

***Resultats II:* FEMELLES**

4.2. EFECTES DE LA DIABETIS I EL TRACTAMENT AMB TUNGSTAT SÒDIC SOBRE LA FUNCIO REPRODUCTIVA FEMENINA

4.2.1. Paràmetres corporals i sèrics

El paràmetre corporal més afectat pel tractament amb tungstat va ser el guany de pes corporal. Així, el tractament causa una disminució d'aquest paràmetre en animals sans, i fins i tot arriba a una pèrdua de pes en els animals DT (taula 14). Val a dir que el guany de pes de les rates DC va ser molt inferior al dels animals SC. D'altra banda, no s'observen diferències rellevants en els nivells de glucosa en sang entre els animals sans controls i els tractats amb tungstat. La diabetis causa un marcat augment de la glucèmia i el tractament amb tungstat la restableix parcialment (taula 14).

De les hormones sèriques estudiades, la insulina, l'LH i l'FSH experimenten una disminució significativa dels seus nivells per causa de la diabetis i el tractament amb tungstat aconsegueix restablir els valors normals d'aquestes hormones, no observant-se variacions significatives en els animals sans. En canvi la progesterona és l'única de les hormones sèriques estudiades que quan la diabetis causa la seva disminució en sèrum el tractament amb tungstat no la pot recuperar (taula 14).

Finalment, en estudiar les possibles correlacions entre els diferents paràmetres sèrics analitzats s'han observat les següents: inversa entre la **glucèmia** i la **insulinèmia** ($r=0,7383$, $p<0,001$); inversa entre la **glucèmia** i la **progesteronèmia** (entre el logaritme de la glucèmia i el logaritme de la progesterona; $r=-0,4362$, $p<0,05$); directa entre la **insulinèmia** i la **progesteronèmia** (entre la insulinèmia i el logaritme de la progesterona en sang; $r=0,4711$, $p<0,05$); directa entre la **progesterona** en sang i l'**LH** (entre la progesterona i l'exponencial de la LH; $r=0,445$, $p<0,05$) i directa entre l'**LH** i l'**FSH** (entre el logaritme de l'LH i el logaritme de l'FSH; $r=0,4092$, $p<0,05$).

	SC (n= 15)	ST (n = 15)	DC (n = 10)	DT (n = 15)
Guany de Pes corporal (g/ període de tractament)	77,2±3,0 ^a	45,7±3,5 ^b	20,0±7,1 ^c	-38,8±4,9 ^d
Glucosa sèrica (g/dL)	104,2±2,5 ^a	107,5±3,3 ^a	586,2±6,8 ^b	255,7±10,2 ^c
Insulina sèrica (nmol/mL)	1,1±0,3 ^a	1,1±0,1 ^a	0,0 ^b	0,4±0,1 ^c
FSH sèrica (ng/mL)	65,2±9,8 ^a	68,5±5,3 ^a	45,9±3,3 ^b	116,5±6,3 ^c
LH sèrica (ng/mL)	2,1±0,2 ^a	2,1±0,4 ^a	1,2±0,1 ^b	1,8±0,1 ^a
Progesterona sèrica (ng/mL)	16,1±0,8 ^a	20,2±4,9 ^a	8,3±1,5 ^b	6,9±0,9 ^b

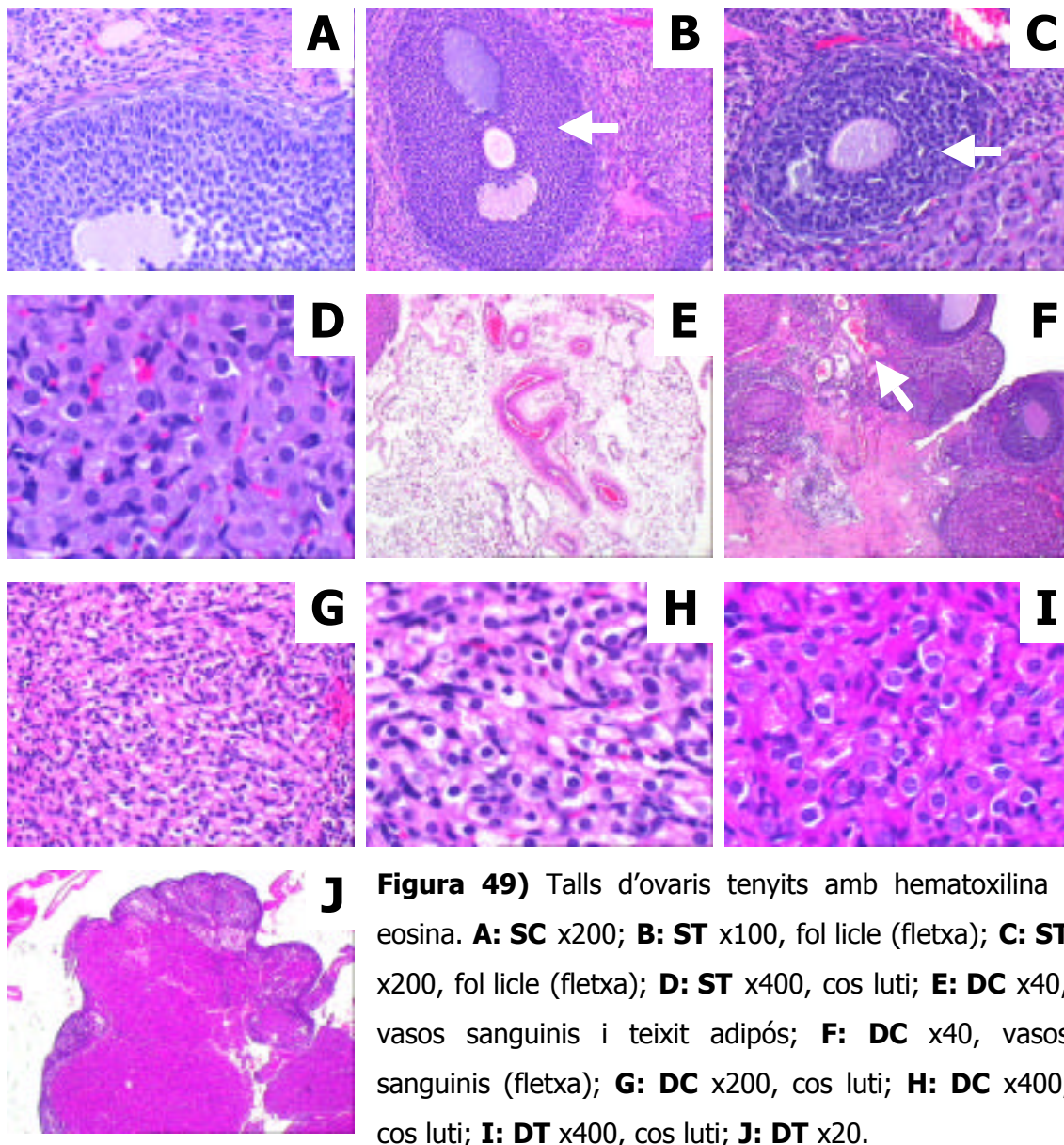
Taula 14. Efectes del tractament amb tungstat sobre diferents paràmetres corporal i sèrics. El guany de pes corporal està expressat com la diferència entre el pes corporal a l'inici i el final de l'experiment. Totes les dades estan expressades com mitjanes±SEM. Diferents superíndexs en una fila indiquen les diferències significatives (P<0.05) entre els grups. El grau de significació es va comprovar utilitzant el Test d'Students-Neumann-Keuls. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*

4.2.2. Anàlisi estructural

4.2.2.1. Ovari

L'anàlisi histològic no mostra grans diferències entre els quatre grups d'animals (figura 49). S'observen ovaris funcionals en tots els grups, amb la presència de fol·licles de diferent tipus, cossos lútics i glàndules fol·liculars (figura 49). Destaca una presència abundant de teixit adipós en tots els tractaments (figura 49 E). Malgrat això, en algunes mostres del grup dels animals DC s'ha observat la presència d'algunes cèl·lules petites amb un nucli picnòtic per tot l'ovari. En els talls dels mateixos animals diabètics control s'han observat cèl·lules gegants en la granulosa, a més d'una significativa

vacuolització d'algunes cèl·lules epitelials dels oviductes, dels cossos lútics i dels fol·licles (figura 49 E-H). Finalment, cal destacar la presència de neovascularització en els animals diabètics, sobretot en els DC (figura 49 E i F).



4.2.2.2. Banyes uterines

No s'han apreciat grans diferències en l'estudi estructural de les banyes uterines entre els diferents grups d'animals. Existeix una important presència de teixit adipós en tots els grups (figura 50-D). L'únic tret diferenciador s'observa en la presència de cèl·lules d'infiltració en l'estroma. Entre els animals sans no s'observen diferències. En canvi, les femelles

diabètiques tenen una major presència d'aquestes cèl·lules, sent-ne encara més evident en els animals diabètics tractats amb tungstat sòdic (figura 50 E-I).

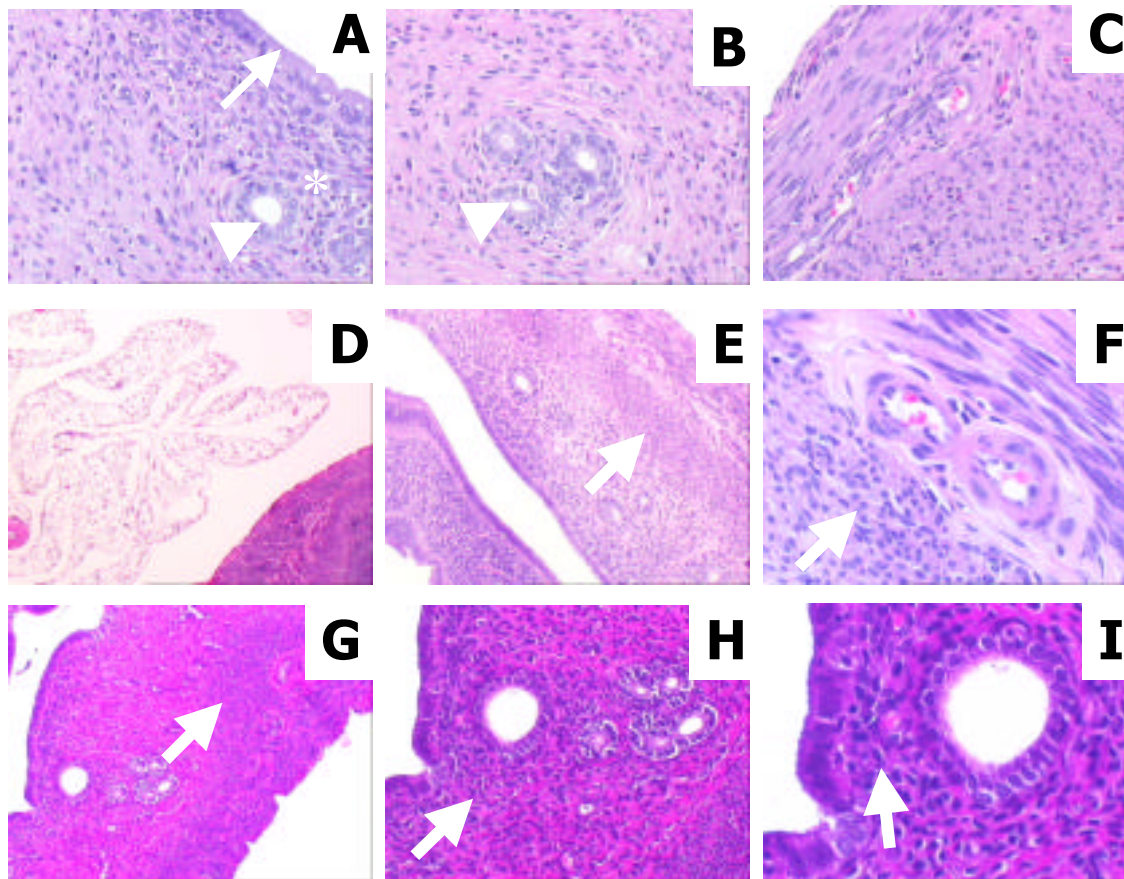


Figura 50) Talls de banyes uterines tenyits amb hematoxilina i eosina. **A: SC** x200, endometri (asterisc), epiteli de la llum (fletxa), epiteli de glàndules uterines (punta de fletxa); **B: endometri SC** x200, epiteli de glàndules uterines (punta de fletxa); **C: miometri SC** x200; **D: teixit adipós DT** x40; **E: DC** x40, cèl·lules d'infiltració (fletxa); **F: DC** x100, cèl·lules d'infiltració (fletxa); **G: DC** x400, cèl·lules d'infiltració (fletxa); **H: DT** x100, cèl·lules d'infiltració (fletxa); **I: DT** x200, cèl·lules d'infiltració (fletxa); **J: DT** x400, cèl·lules d'infiltració (fletxa).

4.2.2.3. Tinció de PAS

La tinció de PAS no mostra diferències significatives entre els quatre grups experimentals. La presència de material PAS (+) es localitza majoritàriament en la membrana de l'oòcit i en l'estroma més pròxim als vasos sanguinis (figura 51). Igualment s'observa marcatge en els cossos lútis. Destaca el fort marcatge de l'epiteli ciliat de l'oviducte, el qual es manté en els quatre

grups (figura 51 F). En les banyes uterines s'observa material PAS (+) en tots els diferents tipus cel·lulars (figura 51).

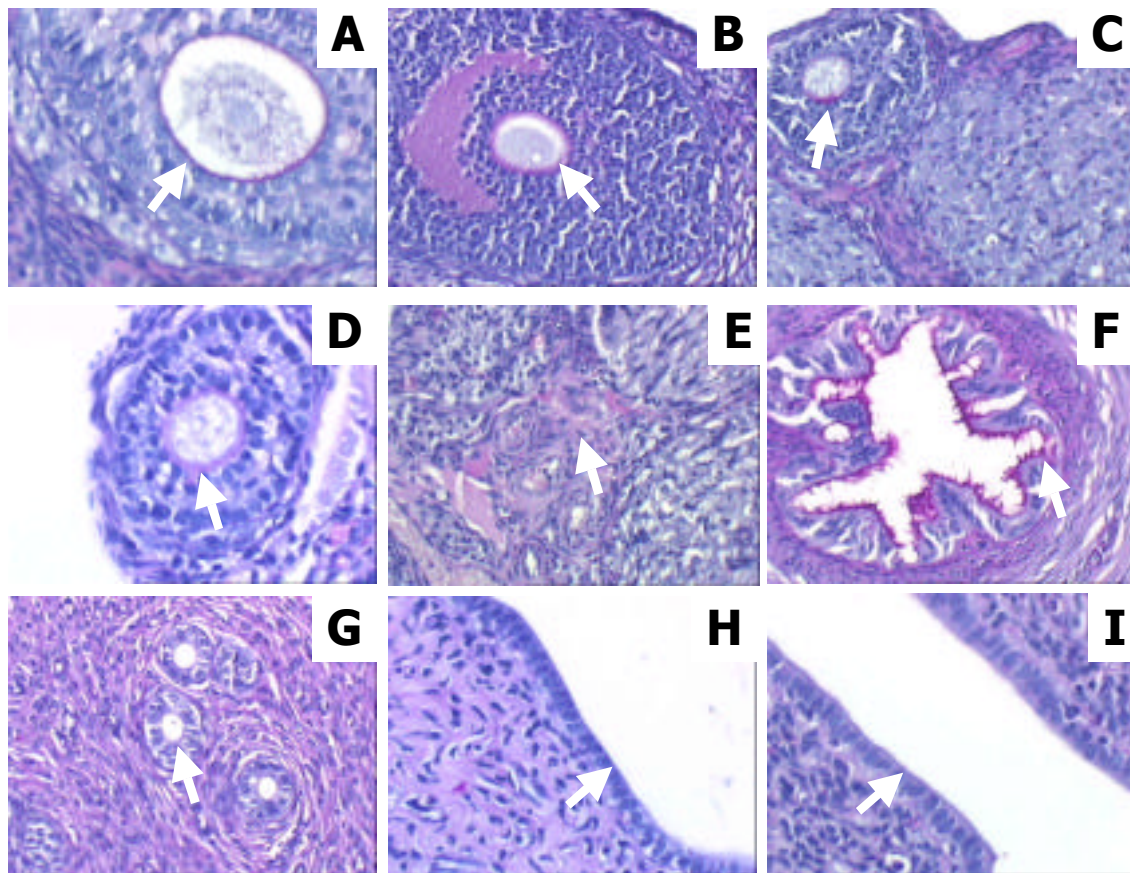


Figura 51) Tinció de PAS. **A: Ovari SC** x400, membrana de l'oòcit (fletxa); **B: Ovari ST** x200, membrana de l'oòcit (fletxa); **C: Ovari DC** x200, membrana de l'oòcit (fletxa); **D: Ovari DT** x400, membrana de l'oòcit (fletxa); **E: Ovari DC** x200, estroma (fletxa); **F: Oviducte ST** x200, epiteli ciliat de l'oviducte (fletxa); **G: Banyes uterines ST** x200, endometri, glàndules uterines (fletxa); **H: Banyes uterines DC** x400, epiteli de la llum (fletxa); **I: Banyes uterines DT** x400, epiteli de la llum (fletxa).

4.2.3. Anàlisi ultraestructural

Per l'estudi ultraestructural només s'ha pogut treballar amb l'observació de cossos lútics. En aquest estudi, no s'han observat diferències significatives entre els quatre grups d'animals (dades no mostrades).

4.2.4. Patró de distribució de proteïna

Per l'observació del patró de distribució de proteïna de les mostres d'ovari i banyes uterines es va realitzar una tinció amb Blau de Coomassie de

gels d'acrilamida. En l'ovari s'observen dues bandes principals de proteïna, una de 60 kDa i l'altre de 40 kDa (figura 52). En les banyes uterines destaquen dues bandes, una d'uns 90 kDa i l'altre d'uns 60 kDa. En els animals DC les dues bandes mostren menor intensitat que la resta de grups experimentals, recuperant-se la intensitat en els animals DT (figura 52).

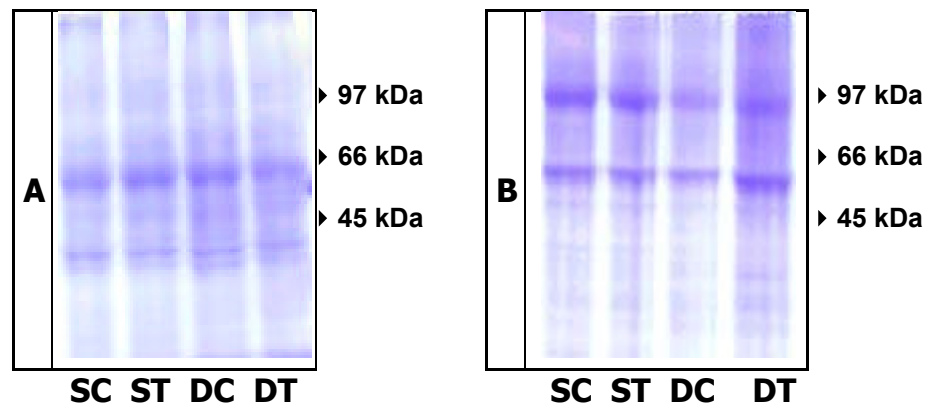


Figura 52) Patró de distribució de proteïna en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.5. Expressió del receptor d'estrògens

El Western Blot pel receptor d'estrògens mostra una banda específica d'uns 50 kDa (figura 53), que coincideix, aproximadament, amb el publicat per Choi *et al* (2001). En l'ovari, s'observa una major expressió en els animals diabètics, més marcadament en els DC. En canvi, en les banyes uterines dels animals diabètics hi ha una disminució dels nivells d'expressió, sent més marcada en els animals DT (figura 53).

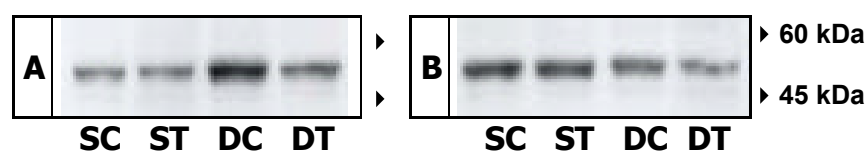


Figura 53) Expressió del receptor d'estrògens en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic de l'expressió del receptor d'estrògens ens mostra un marcatge en fol·licles de tot tipus, si bé s'observen alguns sense marca. La senyal fol·licular es localitza en les cèl·lules de la granulosa i en les cèl·lules més grans de la teca. En cap cas no s'observen diferències evidents entre els quatre grups d'animals. En els cossos lútics dels diferents tractaments s'observa un marcatge difús, destacant, per la seva major intensitat, el marcatge de les cèl·lules més grans. En l'oviducte dels animals sans, tant els controls com els tractats amb tungstat, s'observa un marcatge no polaritzat. Aquest marcatge es perd amb la diabetis però el tractament amb tungstat sòdic el recupera parcialment (taula 15; figura 66).

En les banyes uterines s'observa un clar marcatge en el miometri, el qual disminueix lleugerament en els animals DC. La mateixa situació sembla observar-se en les glàndules uterines (figura 66).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	++	++	++	++	
	Cos Lútic	++	++	++	++	
	Oviductes	++	++	-	+	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+	+	+	+
		Glàndules uterines	+	+	-	+
	MIOMETRI		++	++	+	++

Taula 15) Nivells d'expressió del receptor d'estrògens en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.6. Expressió del receptor d'andrògens

El Western Blot per receptor d'andrògens mostra dues bandes, d'uns 100 i 200 kDa. Aquest resultat concorda amb l'observat per Johnson *et al* (1987). En l'ovari, la diabetis augmenta lleument l'expressió d'ambdues bandes (figura

54). En les banyes uterines els animals DC tenen menor expressió de la banda de 100 kDa (figura 54).

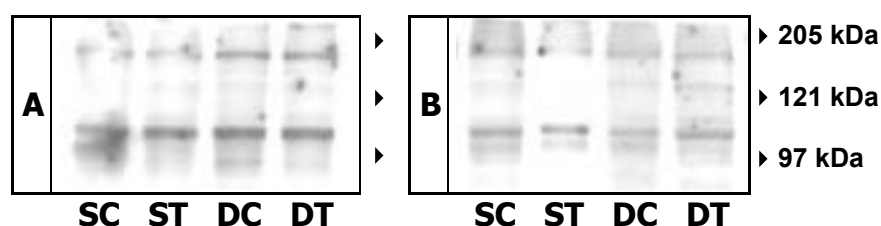


Figura 54) Expressió del receptor d'andrògens en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

L'estudi immunohistoquímic dels nivells d'expressió del receptor d'andrògens en l'ovari no mostra marcatge en els fol·licles. En els cossos lutis s'observa un marcatge intens, sobretot en les cèl·lules més grans, sense observar-se diferències entre els quatre grups. El marcatge dels oviductes és feble i igual entre els diferents tractaments (taula 16). En les banyes uterines no s'ha observat cap marcatge per l'expressió del receptor d'andrògens.

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	-	-	-	-	
	Cos Luti	++	++	++	++	
	Oviductes	+	+	+	+	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	-	-	-	-
		Glàndules uterines	-	-	-	-
	MIOMETRI		-	-	-	-

Taula 16) Nivells d'expressió del receptor d'andrògens en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

4.2.6. Expressió del receptor de progesterona

El Western Blot pel receptor de progesterona mostra una banda específica d'uns 70 kDa, resultat similar a l'observat per Tai *et al* (1986). L'ovari mostra un augment en els nivells d'expressió d'aquest receptor en els animals diabètics, sent-ne més marcat en el grup DC (figura 55). Així mateix, els animals sans tractats amb tungstat tenen menor expressió que els sans control. D'altra banda, en les banyes uterines s'observa una disminució dels nivells d'expressió amb la diabetis, tant en els controls com en els tractats amb tungstat sòdic (figura 55).

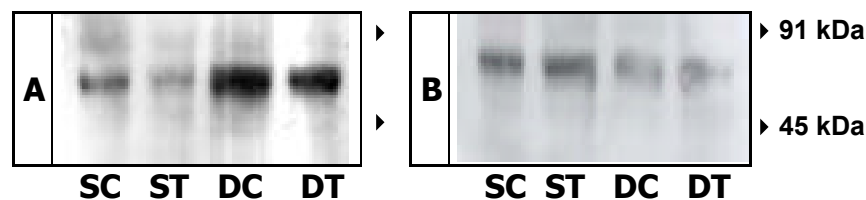


Figura 55) Expressió del receptor de progesterona en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** rata sana control, **ST:** rata sana tractada amb tungstat sòdic, **DC:** rata diabètica control, i **DT:** rata diabètica tractada amb tungstat sòdic.

De l'estudi immunohistoquímic destaca el marcatge intens i generalitzat de tot l'ovari. Els fol·licles expressen el receptor en totes les cèl·lules, excepte en les cèl·lules de la teca interna dels fol·licles més grans. Els cossos lútics mostren un marcatge intens. Destaca el marcatge clarament polaritzat dels oviductes. En cap cas s'han observat diferències evidents entre els quatre grups d'animals (figura 67).

En les banyes uterines s'observa una expressió suau i polaritzada en l'epiteli de la llum de l'endometri. El marcatge de les glàndules uterines és més intens que el de l'epiteli de la llum però cal destacar que el senyal més intens és el que s'observa en el miometri. De manera similar a l'ovari, no s'observen diferències evidents entre els diversos grups experimentals (figura 67).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	+++	+++	+++	+++	
	Cos Luti	+++	+++	+++	+++	
	Oviductes	+++	+++	+++	+++	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+	+	+	+
		Glàndules uterines	++	++	++	++
	MIOMETRI		+++	+++	+++	+++

Taula 17) Nivells d'expressió del receptor d'FSH en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.7. Expressió del receptor d'FSH

El Western Blot mostra una banda específica d'uns 70 kDa, resultat equiparable a l'observat per Misrahi *et al* (1996). Tant en l'ovari com en les banyes uterines s'observa una disminució en els animals DC respecte a la resta de grups experimentals (figura 56).

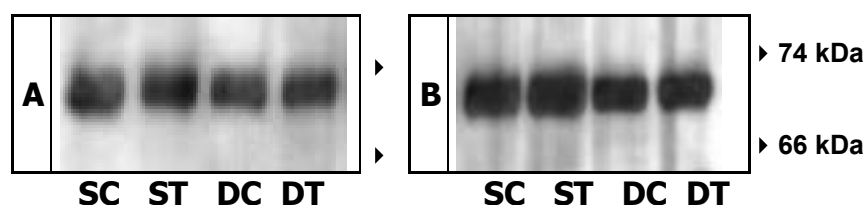


Figura 56) Expressió del receptor d'FSH en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic de l'ovari dels quatre grups d'animals, només mostra un marcatge en l'estroma similar en tots els grups experimentals.

Així mateix, en les banyes uterines només s'observa marcatge no polaritzat en l'epiteli de la llum de l'endometri, en l'estroma de l'endometri i en el miometri el qual no varia en cap dels grups experimentals.

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	-	-	-	-	
	Cos Luti	-	-	-	-	
	Oviductes	-	-	-	-	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+	+	+	+
		Glàndules uterines	-	-	-	-
	MIOMETRI		+	+	+	+

Taula 18) Nivells d'expressió del receptor d'FSH en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi dels nivells d'ARNm del receptor d'FSH en ovari mostra un nivells similars entre els grups SC i ST, tot i que el tractament amb tungstat els disminueix lleument. La diabetis causa una disminució aproximada del 20 a 25% en els nivells d'ARNm. El tractament amb tungstat els recupera arribant, als valors normals (figura 57). En les banyes uterines, els grups d'animals ST tenen una disminució en l'expressió d'un 15% aproximadament, respecte als SC. Amb la diabetis hi ha una forta caiguda respecte als SC, d'un 60%, dels nivells d'ARNm. El tractament amb tungstat els recupera parcialment (figura 57).

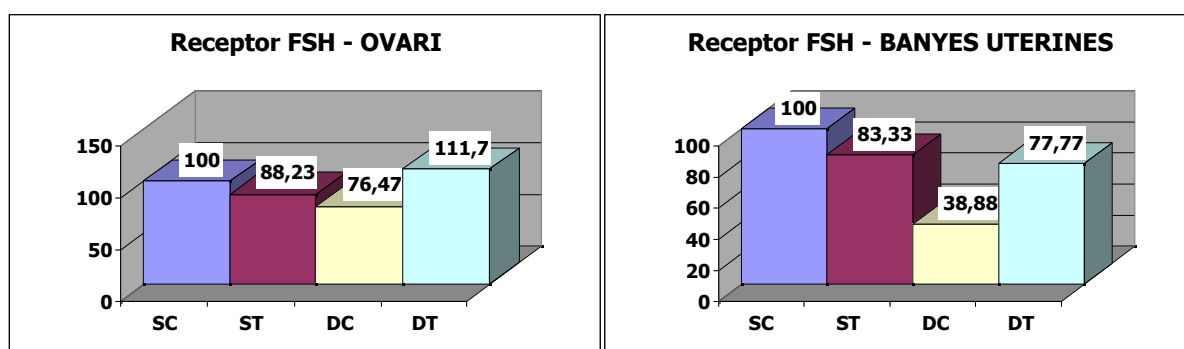


Figura 57) PCR semi-quantitativa pel receptor d'FSH en ovari i banyes uterines. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com a 100. La resta de grups es comparen sobre la base dels SC. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.8. Expressió del receptor d'LH

L'estudi dels nivells d'ARNm pel receptor d'LH en els ovaris per PCR semi-quantitativa mostra igualtat entre els animals sans. La diabetis causa una forta disminució dels nivells d'ARNm, fins a un 50%, sense que el tractament amb tungstat pugui recuperar-los (figura 58). En les banyes uterines es dona la mateixa situació però no tan marcada ja que la disminució és d'un 30 a 35% (figura 58).

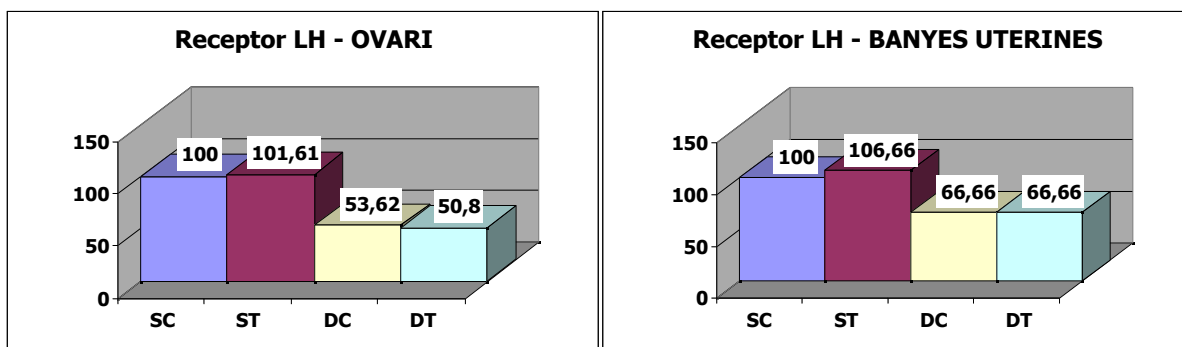


Figura 58) PCR semi-quantitativa pel receptor d'LH. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com a 100. La resta de grups es comparen sobre la base entatge dels SC. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.9. Expressió del receptor de prolactina

L'estudi dels nivells d'ARNm per PCR semi-quantitativa del receptor de PRL en ovari mostra un increment d'un 20% en els ST respecte als animals SC. Aquest increment es manté en les rates DC i DT (figura 59).

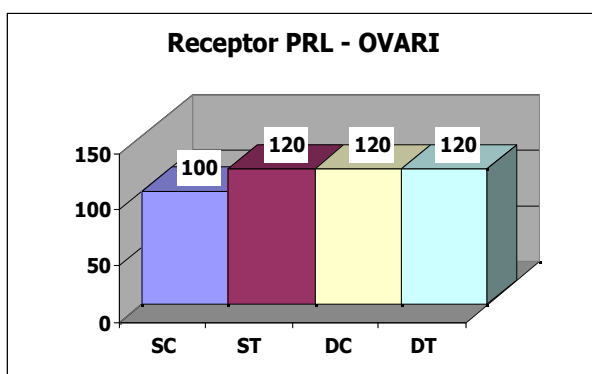


Figura 59) PCR semi-quantitativa pel receptor de PRL. De manera arbitrària s'ha fixat el grup **SC** com a 100. La resta de grups es comparen sobre la base dels SC. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.10. Expressió del receptor d'IGF-I

El Western Blot dels ovaris i les banyes uterines mostra una banda específica d'uns 130 kDa, el mateix que han observat Talavera i Menon (1991). Aquesta banda té el mateix nivell d'expressió en els quatre grups d'animals (figura 60).

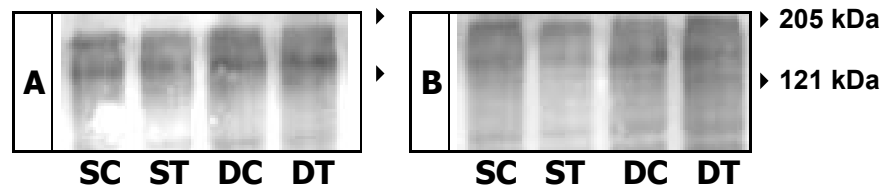


Figura 60) Expressió del receptor d'IGF-I en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic dels animals SC mostra un marcatge intens dels fol·licles, el qual es distribueix entre l'òocit, amb un marcatge molt intens, i la *corona radiata* i la granulosa que mostren un marcatge menys intens. En fol·licles primaris i secundaris, el marcatge és més fluix. Les glàndules fol·liculars tenen un marcatge evident en les cèl·lules epitelials. En el cos luti s'observa un marcatge difús de les cèl·lules luteíniques. L'epiteli oviductal ciliat presenta un marcatge en la zona apical. Aquesta distribució de marcatge és molt similar en tots els grups experimentals. Les úniques diferències s'observen a nivell de fol·licles, on el grup SC mostra la major intensitat i el tractament amb tungstat provoca una disminució de marcatge fol·licular, tant en animals sans com en diabètics (figura 69; taula 19).

En les banyes uterines dels animals sans s'observa un marcatge intens en la zona apical de les cèl·lules epitelials de la llum de l'endometri. També s'observa un marcatge polaritzat en les glàndules uterines, si bé no és tan intens. Finalment, destaca un marcatge significatiu en cèl·lules musculars del miometri. Amb la diabetis el marcatge disminueix significativament, tant en els controls com en els animals tractats amb tungstat sòdic (figura 70; taula 19).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	+++	+	++	+	
	Cos Luti	++	++	++	++	
	Oviductes	++	++	++	++	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+++	+++	++	++
		Glàndules uterines	++	++	+	+
	MIOMETRI		++	++	+	+

Taula 19) Nivells d'expressió del receptor per a l'IGF-I en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.11. Nivells d'expressió d'IGF-I

El Western Blot del pèptid d'IGF-I de mostres d'ovari mostra una banda majoritària d'aproximadament 15 kDa (figura 61). S'observa una intensitat lleument major en els animals control, tant sans com diabètics (figura 61).

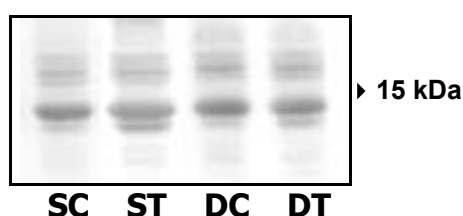


Figura 61) Nivells d'expressió de l'IGF-I en ovari de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.12. Expressió del receptor d'insulina

El Western Blot mostra una banda específica d'uns 130 kDa, que concorda amb l'observat per Nemenoff *et al* (1984). No s'observen diferències significatives entre els quatre grups d'animals, tant en l'ovari com en les banyes uterines (figura 62).

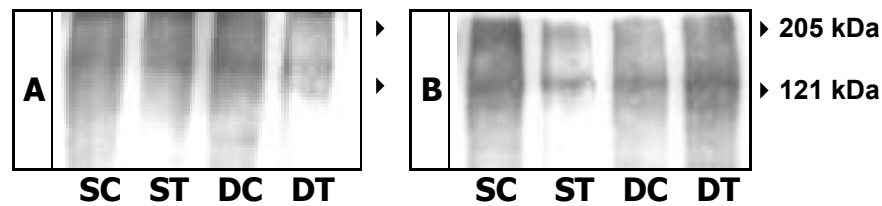


Figura 62) Expressió del receptor d'insulina en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'observació de la immunohistoquímica pel receptor d'insulina en ovaris de rates sanes control ens mostra un marcatge clar en les cèl·lules de la *corona radiata* i de la granulosa dels fol·licles més grans, mentre que les cèl·lules més internes no presenten marcatge. D'altra banda, els fol·licles primaris i secundaris mostren un marcatge irregular. En els cossos lútis s'observa un marcatge positiu en les cèl·lules luteíniques més grans; en canvi, no s'observa marcatge en les cèl·lules més petites. El marcatge de l'epiteli de l'oviducte està polaritzat a la zona apical de la cèl·lula. Amb la diabetis, el marcatge de les cèl·lules més grans dels cossos lútis disminueix significativament i arriba a desaparèixer en les cèl·lules epitelials de l'oviducte. El tractament amb tungstat recupera lleugerament aquesta pèrdua de senyal (figura 71; taula 20).

En les banyes uterines dels animals sans s'observa un marcatge clar en les cèl·lules del miometri. Aquest marcatge disminueix amb la diabetis i no es recupera en els animals DT. En l'endometri només s'observa marcatge no polaritzat en les glàndules uterines. Igualment, aquest marcatge disminueix amb la diabetis, sense que el tractament amb tungstat sòdic el pugui recuperar (figura 71; taula 20).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	++	++	++	++	
	Cos Luti	++	++	+	++	
	Oviductes	++	++	-	++	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	-	-	-	-
		Glàndules uterines	++	++	+	+
	MIOMETRI		++	++	+	+

Taula 20) Nivells d'expressió del receptor d'insulina en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.13. Nivell de fosforilació en residus de tirosines

El Western Blot ens mostra en tots els grups un patró de bandes similar d'on destaquen una d'uns 75 kDa i una altre de 45 kDa. En l'ovari hi ha un augment de la fosforilació amb la diabetis. En canvi, en les banyes uterines hi ha una disminució dels nivells d'expressió amb la diabetis (figura 63).

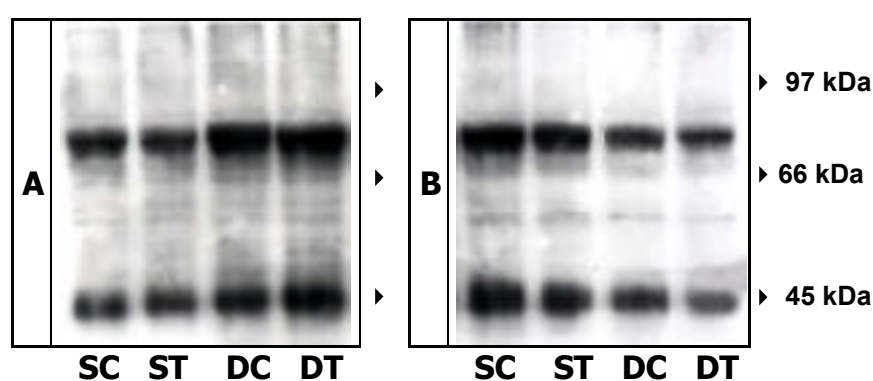


Figura 63) Expressió dels nivells de fosforilació en residus de tirosines en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'estudi immunohistoquímic mostra un marcatge dels fol·licles primaris i secundaris. En aquest nivell no s'observen diferències rellevants entre els quatre grups d'animals. En els cossos lútics s'observa un marcatge difús, principalment localitzat en les cèl·lules més grans. Els oviductes mostren un senyal polaritzat en la zona apical de les cèl·lules. Aquest senyal desapareix en les cèl·lules amb la diabetis mantenint-se en els cilis, i el tractament amb tungstat sòdic el recupera (figura 72; taula 21).

En les banyes uterines només s'observa marcatge en cèl·lules aïllades del miometri i de forma no polaritzada en les cèl·lules epitelials de la llum en l'endometri. La fosforilació en tirosines de les banyes uterines disminueix significativament amb la diabetis, sense que el tractament amb tungstat el pugui recuperar (figura 72; taula 21).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	+	+	+	+	
	Cos Lútic	+	+	+	+	
	Oviductes	++	++	-/+	++	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+	+	+	+
		Glàndules uterines	-	-	-	-
	MIOMETRI		+	+	+	+

Taula 21) Nivells d'expressió de la fosforilació en els residus de tirosines en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

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

4.2.14.1. Nivells d'expressió del SCF

Tant el Western Blot com l'estudi immunohistoquímic ha sortit negatiu pel SCF (dades no mostrades).

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

El Western Blot pel receptor *c-kit* mostra una banda específica d'uns 75 kDa. En l'ovari i les banyes uterines no s'observen canvis significatius entre els diferents grups experimentals (figura 64).

Tampoc s'observen canvis rellevants en el nivell de tirosines fosforilades de *c-kit* entre els diferents tractaments, ni tampoc en els diferents teixits (figura 64).

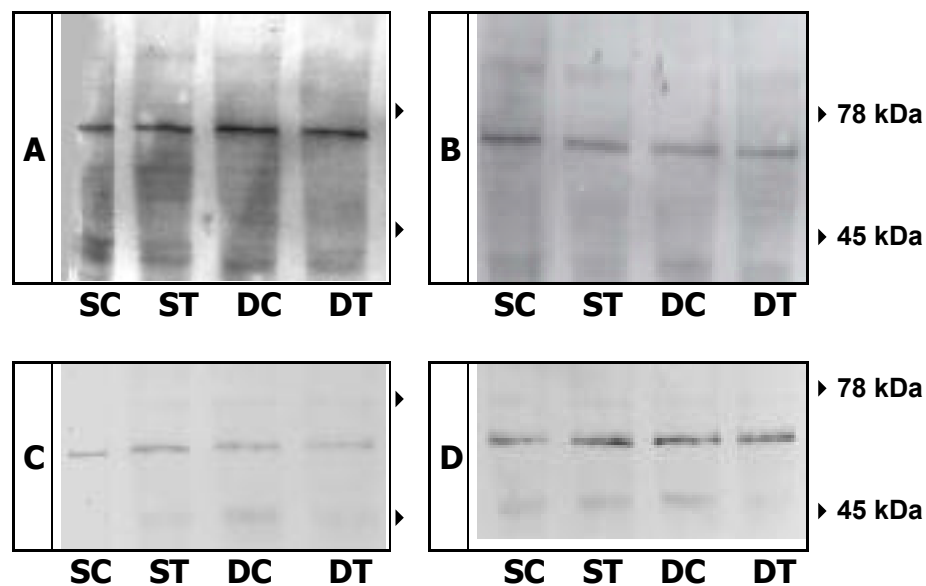


Figura 64) Expressió del receptor *c-kit* en ovari (A) i banyes uterines (B) i l'expressió de la fosforilació en els residus de tirosines del *c-kit* en ovari (C) i banyes uterines (D). **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

L'anàlisi immunohistoquímic mostra una presència del *c-kit* generalitzada en tot l'ovari i l'oviducte. No s'observen diferències entre els diferents grups experimentals (taula 22).

En les banyes uterines s'observa el patró similar al de l'ovari. S'observa un marcatge polaritzat en l'epiteli de l'endometri de la llum. Una intensitat similar de marcatge s'observa en les glàndules uterines. En canvi, el senyal del miometri és difós. En qualsevol cas, no s'observen diferències rellevants entre els quatre grups d'animals (taula 22).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	++	++	++	++	
	Cos Luti	++	++	++	++	
	Oviductes	++	++	++	++	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	++	++	++	++
		Glàndules uterines	++	++	++	++
	MIOMETRI		+	+	+	+

Taula 22) Nivells d'expressió del receptor *c-kit* en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.2.15. Glut 3

El Western Blot mostra dues bandes de 45 i 90 kDa, resultat bastant similar a l'observat per Asano *et al* (1992). La banda més propera a 45 kDa és més intensa en els animals diabètics i encara més en els DC que en els DT (figura 65). Dins els animals sans, els ST són els que tenen menor expressió (figura 65). En les banyes uterines aquestes diferències també apareixen, tot i no ser tan marcades (figura 65).

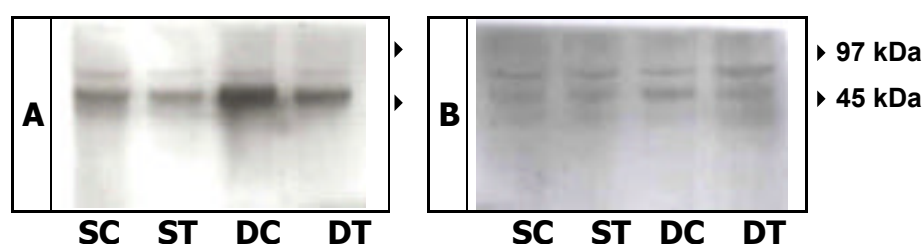


Figura 65) Expressió del transportador d'hexoses Glut 3 en ovari (A) i banyes uterines (B) de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

En l'anàlisi immunohistoquímica pel transportador Glut 3 dels animals sans no s'observa senyal en els fol·licles. En canvi, en els animals diabètics s'observa la presència de marcatge generalitzat en els fol·licles primaris, secundaris i en les cèl·lules de la teca i de la granulosa en els fol·licles més grans. En els cossos lútics de tots els grups d'animals s'observa un marcatge dèbil generalitzat similar. Les cèl·lules epitelials de la llum de l'oviducte presenten una expressió no polaritzada similar en els quatre grups d'animals (taula 23).

En les banyes uterines només s'observa marcatge polaritzat en les cèl·lules epitelials de la llum de l'endometri. Aquesta expressió desapareix amb la diabetis, recuperant-se rera el tractament amb tungstat sòdic (taula 23).

		SC	ST	DC	DT	
OVARI	Fol·licles	-	-	+	+	
	Cos Luti	+	+	+	+	
	Oviductes	+	+	+	+	
BANYES UTERINES	ENDOMETRI					
	Cel. Epitelials	Llum	+	+	-	+
		Glàndules uterines	-	-	-	-
	MIOMETRI		-	-	-	-

Taula 23) Nivells d'expressió del transportador d'hexoses Glut 3 en ovari i banyes uterines de rates sanes i diabètiques tractades amb tungstat, segons l'evidència immunohistoquímica. **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

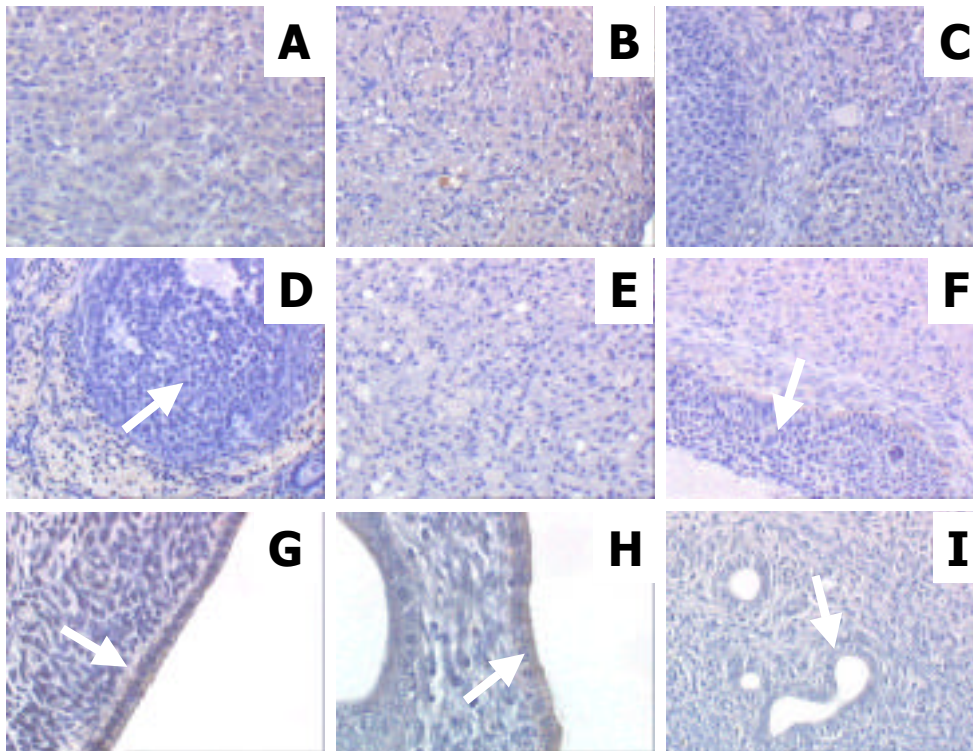


Figura 66) Immunohistoquímica pel receptor d'estrògens. A: Ovari SC x200, cos luti; B: Ovari ST x200, cos luti; C: Ovari ST x200; D: Ovari DC x200, fol licle (fletxa); E: Ovari DC x200, cos luti; F: Ovari DT x200, cèl lules de la teca (fletxa); G: Matriu DC x400, epiteli de la llum (fletxa); H: Matriu DT x400, epiteli de la llum (fletxa); I: Matriu DT x400, epiteli glandular (fletxa).

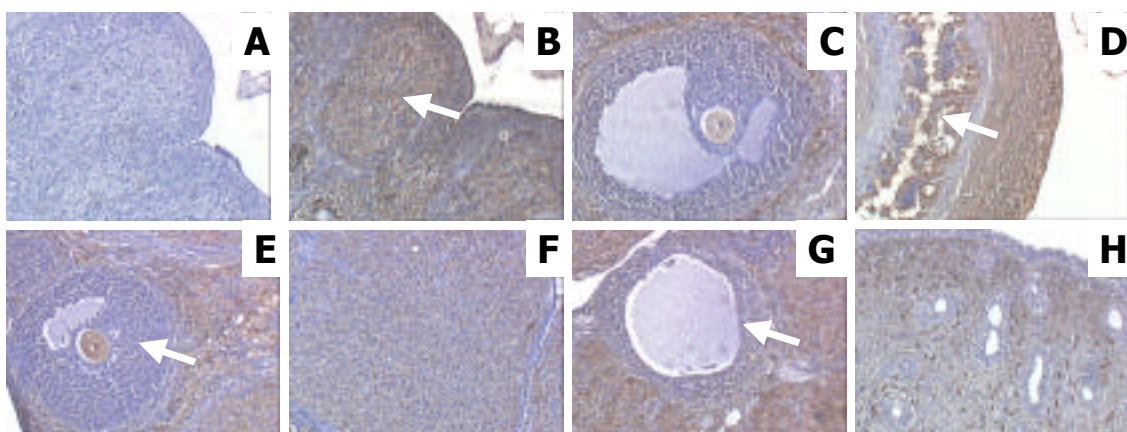


Figura 67) Immunohistoquímica pel receptor de progesterona. A: Ovari SC control negatiu x200, cos luti; B: Ovari SC x200, cos luti (fletxa); C: Ovari ST x200, fol licle; D: Ovari DC x200, oviducte (fletxa); E: Ovari DC x200, fol licle; F: Ovari DC x200, cos luti; G: Ovari DT x200, fol licle (fletxa); H: Matriu DT x200.

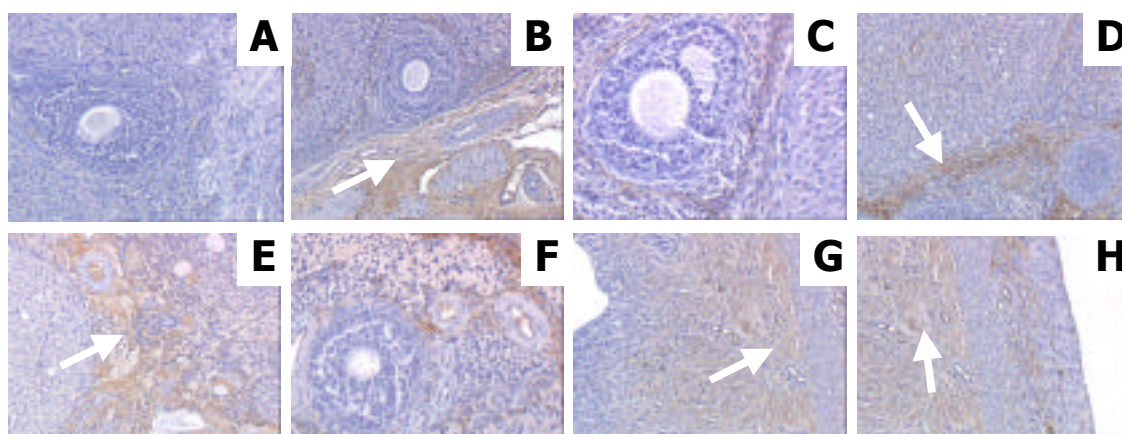


Figura 68) Immunohistoquímica pel receptor d'FSH. **A:** Ovari SC control negatiu x100, fol licle; **B:** Ovari SC x100, estroma (fletxa); **C:** Ovari SC x200, fol licle; **D:** Ovari ST x100, estroma (fletxa); **E:** Ovari DC x100, estroma (fletxa); **F:** Ovari DC x200; **G:** Matriu SC x100, miometri (fletxa); **H:** Matriu SC x100, miometri (fletxa).

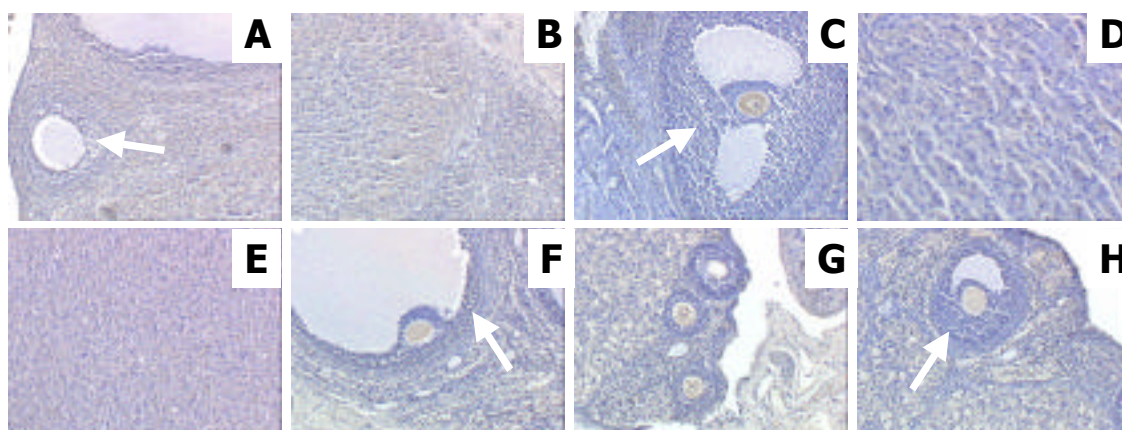


Figura 69) Immunohistoquímica pel receptor d'IGF-I. **A:** Ovari SC x100, fol licle (fletxa); **B:** Ovari SC x100, cos luti; **C:** Ovari ST x200, fol licle (fletxa); **D:** Ovari ST x200, cos luti; **E:** Ovari DC x100, cos luti; **F:** Ovari DT x100, fol licle (fletxa); **G:** Ovari DT x100; **H:** Ovari DT x100, fol licle (fletxa).

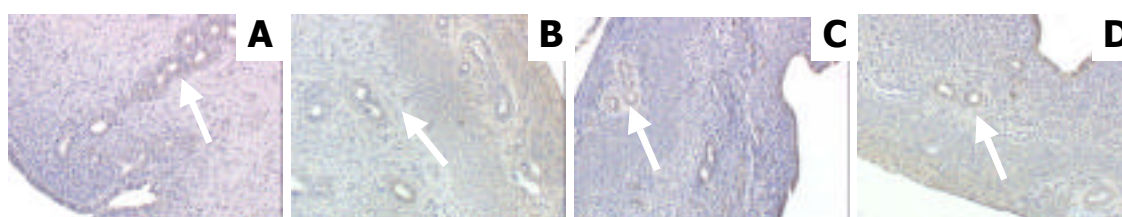


Figura 70) Immunohistoquímica pel receptor d'IGF-I, epiteli glandular (fletxa). **A:** Matriu SC x100;; **B:** Matriu ST x200; **C:** Matriu DC x200; **D:** Matriu DT x200.

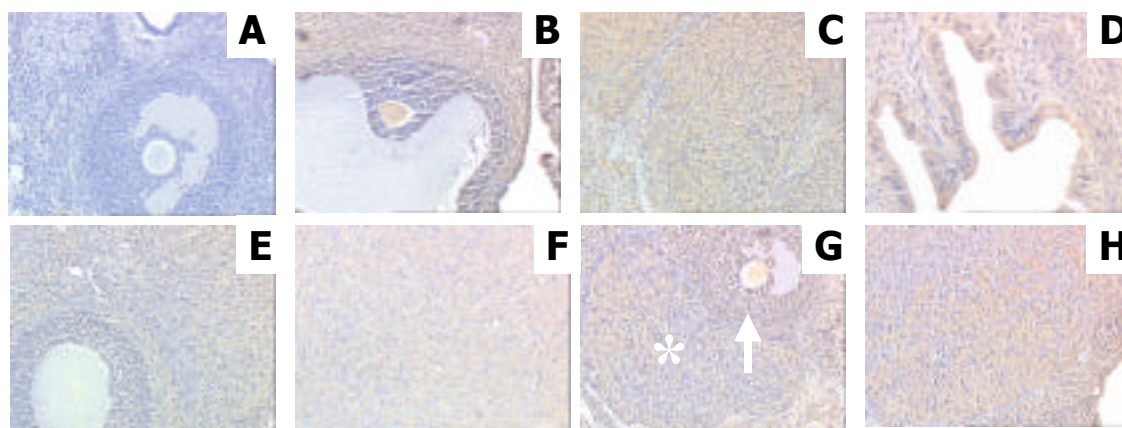


Figura 71) Immunohistoquímica pel receptor d'insulina. A: Ovari control negatiu SC x100, fol licle; B: Ovari SC x100, fol licle; C: Ovari ST x100, cos luti; D: Ovari ST x200, oviducte; E: Ovari DC x100, fol licle; F: Ovari DC x100, cos luti; G: Ovari DT x100, fol licle (fletxa), cos luti (asterisc); H: Ovari DT x100, cos luti.

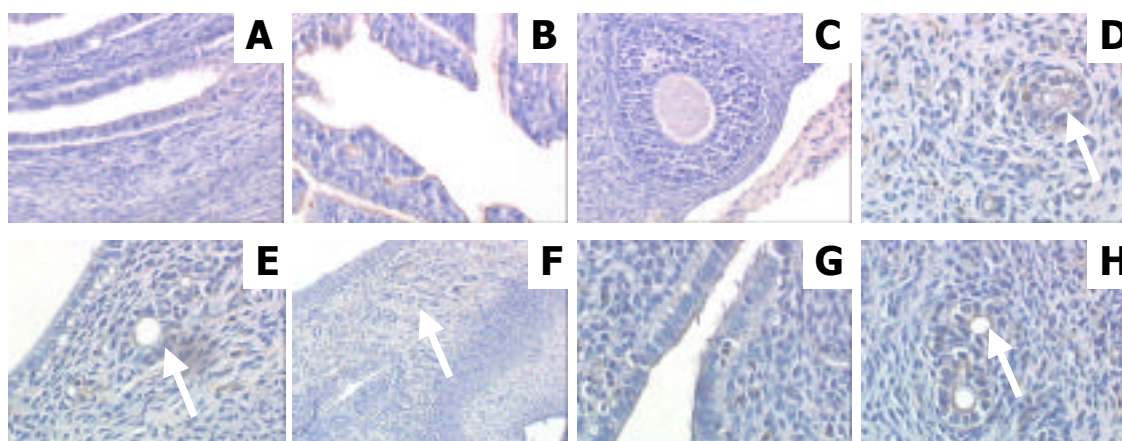


Figura 72) Immunohistoquímica dels nivells de fosforilació en tirosines. A: Ovari SC x200, oviducte; B: Ovari DC x200, oviducte; C: Ovari ST x200, fol licle; D: Matriu SC x400, epiteli glandular (fletxa); E: Matriu ST x400, epiteli glandular (fletxa); F: Matriu DC x100, miometri (fletxa); G: Matriu DT x400(fletxa); H: Matriu DT x400, epiteli glandular (fletxa).

4.3. DADES D'EFICIÈNCIA REPRODUCTIVA

La realització de creuaments entre els diferents grups experimentals ens mostra grans diferències entre els animals sans i els diabètics, tant en mascles com en femelles (taula 24). En els mascles la diabetis causa una clara disminució de la libido, fent que l'índex d'aparellament decreixi. El tractament amb tungstat recupera parcialment aquest paràmetre, si bé no aconsegueix una

recuperació total. En canvi, s'observa com el tungstat en animals diabètics, afecta a la fertilitat i a la prolificitat, fent disminuir aquests paràmetres per sota dels valors dels DC (taula 24).

En les femelles s'observa igualment una accentuada disminució de la libido en les DC, la qual es recupera parcialment amb el tractament amb tungstat. Es pot constatar com la diabetis elimina pràcticament la fertilitat i el tungstat la recupera parcialment (taula 24). Un resultat similar s'observa sobre els valors de prolificitat (taula 24).

MASCLES	Montes observades (%)	Índex d'aparellament (%)	Fertilitat (%)	Prolificitat (cries/part)
SC (n=24)	100,0	62,5	100,0	10,6
ST (n=24)	100,0	71,4	100,0	10,6
DC (n=12)	50,0	11,1	75,0	8,3
DT (n=16)	68,7	18,0	33,3	7,0

FEMELLES	Montes observades (%)	Índex d'aparellament (%)	Fertilitat (%)	Prolificitat (cries/part)
SC (n=24)	100.0	55.5	100.0	10.7
ST (n=24)	100.0	58.8	100.0	10.5
DC (n=12)	21.2	1.6	0	0
DT (n=16)	75.0	14.3	66.6	5.2

Taula 24. Paràmetres reproductius dels creuaments entres els diferents grups experimentals. Les montes observades s'obté de $[(\text{número d'animals que tenen frotis positius}/\text{número d'animals})\times 100]$; l'índex d'aparellament s'obté de $[(\text{número de frotis positius}/\text{suma total de frotis})\times 100]$; la fertilitat s'obté de $[(\text{número de parts}/\text{número de frotis positius})\times 100]$; la prolificitat s'obté de $[(\text{suma total de cries}/\text{número de parts})\times 100]$; **SC:** *rata sana control*, **ST:** *rata sana tractada amb tungstat sòdic*, **DC:** *rata diabètica control*, i **DT:** *rata diabètica tractada amb tungstat sòdic*.

4.4. BIOACUMULACIÓ de tungstat en rates nounates

Els resultats mostren com hi ha una acumulació de tungstat en els animals nascuts de mares tractades amb l'efector (taula 25). Només s'ha treballat amb nounats nascuts de femelles sanes, tant ST (W) com SC (controls).

TRACTAMENT	ng W/gr mostra
W (n=10)	6228.24 ± 1176.73
CONTROL (n=15)	75.05 ± 49.25

Taula 25) Acumulació de tungstat sòdic (W) en cries de 5 dies d'edat provenint de mares que han estat tractades durant tota la gestació.