mecanisme de síntesi d'esteroides resta molt sensible al metabolisme dels lípids, podent afectar la viabilitat de la cèl lula per acumulació d'inclusions lipídiques (Mori *et al*, 1980).

El mecanisme mitjançant el qual la testosterona es excretada fora de la cèl lula no es coneix. Es creu que intervenen un orgànuls citoplasmàtics que no es corresponen ni amb els lisosomes ni amb els peroxisomes (Kretser i Kerr, 1988).

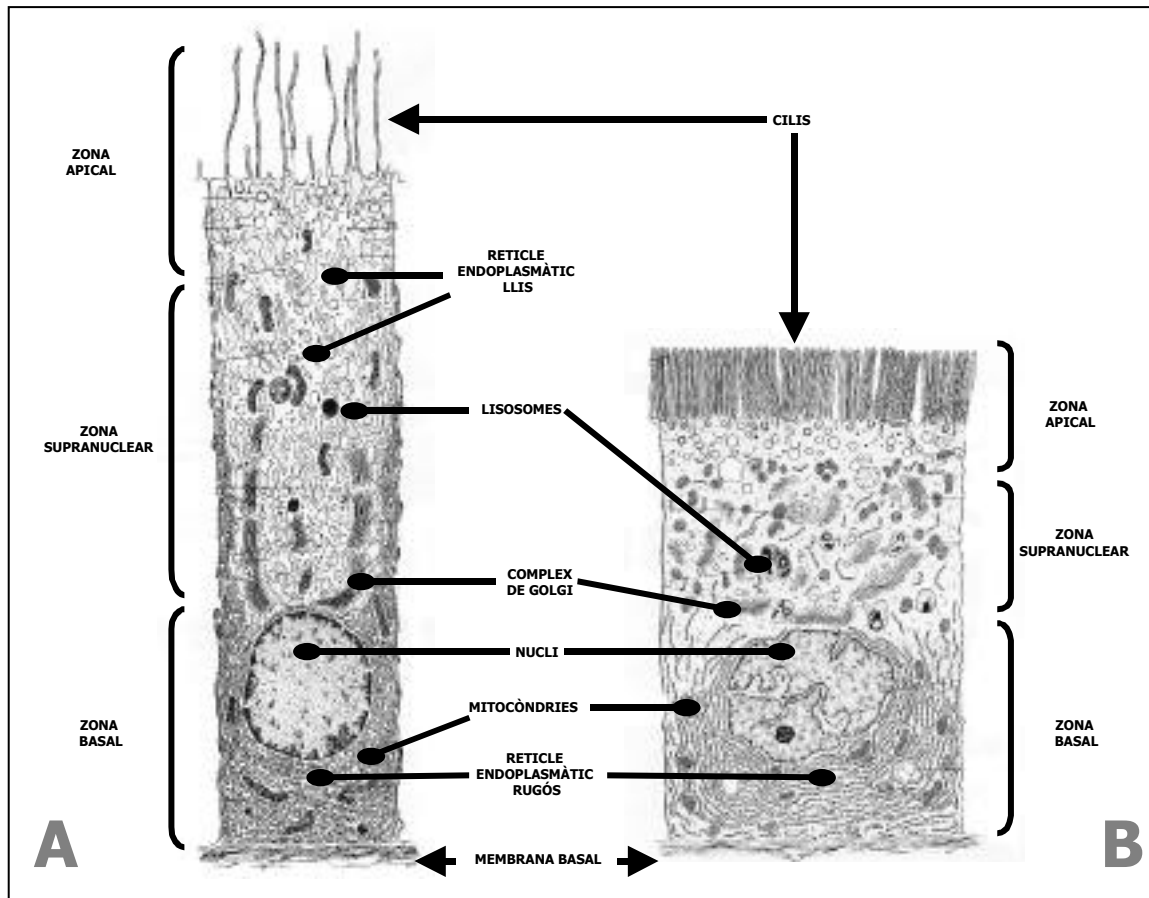
Genèricament també s'observa un Complex de Golgi més o menys desenvolupat i una presència significativa de lisosomes. La important presència de microtúbuls dins del citoplasma aporta estabilitat a la cèl lula i l'ajuda a unir-se a d'altres cèl lules de Leydig i a entrar en contacte amb els vasos i els túbuls seminífers. Finalment cal remarcar el paper de les mitocòndries, ja que en elles es realitzen passos imprescindibles per a la síntesi dels esteroides, concretament el pas de colesterol a pregnenolona (Baird, 1984; Hall, 1988; Kretser i Kerr, 1988).

La presència d'agents tòxics en els testicles, com el sulfat de dimetà-età o el cadmi, causa una vacuolització de les cèl lules de Leydig, la qual acaba amb la degeneració de la cèl lula i posterior fagocitosi per part dels macròfags, disminuint-ne així el nombre de cèl lules de Leydig (Kretser i Kerr, 1988).

#### **1.7.5. Cèl lules epididimàries**

La cèl lula epididimària és una cèl lula molt especialitzada degut a les seves funcions. La seva estructura varia substancialment depenent de la regió de l'epidídim on es trobi, en el cap, el cos o la cua (o part distal). De forma general, es pot definir com un epiteli cilíndric pseudoestratificat, però segueix

una progressió; comença on acaben els conductes eferents i acaba on comença el vas deferent. En aquest epitelí es poden diferenciar dos tipus cel·lulars: les cèl·lules principals i les basals.



**Figura 13:** Reproducció de Robaire i Hermo, 1988. Representació de les cèl·lules principals d'un segment inicial (A) i d'un segment final (B).

Les *cèl·lules principals* formen primer un epitelí cilíndric molt alt en el cap de l'epidídim, però gradualment van disminuint la seva mida per a acabar en la cua com un epitelí cilíndric baix o cúbic (Figura 13). La seva especialització es fa palesa en l'estructuració de la cèl·lula en tres zones ben diferenciades: zona apical, zona supranuclear i zona basal (Figura 13; Robaire i Hermo, 1988). En la zona apical, la que dona a la llum, les cèl·lules estan cobertes per cilis llargs i immòbils. En aquesta zona també es poden observar nombroses invaginacions, indicatiu de la pinocitosi activa que tenen aquestes cèl·lules. Igualment es pot observar una elevada presència de REL (Figura 13). En la zona supranuclear hi ha abundant complex de Golgi, i la zona basal, a més de ser on es localitza el

nucli de la cèl·lula, es pot observar una gran acumulació de reticle endoplasmàtic rugós (RER; Figura 13; Robaire i Hermo, 1988).

Les *cèl·lules basals* estan presents en tot l'epidídim. Són cèl·lules més irregulars; petites, arrodonides o allargades amb un gran nucli que contrasta amb l'escàs citoplasma. Estan en contacte amb les cèl·lules principals mitjançant unions tipus desmosoma. No són gaire actives i la seva funció no està del tot aclarida. Es creu que la seva funció pot estar relacionada en la constitució de la barrera *Sang-Epidídim*, ja que, igual que en el testicle, la llum de l'epidídim està totalment aïllada de la resta de l'organisme. Aquestes cèl·lules, juntament amb les principals, s'encarregarien de la comunicació entre el corrent sanguini i la llum de l'epidídim (Robaire i Hermo, 1988).

La funció principal de l'epidídim és l'excreció i absorció de diferents productes necessaris per a la maduració final dels espermatozoides. En primer lloc, absorbeix una important quantitat del volum de líquid que prové de la *Rete Testis*, fins a un 50% en la rata, per a concentrar els espermatozoides. En segon lloc, excreta i absorbeix diferents molècules. Altres funcions són la intervenció en processos metabòlics que es desenvolupen en la llum de l'epidídim, la síntesi i metabolisme d'esteroids i la síntesi i metabolisme de prostaglandines (Robaire i Hermo, 1988). Els elements que es poden trobar en la llum de l'epidídim i en les cèl·lules epididimàries són molt variats: carnitina, inositol, glucosa, pregnenolona, progesterona, ions (potassi, clor, fosfats, etc.), etc. Tota aquesta activitat es tradueix en la inducció de canvis en els espermatozoides durant el seu trànsit epididimari, de tal manera que les cèl·lules que arriben a la fi del trajecte puguin desenvolupar, rera l'ejaculació, la seva capacitat fecundant.

Així, els espermatozoides, entre d'altres processos funcionals han de perdre les restes de citoplasma que s'acumulen en l'estructura coneguda com a *gota citoplasmàtica*. Per realitzar aquest pas són imprescindibles substàncies que excreta l'epiteli així com l'absorció de les restes d'aquesta *gota citoplasmàtica* (Robaire i Hermo, 1988).

### 1.7.6. Receptors d'andrògens

Des d'un punt de vista estructural, el gen per al receptor d'andrògens presenta una gran homologia amb els d'altres receptors afins, com els de progesterona, glucocorticoids i mineralocorticoids. Les diferències entre ells són, llavors, més aviat degudes a mecanismes post-transcripcionals específics, no coneguts amb detall fins ara (Moilanen *et al*, 1999).

Els receptors d'andrògens es localitzen, entre d'altres llocs, en cèl·lules dels túbuls seminífers, en la pròstata i en l'epidídim (Wright i Frankel, 1979). En l'aparell reproductor masculí hi ha diferents tipus de receptors d'andrògens, els quals es diferencien pel pes molecular, pel coeficient de sedimentació i per filtració per gel. El tipus dominant és el del testicle, epidídim i vesícula seminal; caracteritzat per un pes molecular de 107-122 kDa, un coeficient de sedimentació de 5.0S i un límit de filtració de 53  $\mu$  (Lea *et al*, 1979).

A més de la presència de receptors d'andrògens en òrgans sexuals també es poden detectar en regions de la glàndula pituitària i del sistema nerviós central, en les zones involucrades en la regulació de la secreció de gonadotrofines, del comportament sexual i de l'agressivitat (Sar *et al*, 1990).

En el testicle, els receptors d'andrògens desenvolupen un paper molt important en l'espermatogènesi i l'espermioogènesi, estant-ne presents en les cèl·lules de Leydig, en les cèl·lules de Sertoli, en les cèl·lules peritubulars i en espermàtides, sobretot en les allongades (Vornberger *et al*, 1994). Però el paper dels receptors d'andrògens en les cèl·lules germinals està encara en discussió (Bremner *et al*, 1994; Shan *et al*, 1995).

L'expressió dels receptors d'andrògens depèn directament de la concentració d'andrògens. Per tant, l'expressió d'aquests dependrà de la fase del cicle espermatogènic en que es trobi l'epiteli seminífer. On és més evident aquesta situació és en les cèl·lules de Sertoli (Bremner *et al*, 1994). D'aquesta manera, la màxima expressió de receptors d'andrògens coincideix amb la màxima concentració de testosterona en el testicle (Shan *et al*, 1995).

En les cèl·lules de Leydig, la testosterona realitza una acció autocrina sobre aquestes cèl·lules (Figura 8). Així, els andrògens inhibeixen la producció de testosterona en les cèl·lules de Leydig adultes; però durant la pubertat, la testosterona, juntament amb l'LH, facilita la diferenciació d'aquestes cèl·lules. La màxima sensibilitat als andrògens es dona en la pubertat durant la diferenciació de les cèl·lules de Leydig (Shan *et al*, 1995). D'aquesta manera, els receptors d'andrògens són més importants durant la pubertat per les cèl·lules de Leydig, pel seu desenvolupament i diferenciació; i ja d'adult, en les cèl·lules de Sertoli, per al control de l'espermatogènesi (Shan *et al*, 1997).

En l'epidídim, els receptors d'andrògens principalment, recolçats pels receptors d'estrògens, són necessaris per al desenvolupament de les seves funcions. Així, l'absorció de líquid testicular, la secreció de substàncies a la llum i el transport i magatzem dels espermatozoides depenen directament dels andrògens. A més a més, la resposta als andrògens varia segons la regió de l'epidídim i l'androgen concret que hi sigui present (Goyal *et al*, 1997). D'altra banda, la presència dels receptors d'andrògens en l'epidídim és necessària, juntament amb d'altres factors, per a la diferenciació de les cèl·lules de l'epiteli epididimari (Carballada i Saling, 1997). Així doncs, resta clar que, conjuntament, andrògens i estrògens són importants per a manteniment de l'estructura i la funcionalitat de cada segment del tracte reproductor (Goyal *et al*, 1997).

En rates amb diabetis mellitus induïda amb STZ, a més de la disminució de pes corporal, el pes dels testicles, epidídim i pròstata estan disminuïts (Oksanen, 1975). En sèrum, els nivells de testosterona també estan disminuïts respecte els animals sans. La testosterona endògena del testicle també està significativament disminuïda (Oksanen, 1975; Tesone *et al*, 1980). Això afecta directament als receptors d'andrògens, que, tant en testicle com en la pròstata estan disminuïts respecte les rates control. Tractant els animals diabètics amb insulina o testosterona s'aconsegueix una recuperació dels paràmetres afectats, però sense arribar als nivells dels controls (Tesone *et al*, 1980). El fet que la



insulina i la testosterona tinguin un efecte tan similar a l'hora de recuperar els paràmetres testiculars alterats per la diabetis podria estar indicant una interacció entre les dues hormones per estimular el metabolisme cel·lular, facilitar el transport dels andrògens a través de la membrana citoplasmàtica o bé controlar la síntesi de testosterona (Oksanen, 1975; Tesone *et al*, 1980).

### **1.7.7. Altres receptors hormonal**

Els receptors per a les hormones **LH**, **FSH**, **PRL** i **progesterona** es troben en les cèl·lules diana citades anteriorment. Contràriament al que es podria esperar no hi ha gaires estudis sobre aquests receptors. La majoria de treballs es centren en els receptors de l'LH i l'FSH. Un d'aquests estudis demostra l'elevat grau de conservació que tenen aquests receptors. Comparant diferents espècies de mamífers, inclosos la rata i l'home, el grau de conservació dels d'LH, d'FSH i de PRL està entre el 80 i el 94% (Howell-Skalla *et al*, 2000). El mateix treball va trobar una correlació positiva entre els nivells sèrics de testosterona i l'expressió de dels receptors d'LH i d'FSH, demostrant que quan els nivells de testosterona són baixos hi ha una menor expressió dels receptors (Howell-Skalla *et al*, 2000).

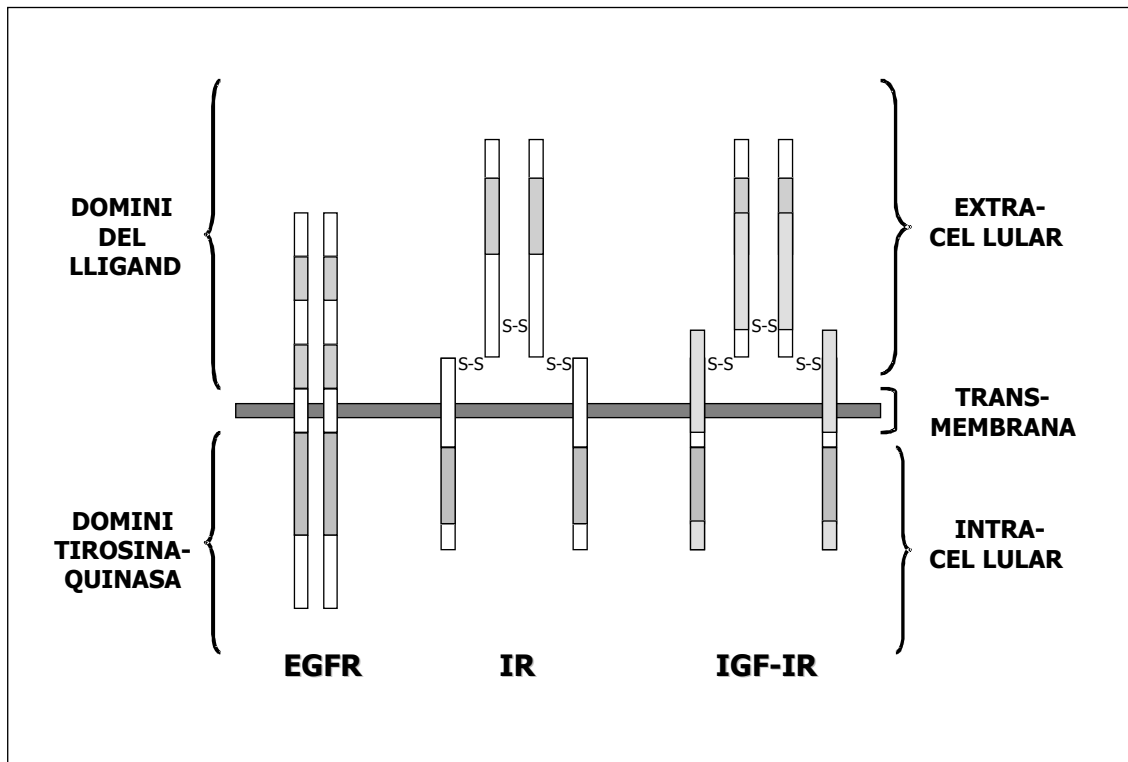
La presència del receptor de PRL s'ha demostrat en les cèl·lules de Leydig i en les cèl·lules germinals de rata, en canvi, no està clar si està present en les cèl·lules de Sertoli de la mateixa espècie (Hondo *et al*, 1995; Konrad *et al*, 1998).

### **1.7.8. Altres indicadors de la funcionalitat reproductiva**

#### **1.7.8.1. IGF-I, Insulina i els seus receptors**

El factor de creixement semblant a la insulina tipus I (IGF-I) és un polipèptid que regula el creixement, la diferenciació i la supervivència de diferents cèl·lules i teixits (Lackey *et al*, 1990), per tant, no és d'estranyar que jugui un paper molt important en la reproducció (Skinner, 1991; Hull i Harvey, 2000).

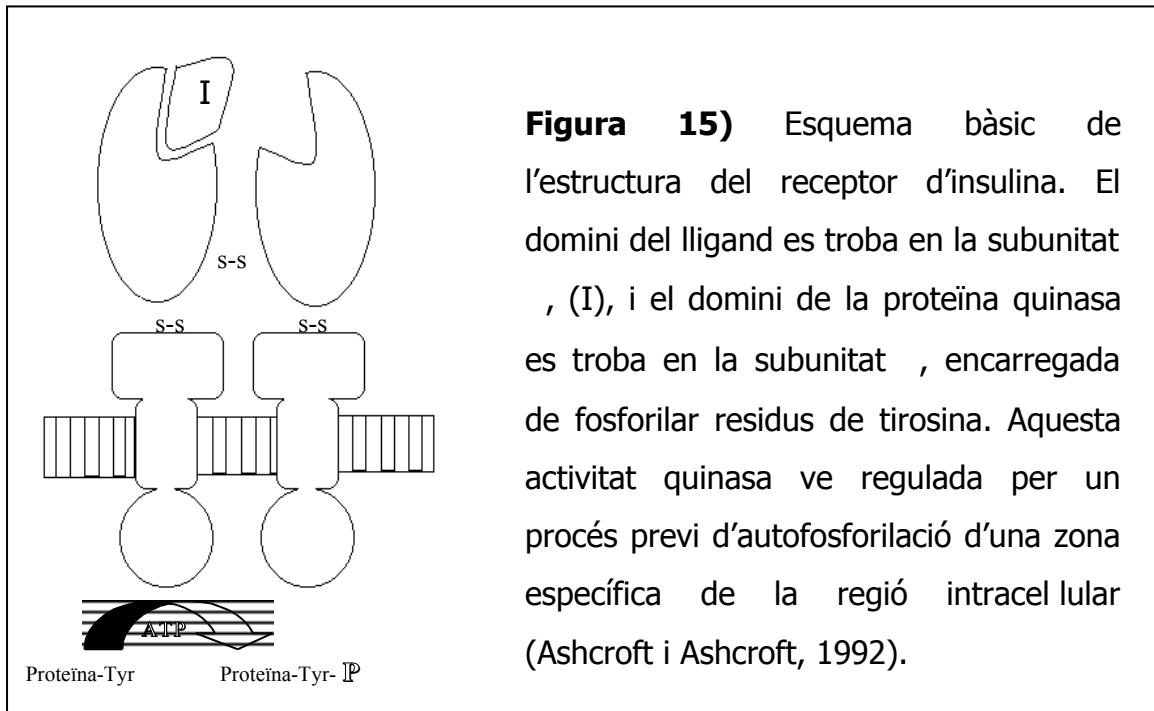
El receptor de l'IGF-I, a l'igual que el receptor de l'insulina, té un elevat pes molecular, d'uns 350 kDa, dividit en dues subunitats , de 135 kDa, i dues subunitats , de 90-95 kDa (Ullrich *et al*, 1986; Steele-Perkins *et al*, 1988). Les subunitats són les extracel·lulars i s'encarreguen de la unió amb el pèptid. Les subunitats són transmembrana i, la part intracel·lular té el domini tirosina quinasa que fosforila residus de tirosina (Figura 14).



**Figura 14)** Comparació de les estructures dels receptors per al factor de creixement epidèrmic (EGFR), la insulina (IR) i l'IGF-I. Les zones representades amb el mateix ombrejat són iguals en els tres receptors, indicant-ne així l'estreta afinitat existent entre ells. (Ashcroft i Ashcroft, 1992; Hunter, 1984).

Tot i la gran similitud entre la composició i l'estructura heterotetramèrica dels receptors d'insulina i d'IGF-I (Figura 14 i Figura 15), hi han diferències importants referents al centre d'unió amb el pèptid, així com en les regions que determinen diferents funcions fisiològiques, incloent-ne la possibilitat que fosforilin substrats diferents (Ullrich *et al*, 1986; LeRoith *et al*,

1993). Aquest fet ens marca la importància d'estudiar cadascun d'aquests receptors per separat.



**Figura 15)** Esquema bàsic de l'estructura del receptor d'insulina. El domini del lligand es troba en la subunitat , (I), i el domini de la proteïna quinasa es troba en la subunitat , encarregada de fosforilar residus de tirosina. Aquesta activitat quinasa ve regulada per un procés previ d'autofosforilació d'una zona específica de la regió intracel·lular (Ashcroft i Ashcroft, 1992).

Els receptors d'insulina i d'IGF-I s'activen per una autofosforilació prèvia que es realitza per interacció alostèrica entre les dues subunitats . Així, la insulina provoca una fosforilació del domini catalític del seu receptor. Aquesta fosforilació realitzarà una altra fosforilació sobre el anomenat substrate-1 del receptor d'insulina (IRS-1). L'IRS-1 fosforilat actua de lloc d'unió d'elevada afinitat per l'acoblament i activació de proteïnes de senyal intracel·lular, de les quals moltes són tirosina quinases (Alberts *et al*, 1990). El receptor d'IGF-I té un mecanisme d'acció molt similar (Gronborg *et al*, 1993; Lee i Pilch, 1994). La relació i importància de l'IGF-I i el seu receptor amb l'aparell reproductor masculí, està àmpliament estudiada des d'inicis dels anys 80. Així, Bellvé i Zheng (1989) estableixen la relació entre diversos factors de creixement i la regulació autocrina i paracrina del testicle. L'IGF-I forma part del grup de factors de creixement paracrins i autocrins que s'han detectat en el testicle mitjançant diferents proves bioquímiques. Dins d'aquest grup s'inclouen la interleuquina 1 (IL-1 ) i els factors de creixement transformant, i

(TGF $\beta$  i TGF $\alpha$ ) entre altres. Aquests factors es diferencien dels que arriben a les gònades pel sistema vascular, com és l'EGF.

En aquests estudis ja s'intuïa una acció de l'IGF-I en les cèl·lules de Leydig, interrelacionant-ne tres elements: l'LH, l'IGF-I i la producció de testosterona (Benahmed *et al*, 1987). Per tal de confirmar aquesta interacció, estudis posteriors van comprovar l'evidència de l'existència d'un control de l'LH sobre les cèl·lules de Leydig regulant l'expressió del gen de l'IGF-I i del seu receptor (Nagpal *et al*, 1991; Lin *et al*, 1994). Aquests treballs van demostrar que l'IGF-I i la LH tenen efectes sinèrgics sobre la formació de testosterona en les cèl·lules de Leydig. D'altra banda, també van constatar que l'LH fa disminuir la concentració del mRNA de l'IGF-I. Aquest fet l'atribueixen a que l'IGF-I és un potent agent mitogen, que actua com a factor estimulador de la síntesi de DNA durant el cicle cel·lular. El paper de l'LH consistiria en evitar possibles alteracions en el creixement de les cèl·lules de Leydig madures. Lin *et al* (1994), ressalten que la presència d'una concentració important de mRNA d'IGF-I en les cèl·lules de Leydig ens està indicant la importància que té l'IGF-I endogen del testicle. Aquest control de l'activitat de les cèl·lules de Leydig per una IGF-I local ens confirma l'important paper de l'IGF-I en les relacions entre les cèl·lules del testicle, principalment entre les cèl·lules de Leydig i les cèl·lules de Sertoli, com s'ha citat anteriorment (Skinner, 1991; Hansson *et al*, 1988). D'altra banda, aquesta producció local es sospita que està directament relacionada amb l'FSH en les cèl·lules de Sertoli i amb l'LH en les cèl·lules de Leydig (Naville *et al*, 1990).

En relació amb l'IGF-I extratesticular, s'han fet treballs que demostren que nivells normals d'IGF-I en el testicle però marcadament disminuïts en sèrum fan disminuir la fertilitat, degut probablement a una disminució de la producció de testosterona per una menor resposta a la LH per part de les cèl·lules de Leydig (Chandrashekar *et al*, 1999).

L'IGF-I també afecta el desenvolupament de les cèl·lules de Leydig, ja que sense aquest factor de creixement difícilment podrien aconseguir una maduració funcional. Per aquest fet s'han associat problemes de retard per a assolir la pubertat a alteracions en l'acció de l'hormona de creixement (GH)

degudes a deficiències d'IGF-I, que s'encarrega de modular les accions de la GH en el testicle (Chatelain *et al*, 1991). Fins i tot, l'IGF-I, juntament amb el TGF- $\beta$  i la insulina, són indispensables per a una bona diferenciació i regulació de les cèl·lules de Leydig fetals, actuant de factor autocrí/paracrí en aquestes cèl·lules, ja que en l'època fetal, els efectes de la LH per sí sola no són suficients per al desenvolupament d'aquestes cèl·lules (Khan *et al*, 1992; Roullier-Fabre *et al*, 1998).

L'IGF-I, juntament amb la insulina, són importants en les cèl·lules de Sertoli, on estimulen la producció de lactat i el transport d'hexoses (Mita *et al*, 1985), així com augmenta el fluxe glucolític (Steele-Perkins *et al*, 1988; Bellvé i Zheng, 1989). Igualment, ambdós factors estimulen la proliferació d'aquestes cèl·lules (en testicles immadurs) i la síntesi total de DNA (Borland *et al*, 1984; Steele-Perkins *et al*, 1988;). Aquestes accions sobre les cèl·lules de Sertoli estan regulades per la FSH, la qual augmenta la producció d'IGF-I (Mita *et al*, 1985; Chandrashekar *et al*, 1999).

Les cèl·lules germinals tenen receptors per a l'IGF-I (Vannelli *et al*, 1988) i per a la insulina, així com per a altres factors i hormones, com l'IGF-II i la GH. Els efectes d'aquests factors s'observen en estadis premitòtics i premeiòtics de les cèl·lules germinals masculines. En aquest sentit, l'IGF-I i la insulina són pèptids mitogènics, i els seus efectes s'observen en espermatogònies A<sub>4</sub> i B i en espermatòcits en fase S (Söder *et al*, 1992). Fins i tot, els espermatozoides madurs de boví, que també tenen receptors per l'IGF-I, reaccionen a l'IGF-I que hi ha en el plasma seminal, augmentant significativament la seva motilitat (Bellvé i Zheng, 1989; Henricks *et al*, 1998).

Els nivells d'IGF-I circulant, així com l'expressió del seu receptor en tots els teixits, disminueixen després de la inoculació d'STZ. La disminució d'expressió dels receptors és molt intensa en el fetge i el testicle (Olchovsky *et al*, 1991). La disminució es pot restablir parcialment amb un tractament d'insulina. En aquest model animal hi ha problemes d'expressió de l'IGF-I en diferents teixits, tenint-ne una disminució general de l'expressió del pèptid, exceptuant en la hipòfisi, on està augmentada (Olchovsky *et al*, 1991). Es creu

que aquest augment és el responsable de la caiguda de la síntesi i secreció de GH, a través d'un "feed-back" negatiu. A més a més, la recuperació de la normalitat després del tractament amb insulina depèn molt de la sensibilitat de l'animal a la STZ, que li causarà lesions més o menys greus, i fins i tot irrecuperables (Olchovsky *et al*, 1991; Chernicky *et al*, 1994).

La diabetis mellitus no és l'únic procés en el qual l'expressió d'IGF-I i el seu receptor es veuen afectades. Altres processos que afecten directament al sistema reproductor com criptorquídies o hipoplàsies, o tractaments amb fàrmacs corticoesteroides també alteren aquest mecanisme de regulació testicular (Antich *et al*, 1995; Flores *et al*, 1998; Viveiros i Liptrap, 1999). En diversos d'aquests processos sobre el testicle es dona un mecanisme compensatori augmentant l'expressió del receptor d'IGF-I per a mantenir els seus efectes (Antich *et al*, 1995).

#### **1.7.8.2. Residus de Tirosines fosforilats**

Els residus de tirosines fosforilats s'utilitzen com a indicadors del grau d'activitat cel·lular, ja que molts receptors per a hormones i factors de creixement tenen mecanismes d'acció on estan implicats mecanismes de fosforilació de residus de tirosines (Ullrich i Schlessinger, 1990; Arad-Dann *et al*, 1993; Ashcroft i Ashcroft, 1992).

Els receptors que tenen un domini tirosina quinasa es caracteritzen per tenir aquesta regió molt conservada (Hanks *et al*, 1988). Per aquest motiu, l'especificitat del receptor la donarà el domini extracel·lular que s'uneix al lligand. Aquesta unió donarà un canvi conformacional en el receptor per a traslladar el senyal de la zona extracel·lular a la intracel·lular, perquè aquesta pugui realitzar les seves funcions. D'altra banda, la regulació de l'activitat d'aquests receptors es porta a terme mitjançant mecanismes de fosforilació i autofosforilació, sent-ne tots aquests mecanismes reversibles (Hunter, 1987).

Dins del citoplasma de les cèl·lules testiculars, sobretot en les cèl·lules germinals i les cèl·lules de Sertoli, hi han residus de tirosines fosforilats. En canvi, no està clar, fins el moment, si en les cèl·lules de Leydig hi

ha marcatge front aquests residus. En l'epiteli epididimari es solen concentrar en la zona apical de les cèl·lules (Arad-Dann *et al*, 1993).

### **1.7.8.3. *c-kit* / SCF**

El factor de les cèl·lules no diferenciades (SCF) és un factor essencial per al desenvolupament de cèl·lules germinals de les gònades (Yoshinaga *et al*, 1991), així com d'altres òrgans i teixits, com el nerviós i l'hematopoiètic (Mauduit *et al*, 1999). Aquest factor es lliga al receptor *c-kit* que pertany a la família de receptors que tenen un domini tirosina quinasa (Figura 14; Sandlow *et al*, 1997). L'SCF s'ha estudiat sobretot en el testicle i en processos tumorals malignes de diferents tipus cel·lulars (Tsuura Y, *et al*, 1994; Bokemeyer *et al*, 1996). El SCF té un pes d'uns 45 kDa, mentre que el del *c-kit* és d'uns 150 kDa (Feng *et al*, 1999). De fet, les cèl·lules que expressen *c-kit* i que necessiten la presència constant del SCF necessiten d'aquest factor per poder completar el cicle cel·lular, ja que en el cas de mancar aquest sistema, la cèl·lula acaba en apoptosi (Feng *et al*, 1999).

La presència del receptor *c-kit* en el testicle es localitza principalment en les cèl·lules de Leydig i en espermatogònies, no quedant-ne clar la seva expressió en les cèl·lules de Sertoli (Feng *et al*, 1999). En canvi, el SCF sí que està en tots els tipus cel·lulars del testicle. La màxima expressió d'aquest factor es dona en el període prenatal i postnatal fins el dia 9. Se li atribueix la funció d'augmentar el nombre, la supervivència i la motilitat aparent de les cèl·lules germinals primordials, així com de ser en part el responsable del desenvolupament i diferenciació de les cèl·lules germinals (Feng *et al*, 1999). En les espermatogònies s'ha estudiat el *c-kit*, sobretot, en les espermatogònies tipus A, on s'ha vist que s'activa per autofosforilació, com molts receptors amb activitat tirosina quinasa (Yoshinaga *et al*, 1991; Dym *et al*, 1995; Mauduit *et al*, 1999). Així mateix, també s'ha observat en espermàtides en maduració, concretament, en la vesícula acrosòmica, pel que es creu que pugui també influir en aquest nivell (Sandlow *et al*, 1997).

A l'observar l'SCF en les cèl·lules germinals, s'especula que pugui ser un factor produït per les cèl·lules de Sertoli per a regular l'espermatogènesi de manera paracrina en estadis molt específics d'aquesta (Hakovirta *et al*, 1999; Mauduit *et al*, 1999). Els mateixos treballs suggereixen que la producció de l'SCF estaria regulada per l'AMPc, sota el control de l'FSH (Hakovirta *et al*, 1999; Mauduit *et al*, 1999). Estudis amb cultius de cèl·lules de Sertoli han mostrat com hi ha un augment de la producció d'SCF sota l'estímul de l'FSH. En canvi, altres hormones, com la testosterona i els estrògens, no aconsegueixen aquest efecte (Yan *et al*, 1999).

En processos que augmentin la mort cel·lular, com una criptorquidia, s'altera l'expressió del receptor i del SCF, afectant-ne així el balanç entre proliferació/diferenciació i la mort cel·lular (Packer *et al*, 1995). D'aquesta manera es pot acabar desenvolupant una situació d'infertilitat. A més a més, l'apoptosi així generada afecta severament a les cèl·lules de Leydig, la qual cosa altera els nivells de testosterona, portant així cap a una cascada d'alteracions en la funció testicular (Feng *et al*, 1999).

#### **1.7.8.4. Glut 3**

La localització del transportador d'hexoses tipus 3 (Glut 3) en el testicle està demostrada en rata i en l'home (Haber *et al* 1993; Burant i Davidson, 1994). En rata s'observa la presència del Glut 3 en la majoria de l'epiteli germinal dels túbuls seminífers i en espermatozoides d'ejaculats (Burant i Davidson, 1994). D'aquest treball cal destacar que es va estudiar els efectes de la diabetis induïda amb estreptozotocina sobre la localització i expressió del Glut 3. En aquesta prova no van observar-se diferències entre els animals control i els diabètics. Aquest resultat sorprèn als autors ja que la diabetis afecta a l'expressió dels transportadors de glucosa en altres teixits, per tant, l'etiologia dels efectes perjudicials de la diabetis sobre la funció reproductiva s'hauria de buscar en altres agents o altres localitzacions (Burant i Davidson, 1994).



## 1.8. Estudi del sistema reproductor FEMENÍ

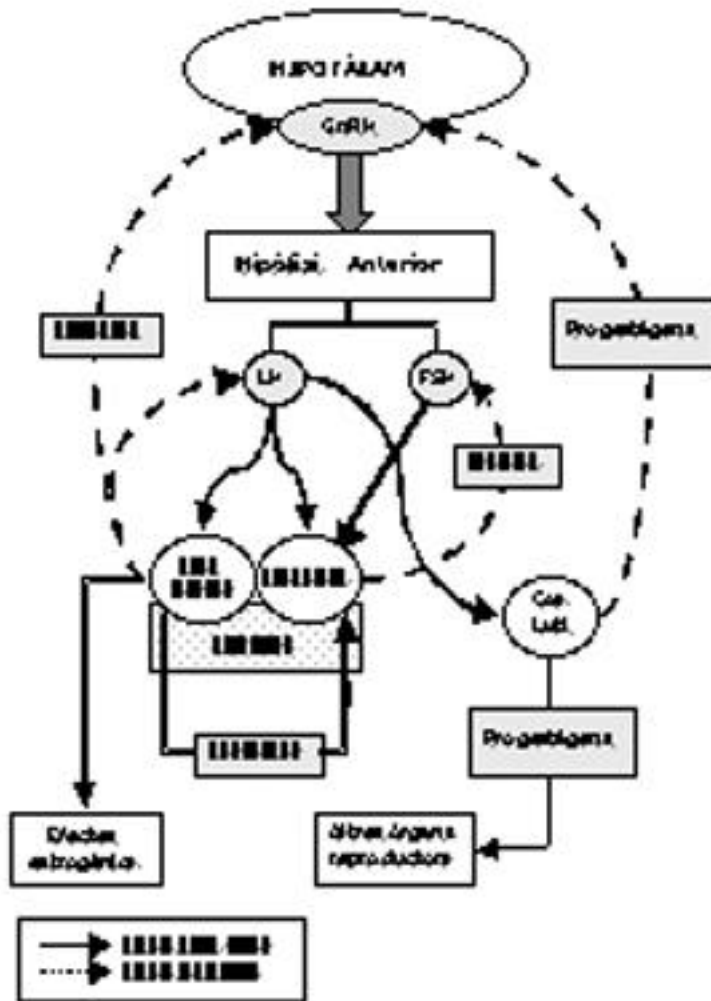
### 1.8.1. Eix hipòfisi-gònada femenina

De manera similar a la gònada masculina, la gònada femenina té dues funcions clarament diferenciades: l'ovulació i la secreció d'hormones. El control d'aquestes funcions està tant a càrrec d'hormones del mateix ovari com per hormones sintetitzades fora d'ell (Eckert *et al*, 1992; Ganong, 1992; Guyton i Hall, 1997; Norman i Litwack, 1997).

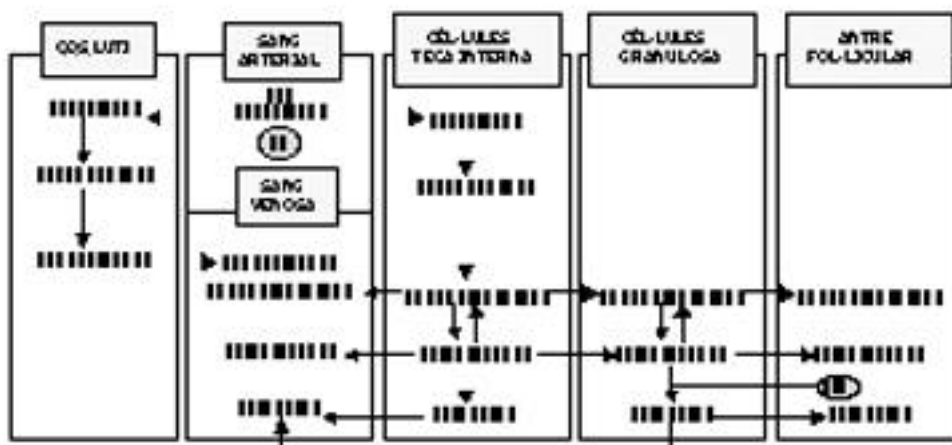
Tradicionalment s'ha considerat que l'**FSH** té activitat esteroidogènica, estimulant la conversió d'andrògens a estrògens. La presència de receptors per l'FSH s'ha observat en les cèl·lules de la granulosa (Figura 16). Aquesta acció és imprescindible per al desenvolupament fol·licular. És interessant recordar que les cèl·lules de Sertoli del testicle també tenen receptors per a l'FSH i igualment converteixen els andrògens en estrògens (Baird, 1984).

L'**LH** realitza diferents funcions en l'ovari. La principal és la síntesi d'esteroids per part de les cèl·lules que tenen receptors per a l'LH, com són les cèl·lules de l'estroma, de la teca interna i de les cèl·lules de la granulosa de fol·licles pre-ovulatoris i en els cossos lútics (Figura 16). L'LH estimula la conversió del colesterol a pregnenolona. A partir d'aquest punt, depenent de l'activitat d'altres enzims en un tipus cel·lular concret, dominarà un o altre producte final. Així, mentre el cos lútic produirà majoritàriament progesterona, les cèl·lules de l'estroma i de la teca interna produiran sobretot testosterona (Figura 17 i 18; Baird, 1984; Ganong, 1992).

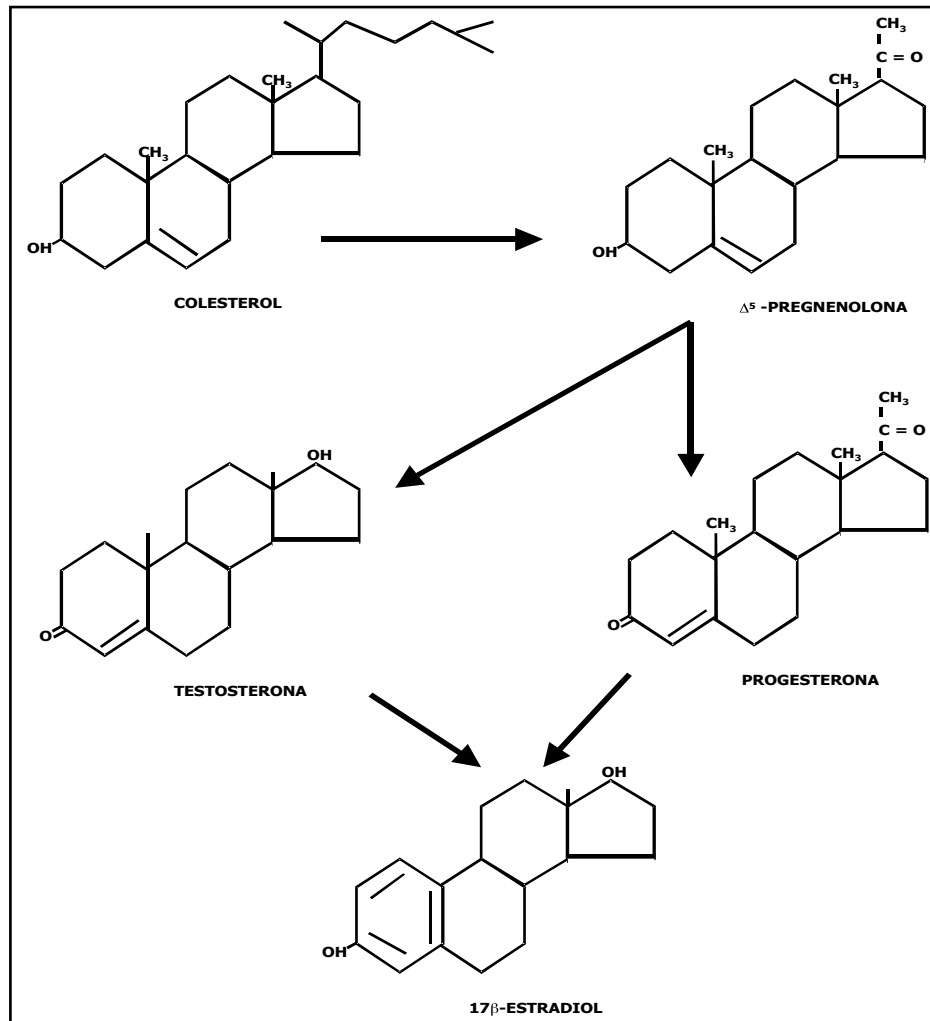
Una altra hormona hipofisària que intervé en el control de les funcions de l'ovari és la **PRL**. Les seves funcions no estan del tot clares, però s'han observat receptors de PRL en cèl·lules de la granulosa i luteals de diferents espècies. Es creu que ajuda a mantenir funcional al cos lútic en algunes espècies (Baird, 1984).



**Figura 16.** Esquema de les interaccions entre les hormones i les cèl·lules més rellevants de l'ovari.



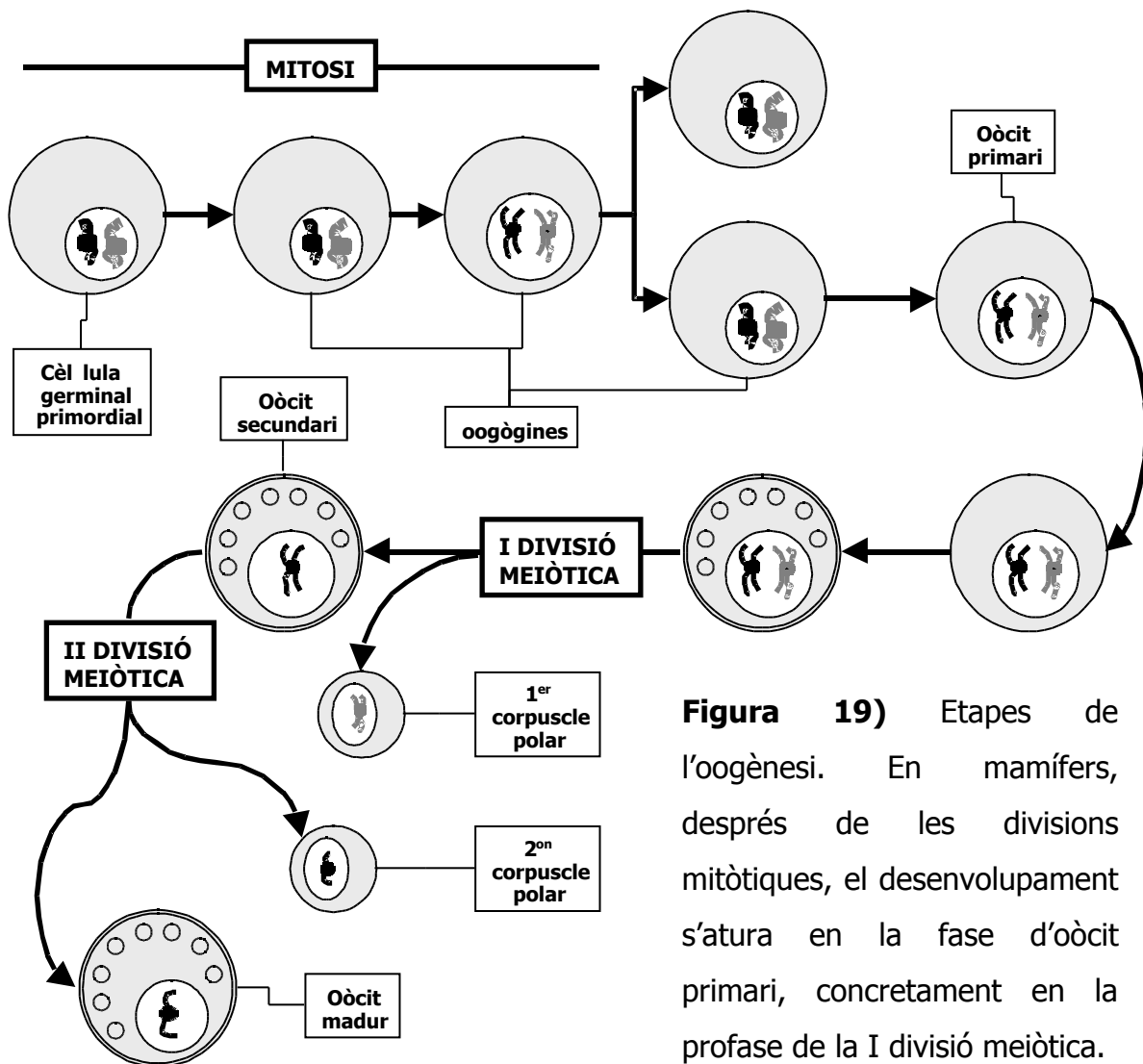
**Figura 17.** Interaccions entre les cèl·lules de la teca interna i les de la granulosa en la síntesi i excreció d'estradiol.



**Figura 18.** Esquema de la biosíntesi dels andrògens, estrògens i progesterona a partir del colesterol.

### 1.8.2. Oocitogènesi

La formació i diferenciació de les cèl·lules germinals femenines presenta algunes diferències respecte a les masculines (Figura 9; 11 i 19). Així, el nombre d'òcits que té una femella queda fixat durant el desenvolupament fetal i prepúber. L'entrada en la pubertat marca l'inici dels cicles estrals els quals només veuen alterada la seva ciclicitat per la gestació, l'època no reproductiva (en espècies estacionals) o per la seva aturada definitiva amb la menopausa (Alberts *et al*, 1990).



**Figura 19)** Etapes de l'oogènesi. En mamífers, després de les divisions mitòtiques, el desenvolupament s'atura en la fase d'oòcit primari, concretament en la profase de la I divisió meiótica.

El procés continuarà quan l'animal és adult sota estímuls de diferents hormones (Alberts *et al*, 1990).

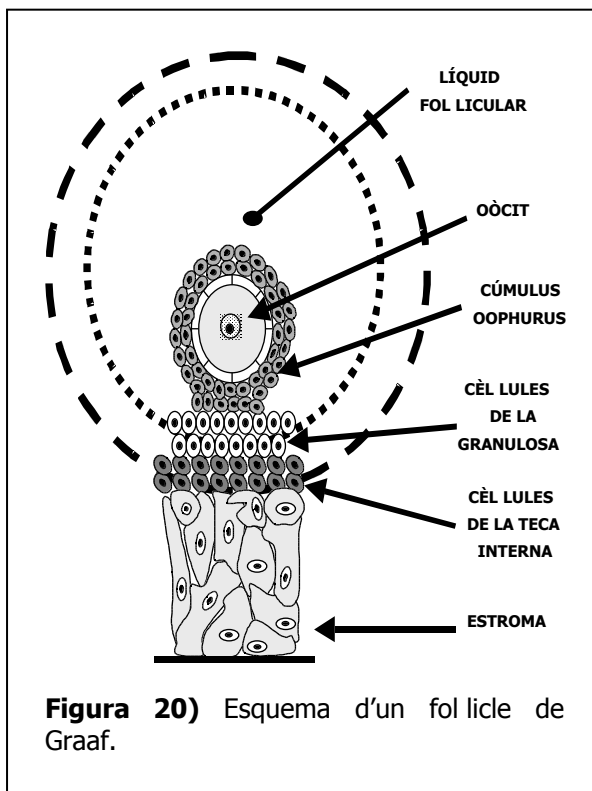
Les cèl·lules germinals primordials migren cap a la gònada en formació, convertint-se en oogònies; aquestes, després d'un període de proliferació mitòtica, es diferencien en oòcits primaris, que comencen la divisió meiótica I, on es replica l'ADN. En la següent fase, es dona la maduració de l'oòcit. Aquesta maduració només comença amb l'arribada a la maduresa sexual per efecte de diferents hormones. En aquesta fase els cromosomes es reconcondensen i es separen i l'embolcall nuclear es trenca. La divisió del citoplasma no és simètrica, de manera que es generen dues cèl·lules, una de gran, l'oòcit secundari, i una de petita, el primer corpuscle polar. L'oòcit secundari realitza la divisió II de la meiosi, perdent la meitat del nombre diploid normal dels

cromosomes. En aquest procés s'allibera el segon corpuscle polar i en surt l'òocit madur. Aquestes divisions on s'expulsen els corpuscles polars permeten que l'òocit mantingui la seva mida tot i patir diferents divisions. Els dos corpuscles polars degeneren i desapareixen (Alberts *et al*, 1990).

### 1.8.3. Cicles estrals

Un cop la femella és adulta comença a tenir cicles d'ovulació. L'estructura bàsica de l'ovulació és el fol licle (Figura 20). El fol licle madur o de Graaf està format externament per les cèl·lules de la teca externa i la teca interna. Aquestes cèl·lules estan en íntim contacte amb capil·lars i l'entramat que formen les cèl·lules de l'estroma. A continuació es troben les cèl·lules de la granulosa. Aquestes cèl·lules són molt importants en la secreció d'hormones i la comunicació entre l'òocit i l'ovari i estan connectades amb les cèl·lules del *Cúmulus oophorus* (Figura 20; Baird, 1984).

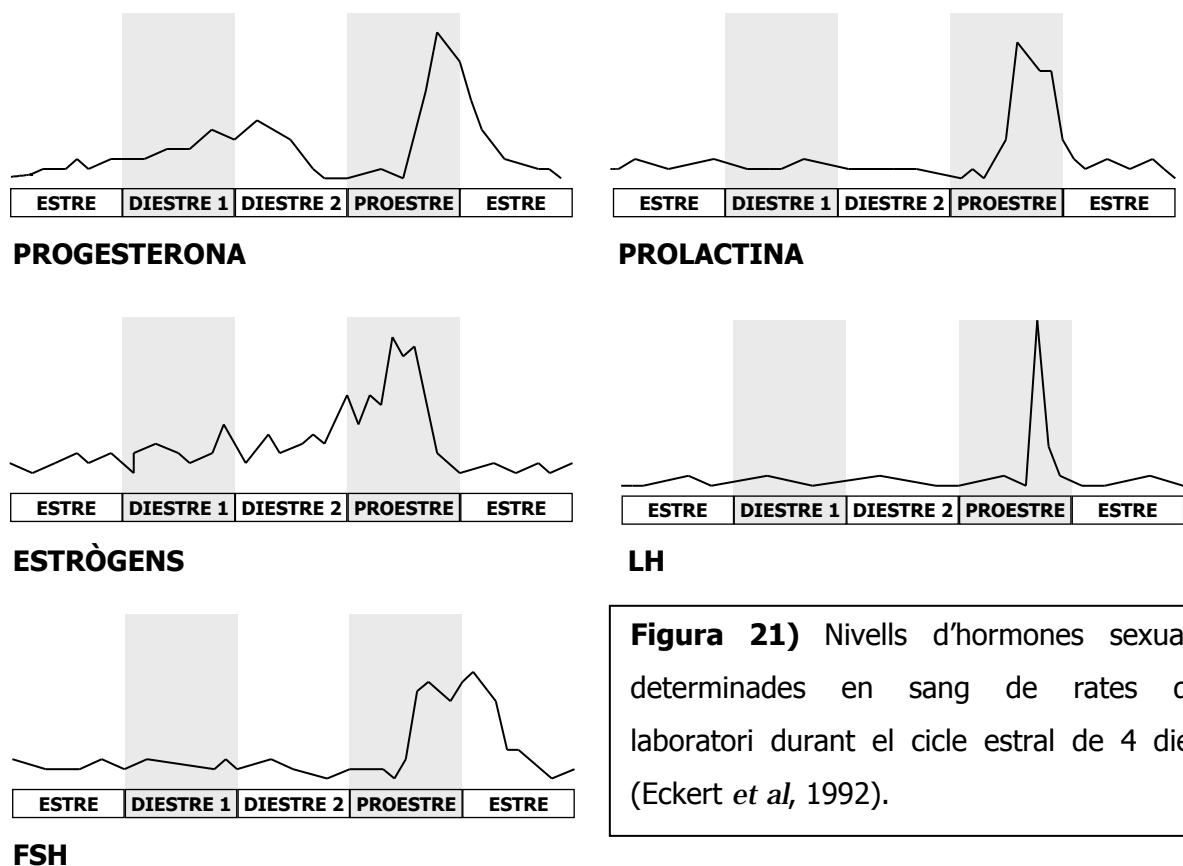
Les hormones que intervenen en el ovari ja s'han citat anteriorment (Figures 16, 17 i 18).



El cicle estral comença amb el creixement fol·licular. El fol licle pre-ovulatori creix sota la influència de l'FSH, la concentració de la qual en el líquid fol·licular és molt elevada. En aquestes condicions i quan la concentració d'estrògens és suficientment elevada desencadena, per retroalimentació sobre l'hipòfisi, una descàrrega massiva d'LH, resultant-ne un pic molt marcat en sèrum (Figura 21; 22; Baird, 1984).

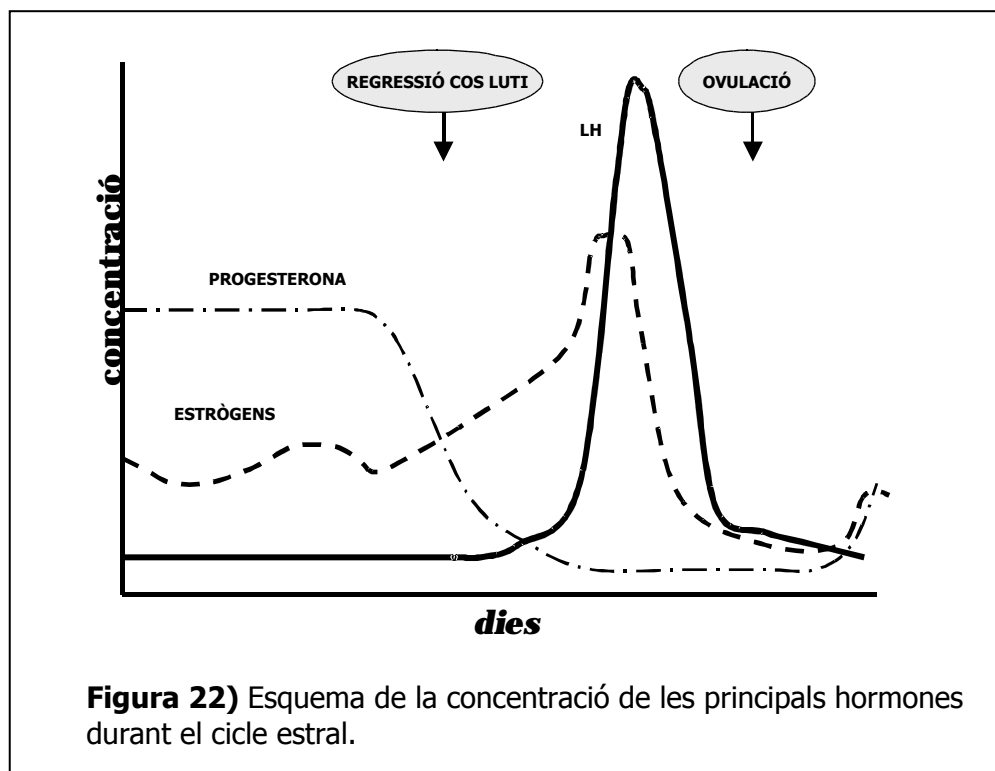
Aquest pic d'LH desencadena una sèrie de canvis. En primer lloc causa l'ovulació per una sèrie de canvis bioquímics i estructurals que trenquen el

fol licle. En segon lloc, l'LH estimula la producció de prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>) la qual estimula l'acció de colagenases que ajudaran a l'alliberació de l'oòcit del fol licle. Al mateix temps, les cèl·lules de la granulosa pateixen el procés de luteinizació, canvi essencial per a la formació del cos luti. En aquest procés, les cèl·lules experimenten un augment del REL i de les inclusions lípidiques del citoplasma, característiques de les cèl·lules secretores d'esteroides (Baird, 1984). L'acció de l'LH sobre les cèl·lules de la granulosa es realitza gràcies a l'augment de l'expressió de receptors per l'LH que experimenten aquestes cèl·lules sota l'efecte de la mateixa LH. Es creu que la prolactina, juntament amb l'LH, ajuda a l'augment de l'expressió de receptors d'LH en les cèl·lules de la granulosa (Baird, 1984). La unió entre l'LH i el seu receptor causa una estimulació de la secreció de progesterona la qual intervé directament en el procés de luteinizació (Baird, 1984).



El procés de luteinizació acaba amb la formació del cos luti. El principal producte de secreció del cos luti és la progesterona (Figura 16), la qual

s'identifica com a l'hormona de la gestació. Mentre hi ha progesterona no hi pot haver cap nova ovulació. Per tant, cal eliminar al cos luti perquè comenci un nou cicle, tret que hi hagi una gestació (Baird, 1984). La regressió del cos luti es realitza mitjançant la secreció de  $\text{PGF}_2$  per part de les banyes uterines. La  $\text{PGF}_2$  inhibeix la secreció de progesterona interferint en la unió entre l'LH amb el seu receptor. D'aquesta manera l'LH no pot activar l'adenil-ciclasa que produeix AMPc a partir d'ATP (Baird, 1984).



El cicle estral de la rata és d'ovulació espontània, és a dir, no necessita el coit per ovular (Short, 1984). D'altra banda, la rata presenta un cicle polièstric no estacional, és a dir, té cicles de forma contínua durant tot l'any (Short, 1984).

En aquest estudi s'ha treballat amb la rata com a model de diabetis tipus I. Des d'un punt de vista reproductiu, això implica una certa dificultat a l'hora d'extrapolar els resultats a d'altres espècies, com la humana. Així, la dona també és d'ovulació espontània i polièstrica. La gran diferència entre ambdues espècies es dona però en la durada del cicle. Si en la dona dura 28 dies, en la rata només dura 4 dies (Baird, 1984). Aquesta diferència de dies marca el

funcionament de l'ovari. Quan el cicle té una durada llarga, es poden diferenciar quatre etapes dins d'ell:

- Estre: quan la concentració d'estrògens és màxima i hi ha l'ovulació.
- Metaestre: etapa curta on es forma el cos luti
- Diestre: el cos luti està totalment format i actiu, si bé degenera al final de la fase si no hi ha gestació.
- Proestre: un cop el cos luti ha degenerat tornen a augmentar els nivells d'hormones necessàries per entrar de nou en estre.

En el cas de la rata, al ser el cicle estral sols de 4 dies fa que només es diferencien les etapes d'estre, diestre i proestre, les quals només duren hores (Figura 22; Baird, 1984; Eckert *et al*, 1992). Aquesta situació fa que el cos luti excreti progesterona unes 24 – 48 hores, sense arribar a ser del tot funcional. De fet, en el mateix moment es poden observar fol·licles i cossos lutis funcionals (Niswender i Nett, 1988).

#### **1.8.4. Gestació i part**

La rata es considera adulta a partir de les 6 - 8 setmanes d'edat. La femella és fèrtil fins els 600 a 650 dies, tenint la màxima fertilitat entre els 100 i 300 dies. Té ovulació espontània no estacional i se li pot induir una pseudogestació mitjançant estimulació uterina, la qual dura uns 10 a 12 dies. L'estre dura 12 hores, i es repeteix cada 4 dies o també després del part o d'una pseudogestació. Per a realitzar una còpula dirigida s'aconsella posar la femella en la gàbia del mascle durant la nit, ja que són animals nocturns. L'èxit de la monta natural és molt elevat. Per comprovar si hi ha hagut monta es pot realitzar un frotis vaginal per intentar observar espermatozoides o es pot observar la presència de tap vaginal a l'entrada de la vagina. Aquest tap vaginal es forma per la coagulació del semen però només dura unes poques hores. La gestació dura entre 19 i 23 dies, la qual acaba amb el part que acostuma a durar 1 ó 2 hores. No són freqüents les distòcies i solen tenir entre 6 i 12 cries per part (Kohn i Barthold, 1984).



Les necessitats hormonals per a mantenir la gestació varien durant els 22 dies que dura. Els 7 primers dies, a més de la progesterona és necessària la presència de PRL. A partir del dia 10 hi han nivells elevats de  $PGF_2$  excretats per les banyes uterines. Aquests nivells són suficients per causar la regressió del cos luti. Per tant, és imprescindible la participació d'una altra hormona que mantingui la gestació, en concret, la gonadotrofina coriònica de rata (rCG). La rCG és excretada per la placenta i és la responsable de mantenir els nivells alts de progesterona durant la segona part de la gestació. A més a més, disminueix la sensibilitat del cos luti als efectes luteolítics de la  $PGF_2$  (Heap i Flint, 1984; Niswender i Nett, 1988). També intervenen altres molècules amb activitat luteotrópica com l'hormona semblant a la PRL (Heap i Flint, 1984). Aquesta hormona intervé durant la segona meitat de la gestació i durant la primera ho fa la pròpia PRL. Ambdues hormones mantenen els receptors per a l'LH, i els estrògens dels cossos lutis. L'LH manté la síntesi d'estrògens que, en darrera instància, serà la responsable del manteniment de l'excreció de progesterona (Heap i Flint, 1984).

Cal remarcar que la placenta de la rata és del tipus hemocorial. En aquests tipus de placentes la sang de la mare i la del fetus estan en íntim contacte, permetent que l'intercanvi de substàncies sigui molt eficaç (Heap i Flint, 1984). Sent així, si la femella gestant té diabetis, els nivells de glucosa en sang poden ser molt elevats. La hiperglucèmia al fetus estimula al pàncreas a produir molta insulina. Aquesta situació és greu, ja que la insulina actua com a factor de creixement podent donar-se casos de fetus més grans del normal. Aquest efecte de la diabetis en el fetus encara està però en discussió en la rata (Liggins, 1982).

El part es desencadena per una caiguda dels nivells de progesterona. Les glàndules adrenals del fetus excreten cortisol i l'activitat del miometri va acompanyada d'un augment molt important dels nivells d'estrògens i d'oxitocina en sang (Liggins, 1982; Heap i Flint, 1984). Els estrògens augmenten l'expressió dels receptors d'oxitocina i la sensibilitat a aquesta hormona en el

miometri. Així mateix, els estrògens també estimulen l'excreció de  $\text{PGF}_2$  per part de l'endometri de la mare (Sherwood, 1988).

### 1.8.5. Receptors d'estrògens

Els estrògens actuen mitjançant el seu receptor, el receptor d'estrògens (ER). Les seves accions regulen el creixement, la diferenciació i la funció de molts teixits reproductius. Els ERs formen part de la família de receptors nuclears. Es poden observar en cervell, adenohipòfisi i teixits reproductius, com el testicle i els ovaris (Smith, 1998; Sar i Welsch, 1999).

L'ER s'activa per fosforilació. Aquest fet s'ha demostrat, en absència del lligand, amb activadors de la proteïna quinasa A o amb inhibidors de fosfatases (Smith, 1998). El mateix estudi va comprovar com l'IGF-I i l'EGF estimulen la transcripció del ER. La seva acció la realitzen modulant un regió de transcripció "activadora de funcions", la tipus I (AF-I), del gen del ER (Smith, 1998).

Hi han dos subtipus diferents de ERs, els ER $\alpha$  i els ER $\beta$  (Sar i Welsch, 1999; Sharma *et al*, 1999; Fitzpatrick *et al*, 1999). Ambdós subtipus es distribueixen de manera diferent en l'ovari. Els ER $\alpha$  s'han localitzat en cèl·lules de la granulosa de fol·licles primaris, secundaris i madurs. En canvi, els ER $\beta$  es localitzen en cèl·lules intersticials, cèl·lules de la teca, cèl·lules de l'oviducte, cèl·lules de l'estroma, cèl·lules musculars i de les glàndules ovàriques (Sar i Welsch, 1999; Fitzpatrick *et al*, 1999). Aquesta distribució diferent dels dos subtipus fa pensar que puguin tenir funcions diferents, suggerint-ne que els ER regularien el creixement i la maduració dels fol·licles (Sar i Welsch, 1999). En les cèl·lules de la granulosa estimulen la seva proliferació, augmenten la formació d'unions cel·lulars entre elles i eleven la sensibilitat a l'FSH mitjançant l'estímul en la síntesi dels seus receptors, fet que porta a un increment de la síntesi d'estrògens i de progesterona (Fitzpatrick *et al*, 1999).

L'FSH actua en les cèl·lules de la granulosa regulant l'activitat de l'enzim aromataasa, el qual catalitza la reacció que transforma els andrògens en estrògens (Figura 10). D'altra banda, l'LH afecta a les cèl·lules de la teca fent que el citocrom P450c17 converteixi esteroides en substrats per l'aromataasa (Sharma *et al*, 1999).

L'expressió del ER en les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles disminueix bruscament després de l'ovulació (Suzuki *et al*, 1994; Fitzpatrick *et al*, 1999). Estudis *in vitro* han demostrat la dependència dels ERs a les gonadotrofines, com la gonadotrofina coriònica humana (hCG; Iwai *et al*, 1991; Suzuki *et al*, 1994; Fitzpatrick *et al*, 1999). Finalment, en el cos luti no s'ha observat la presència del ER en cap tipus cel·lular (Suzuki *et al*, 1994), però sí que s'ha localitzat l'altre tipus de receptor, el ER (Sharma *et al*, 1999).

### **1.8.6. Altres receptors hormonals**

En les cèl·lules de la granulosa també es localitzen els receptors d'LH, l'expressió dels quals està induïda per efecte dels estrògens i l'FSH (Sharma *et al*, 1999). Durant el cicle estral, a mida que l'LH augmenta fins a realitzar el pic necessari per l'ovulació (Figura 22), els ER desapareixen i apareixen els receptors de progesterona. Aquests darrers persisteixen en aquestes cèl·lules quan es transformen en cèl·lules luteíniques (Iwai *et al*, 1991). Per a explicar aquesta dinàmica d'augment i disminució de l'expressió d'aquests receptors s'han realitzat diferents treballs, els quals han pogut constatar que hi ha un control per part de l'LH i l'hCG en la dona, però no s'han obtingut resultats concloents sobre el paper que juga la progesterona en aquest cas (Iwai *et al*, 1991; Suzuki *et al*, 1994).

Els receptors de progesterona estan presents en els nuclis de pràcticament tots els diferents tipus cel·lulars de l'ovari (Vermeirsch *et al*, 2001). La seva expressió també varia amb el cicle estral. L'expressió en les cèl·lules fol·liculars augmenta a mida que avança el desenvolupament del fol·licle. Unes altres cèl·lules que tenen un nivell d'expressió important són les cèl·lules de la teca. Aquesta presència dels receptors de progesterona indica la importància que té la progesterona en el control de l'ovulació i en el procés de luteïtzació (Vermeirsch *et al*, 2001).

El receptor de prolactina (PRL-R) té dues formes; la curta i la llarga. El lloc natural on es localitza el PRL-R és la glàndula mamària on, en el cas de la

rata, es poden detectar nivells d'expressió durant els 20 dies de gestació i els 7 de lactació, però la seva expressió variarà en funció del cicle estral (Nagano i Kelly, 1994). A més a més, ambdues formes es poden trobar en altres teixits on hi haurà dominància d'una forma respecte de l'altra. Com exemple, en la glàndula mamària la forma llarga sempre domina sobre la forma curta, la qual representa, durant el proestre, un 10% del total de PRL-R i durant el diestre, un 15%. On s'observen les diferències més grans és en l'ovari, on sempre predomina la forma llarga sobre la curta, si bé, durant el proestre la forma curta representa un 22% del total de PRL-R i durant el diestre passa a ser un 45% (Nagano i Kelly, 1994). Durant tota la gestació el cos luti expressa ambdues formes de PRL-R, amb domini de la forma llarga, però als voltants del part l'expressió del PRL-R disminueix dràsticament (Telleria *et al*, 1997). La pròpia PRL pot estimular l'expressió del seu receptor mitjançant mecanismes regulats pels enzims tirosin-quinasa i quinasa A (Telleria *et al*, 1997).

### **1.8.7. Altres indicadors de la funcionalitat reproductiva**

#### **1.8.7.1. IGF-I, Insulina i els seus receptors**

El sistema dels IGFs [IGF-I, IGF-II i les proteïnes lligands d'IGF (IGFBP)], té efectes tròfics i esteroidogènics en les cèl·lules de la granulosa i en la regulació de la supervivència i maduració dels fol·licles (Zhou i Bondy, 1993). Aquesta acció és augmentada sinèrgicament per l'FSH (deMoura *et al*, 1997; Perks *et al*, 1999). D'altra banda, aquest sistema també participa en la regulació de l'activitat de l'aromatasa i de la síntesi de progesterona (Perks *et al*, 1999). L'expressió de l'ARNm del receptor d'IGF-I (IGF-IR) és abundant en els ovaris d'animals adults, sobretot, en les cèl·lules de la granulosa i en els fol·licles. En canvi, en animals prepúbere hi ha menor expressió indicant que les gonadotrofines juguen un paper important en l'expressió de l'ARNm per a l'IGF-I i per al seu receptor (Zhou i Bondy, 1993). En ordre d'importància, l'expressió pel receptor d'IGF-I és màxima en els oòcits, decreixent en les cèl·lules de la granulosa i finalment en les cèl·lules de la teca interna i en l'estroma. En l'oòcit no s'ha detectat la presència d'ARNm per a IGF-I i IGF-II (Zhou i Bondy, 1993). L'IGF-II abunda, però, en les cèl·lules de la granulosa i en els vasos sanguinis

(Zhou i Bondy, 1993). En els cossos lutis hi ha expressió de l'IGF-I i IGF-II durant la gestació, segurament estimulant la producció de progesterona. En canvi, durant els cicles estrals disminueix significativament l'expressió d'ambdós factors. El que es manté constant, però, és el IGF-IR (Perks *et al*, 1999).

La insulina i l'IGF-I estimulen la síntesi d'ADN en les cèl·lules de la teca interna quan s'uneixen al IGF-IR. Aquest fet es tradueix en un augment de l'esteroidogènesi i es dona en condicions fisiològiques, i també patològiques com la síndrome de l'ovari poliquístic (PCOS; Duleba *et al*, 1997). En aquesta acció intervé l'IGF-IR i, com a lligands, en primer lloc l'IGF-I i amb menor afinitat i menor activitat l'IGF-II i la insulina. En la rata, les IGFbps també regulen els efectes de l'IGF-I i l'IGF-II, però encara no està clar per quina via (Duleba *et al*, 1997). Les cèl·lules de la teca participen en el control de la funció fol·licular i en el manteniment de la integritat estructural del fol·licle. Aquest paper es basa en el subministrament dels substrats essencials perquè les cèl·lules de la granulosa realitzin la esteroidogènesi. D'aquesta manera la insulina i els IGFs participen en la regulació de l'esteroidogènesi a dos nivells, sobre les cèl·lules de la granulosa i sobre les cèl·lules de la teca interna (Duleba *et al*, 1997). En l'ovari d'algunes espècies, com la bovina, els IGFs es concentren en cèl·lules diferents; els IGF-I es localitzen principalment en les cèl·lules de la granulosa i els IGF-II en les cèl·lules de la teca interna. En canvi, en la rata l'IGF-I s'expressa en ambdós tipus cel·lulars (Hernandez *et al*, 1987).

De IGFbps n'hi ha de diferents tipus. La importància de les IGFbps en la regulació de la funció ovàrica va ser demostrada per Huang *et al* (1997) els quals, amb ratolins transgènics que sobre-expressaven la IGFbp tipus 1 (IGFbp-1), van observar com disminuïa la resposta de l'IGF-I a les gonadotropines, LH i FSH, reduint-ne, en conseqüència, la fertilitat.

En porcs s'ha demostrat com la diabetis causa una disminució del creixement fol·licular i fa augmentar l'atrèsia fol·licular (Edwards *et al*, 1996). Analitzant el sistema IGF s'ha observat com els animals diabètics tenen l'IGF-I sèric disminuït i les IGFbps alterades. Així, la IGFbp-1 està significativament

augmentada, si bé es creu que el principal problema de les IGFbps es troba en la seva activitat, concretament en el seu moviment pels diferents compartiments de l'ovari: sang a fol·licles i cèl·lules de la granulosa, etc. (Howard i Ford, 1992; Edwards *et al*, 1996). Similars efectes sobre l'IGF-I es poden observar en les cèl·lules de la granulosa de porc amb l'administració de glucocorticoides, fet que evidencia l'estreta relació entre l'IGF-I i la funció ovàrica (Viveiros i Liptrap, 1999).

#### **1.8.7.2. Residus de Tirosines fosforilats**

L'estudi del nivell de fosforilació dels residus de tirosines ja s'ha justificat anteriorment. Només destacar que en ovaris de rata s'ha detectat la presència de residus fosforilats de tirosina en cèl·lules de la teca, cèl·lules intersticials i en cèl·lules de la granulosa (Arad-Dann *et al*, 1993).

#### **1.8.7.3. *c-kit* / SCF**

Estudis *in vitro* demostren la necessitat del sistema *c-kit*/SCF pel creixement i desenvolupament de l'oòcit (Packer *et al*, 1994). També se l'hi atorga un paper important en la formació del fol·licle, en la diferenciació de les cèl·lules de la teca i la formació de la cavitat antral (Driancourt *et al*, 2000). El *c-kit* també ha estat localitzat en cèl·lules de la granulosa de fol·licles preantrals i antrals (Driancourt *et al*, 2000). S'ha observat que l'expressió del sistema *c-kit*/SCF està regulat hormonalment. Així, nivells sèrics elevats d'FSH i testosterona coincideixen amb nivells alts de *c-kit*/SCF (Driancourt *et al*, 2000). Finalment, estudis *in vitro* assenyalen la intervenció del sistema *c-kit*/SCF en la supervivència de les oogònies, protegint-les de l'apoptosi (Driancourt *et al*, 2000).

#### **1.8.7.4. Glut 3**

S'ha observat com l'expressió del Glut 3 en l'ovari augmenta durant l'ovulació en les cèl·lules de la granulosa. Aquest augment es pot reproduir *in vitro* mitjançant la incubació amb interleuquina 1 (IL-1), fet que fa pensar en que aquesta interleuquina podria participar en la regulació del

metabolisme dels carbohidrats de l'ovari (Kol *et al*, 1997). Es creu que aquest augment d'expressió, juntament amb el del Glut 1, pot estar motivat per l'increment de les necessitats metabòliques que s'esdevenen durant el creixement fol·licular i durant l'etapa preovulatòria (Kol *et al*, 1997).