

4.RESULTATS

4.1 Avaluació morfològica

Les seccions parafinades dels testicles de les rates adultes controls, tenyides amb hematoxilina/eosina, van mostrar una organització morfològica completament normal dels túbuls seminífers, així com una correcta espermatogènesi, coincidint diferents estadis en la mateixa secció (Fig. 15 A i B).

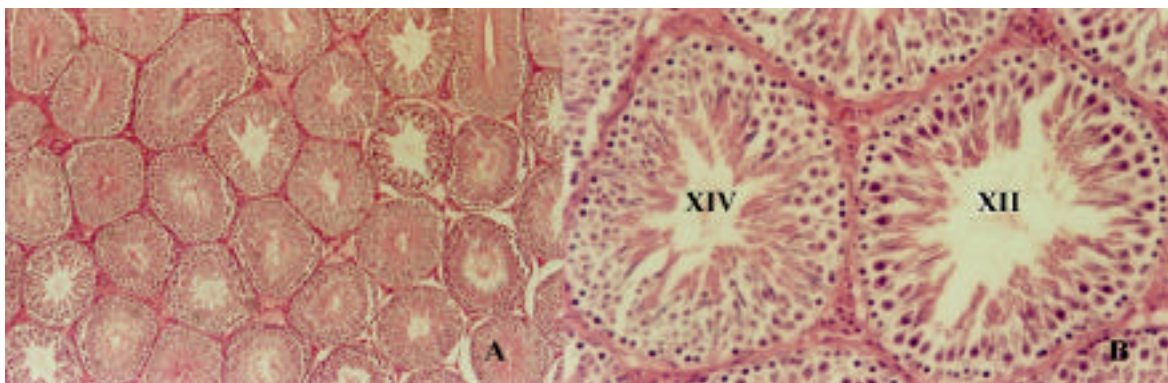


Fig. 15. Estudi morfològic del testicle d'una rata adulta normal

En les seccions parafinades dels testicles de les rates tractades amb EDS, es va poder observar que a les 24h després de l'administració del tòxic, l'organització dels túbuls era completament normal (Fig. 16A), però apareixien cèl·lules a nivell intersticial que presentaven una reducció notòria del seu tamany i la cromatina condensada, i va ser identificades com cèl·lules de Leydig (Fig. 16B).

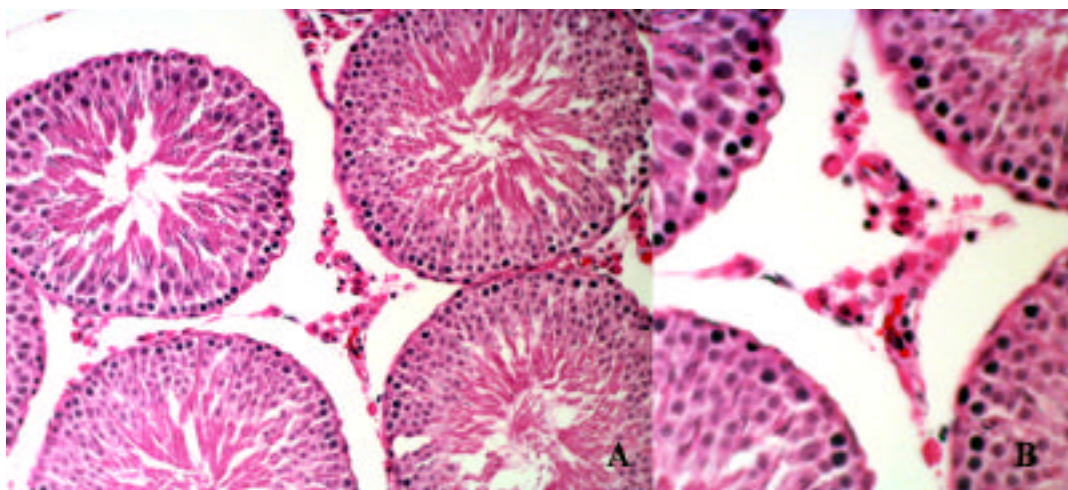


Fig. 16. Estudi morfològic del testicle d'una rata adulta a les 24 hores de ser tractada amb EDS

A partir del 5^è dia es va detectar desorganització cel·lular amb reducció del tamany nuclear en algunes cèl·lules i irregularitat en la forma en altres. Tota aquesta desorganització era major als 7 dies després de l'administració del tòxic (Fig. 17).

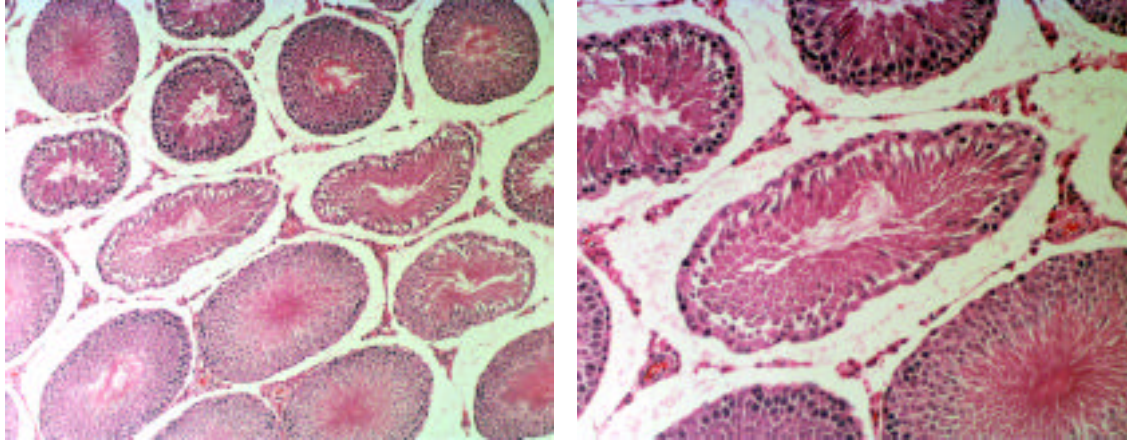


Fig. 17. Estudi morfològic del testicle d'una rata adulta als 5 i 7 dies de ser tractada amb EDS

En les seccions corresponents als testicles de les rates sacrificades 24h després del tractament amb MAA, es va observar la presència d'algunes cèl·lules germinals amb les característiques apoptòtiques abans mencionades, així com la desaparició en alguns túbuls dels espermatòcits primaris en fase de paquitè, que són les cèl·lules afectades pel tòxic (Fig. 18).

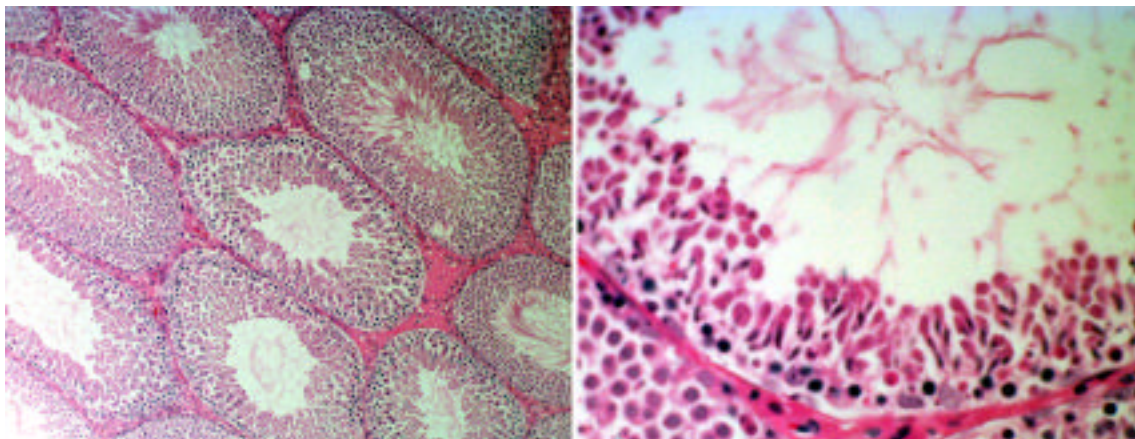


Fig. 18. Estudi morfològic del testicle d'una rata adulta a les 24 hores de ser tractada amb MAA

En els animals sacrificats posteriorment la desorganització era més manifesta. El nombre de cèl·lules va anar disminuint fins arribar al dia 7, moment en el que s'observava una

completa desorganització dels túbuls seminífers, algun d'ells pràcticament buits, moltes cèl·lules en degeneració i gran abundància de cèl·lules gegants multinucleades (dades no mostrades).

4.2 Avaluació “in situ” de l'apoptosi a cèl·lules germinals

En les seccions dels túbuls seminífers corresponents a les rates control, apareixien una o dos cèl·lules germinals aïllades amb el nucli tenyit per túbul (Fig. 19A).

En les seccions dels túbuls seminífers dels testicles de rata sacrificades 24h després del tractament amb EDS, es va observar tinció de nuclis de cèl·lules intersticials, que van ésser identificades morfològicament com cèl·lules de Leydig (Fig. 19B i C). A partir dels 5 dies hi havia un augment considerable de nuclis TUNEL-positius en espermatòcits i en algunes espermatides allargades (Fig. 19D).

En les seccions dels túbuls seminífers de les rates sacrificades 24h després del tractament amb MAA, va aparèixer un nombre molt elevat de cèl·lules germinals TUNEL-positives (Fig. 19E). Segons la seva disposició dins el túbul, la majoria d'aquestes cèl·lules van ser identificades com espermatòcits primaris en fase de paquitè (Fig. 19G). És aquí on es comptabilitzaria el màxim d'apoptosi induït a les cèl·lules germinals per l'acció del MAA. Als 7 dies després del tractament trobem algunes cèl·lules positives per aquesta tècnica però la major part dels túbuls afectats estaven buits de cèl·lules germinals (Fig. 19F).

Els comptatges de les cèl·lules identificades com a positives per l'assaig de TUNEL mitjançant microscopia òptica, va demostrar que el pic d'apoptosi en cada un dels tractaments es corresponia a les 24h en el cas del MAA i als 7 dies en el cas de l'EDS. Cal ressaltar que comparant aquests dos temps de màxima mort, el nombre de cèl·lules TUNEL positives era molt més elevat en el cas del MAA, tot i que el nombre de cèl·lules totals en el túbul, als 7 dies de tractament amb EDS era inferior (taula 2).

ANIMALS	EDAT	TRACTAMENT	DURADA	CEL+/SECCIÓ	TTM/TT	CEL+/TM
Rates Sprague- Dawley	10 setmanes	MAA	Ctrol 1	121	13,80%	1,95±0,96
			Ctrol 2	277	13,18%	4,26±0,3
			1 dia	13,165	89,00%	50,8±9,89
			3 dies	2,309	27,40%	24,3±2,01
			5 dies	764	20,22%	13,9±2,9
			7 dies	319	16,21%	8,20±1,34
		EDS	Ctrol 1	89	7,58%	2,25±1,33
			Ctrol 2	77	7,47%	1,95±1,33
			1 dia	219	27,54%	2,23±0,02
			3 dies	358	24,59%	3,00±0,7
			5 dies	1,218	38,18%	7,62±1,23
			7 dies	3,215	70,18%	22,2±2,1

Taula 2

4.3 Avaluació de la fragmentació del DNA

En l'electroforesi del DNA genòmic procedent dels testicles de les rates controls no es va observar cap tipus de fragmentació (Fig. 20A i B).

L'electroforesi del DNA genòmic va confirmar que la inducció de la fragmentació del DNA apareixia a les 24h en les rates tractades amb EDS, no era evident als 3 dies post-tractament, i es tornava a detectar al 5^e i 7^e dia després del tractament (Fig. 20A).

Pel que fa a les rates tractades amb MAA, el patró en escala apareixia amb molta intensitat a les 24h després del tractament. Progressivament la intensitat de les bandes múltiples de 180 pb anava disminuint fins desaparèixer al 7^e dia post-tractament (Fig. 20B).

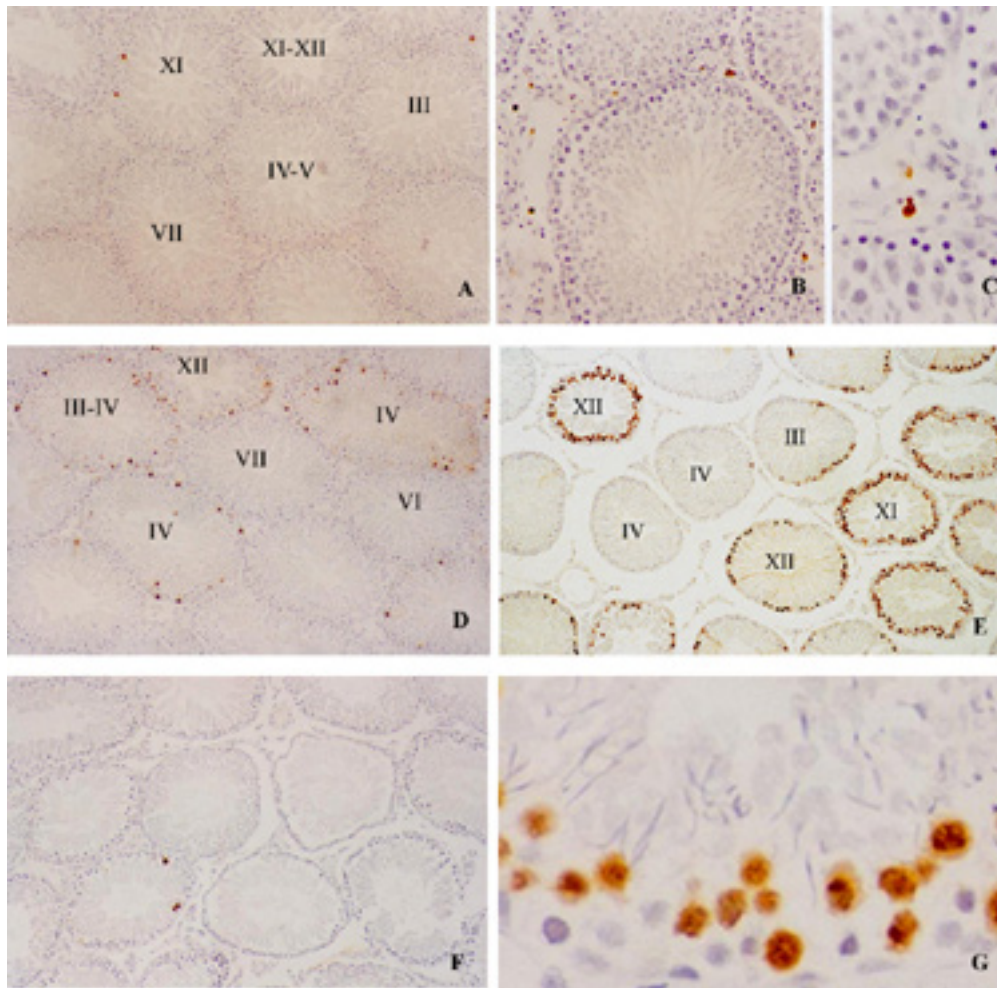


Fig. 19. Comparació de l'assaig de TUNEL entre controls i els 2 tractaments

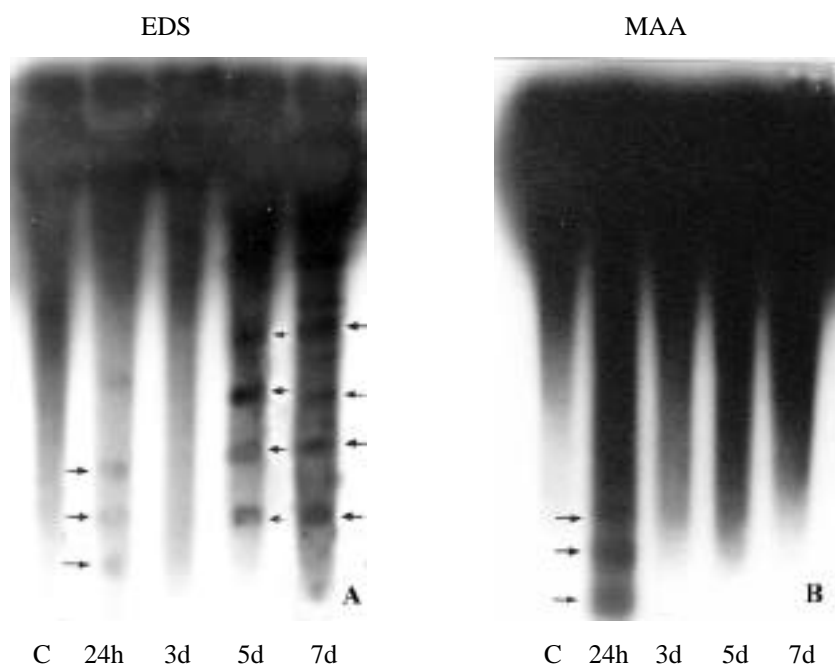


Fig. 20. Fragmentació del DNA en gel d'agarosa

4.4 Expressió del mRNA dels gens de la Família de Bcl-2 i Caspasa-3 després dels tractament amb MAA.

L'expressió del mRNA de bax, bcl-2, bcl-x_L, bcl-x_S i caspasa-3 en cèl·lules germinals aïllades, així com de Bcl-x_L i Bcl-x_S en els totals de testicle procedents d'animals tractats amb MAA van ser analitzats per RT-PCR per determinar més precisament els canvis en els nivells d'aquests mRNAs en relació amb el procés apoptòtic.

A les cèl·lules germinals aïllades dels animals controls, l'expressió dels mRNAs de bax i bcl-2 va ser baixa però detectable i els nivells van augmentar progressivament des de les 3 fins a les 12 hores després del tractament amb MAA (Fig. 21A). Ambdues formes de bcl-x també van ser detectades tant al mRNA procedent de les cèl·lules germinals aïllades com al procedent de les cèl·lules totas testiculars, però els nivells de la seva expressió va variar depenent de si procedia d'un o de l'altre. A les cèl·lules germinals, el mRNA de Bcl-x_L va ser baix en els controls, però va incrementar, coincidint amb els nivells de bax i bcl-2, des de les 3 hores després del tractament, mentre que l'expressió del mRNA de Bcl-x_S va ser baix en els controls, però no van haver-hi diferències significatives després del tractament amb MAA (Fig. 21A).

A les cèl·lules totals testiculars, l'expressió del mRNA de Bcl-x_L va ser alta als controls, i va disminuir des de les 3 hores de tractament, mentre que la de Bcl-x_S va presentar un increment molt significatiu (2 vegades) 3 hores després del tractament i es va mantenir alt fins les 9 hores (Fig. 21B).

L'expressió de mRNA de la Caspasa-3 es va examinar a les cèl·lules germinals aïllades dels animals tractats amb MAA. Es va observar un increment a partir de les 6 hores, i un pic màxim d'expressió a les 12 hores després del tractament amb MAA (Fig. 21A).

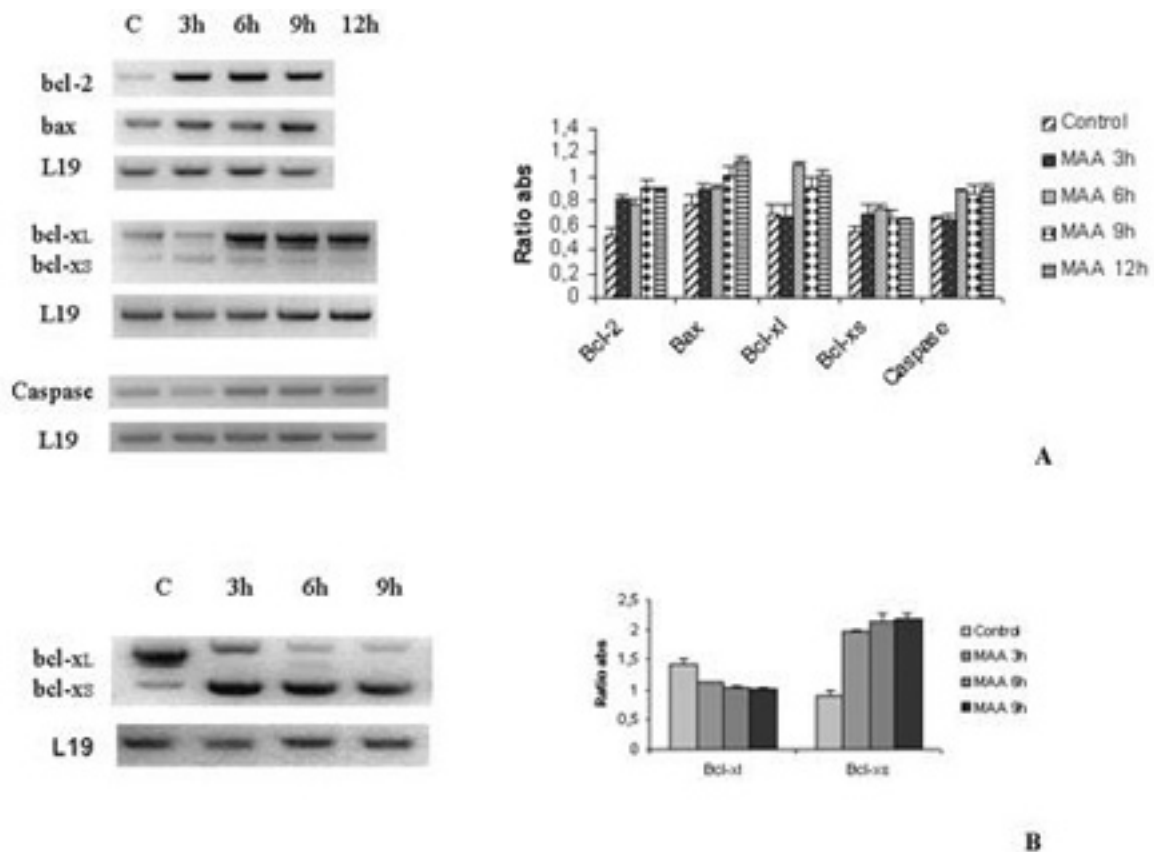


Fig. 21 Expressió dels membres de la família de Bcl-2 i Caspasa-3 en les rates tractades amb MAA.

4.5 Expressió del mRNA de Bax, Bcl-2 i Caspasa-3 després dels tractament amb EDS.

Els nivells del mRNA de Bax, Bcl-2 i Caspasa-3 en cèl·lules germinals procedents d'animals tractats amb EDS va ser analitzats per RT-PCR per determinar més precisament els canvis de la seva expressió en relació amb el procés apoptòtic. No es van observar canvis significatius en els nivells de mRNA de Bcl-x en els animals tractats amb EDS (dades no mostrades).

A les cèl·lules germinals aïllades dels animals controls, a l'igual que en el cas dels animals tractats amb MAA, l'expressió dels mRNAs de bax i bcl-2 va ser baixa però detectable. Els nivells van augmentar progressivament a les 24 i 36 hores. L'expressió de bcl-2 va disminuir significativament a les 72 hores, encara que es va mantenir superior a la dels controls. L'expressió de bax va continuar elevada a les 72 hores (Fig. 22).

Els nivells de mRNA de la caspasa-3 van incrementar a les 24 hores així com als 5 i 7 dies després de l'administració d'EDS (Fig. 22).

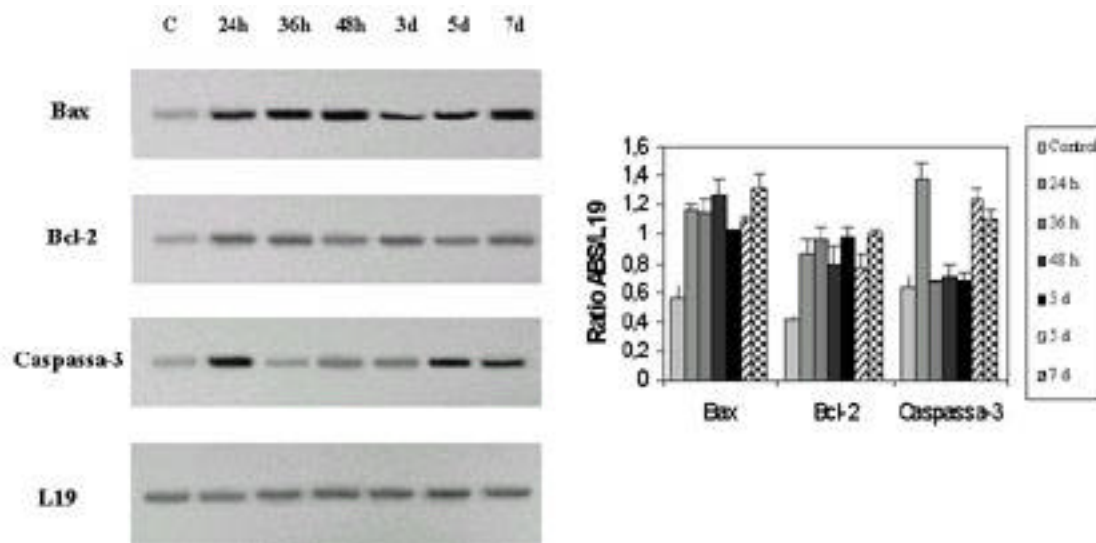


Fig. 22. Expressió dels membres de la família de Bcl-2 i Caspasa-3 en les rates tractades amb EDS

4.6 Immunodetecció de BAX i Bcl-2 en espermatòcits en fase de paquità després de l'administració de MAA en relació amb la distribució del marcatge per la tècnica de TUNEL.

L'examen del marcatge de tunel en els testicles tractats amb MAA va revelar una distribució del producte de reacció en espermatòcits primaris en fase de paquità començant 6 hores després de l'administració del tòxic (Taula 3). El màxim nombre de cèl·lules positives per aquesta tècnica va ser en els estadis més tardans del cicle espermatogènic, específicament als estadis XI-XII.

La presència de marcatge estadi específic en espermatòcits primaris en fase de paquità ens va dur a investigar si el mateix marcatge era evident per BAX i Bcl-2. Als animals controls, la immunotinció per a BAX va ser detectada al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli i a espermatòcits primaris en fase de paquità en alguns túbuls. La proteïna Bcl-2 no va ser detectada (dades no mostrades).

Temps post MAA	ESTADIS I-III	ESTADI VII	ESTADIS XI-XIII
3 hores	0	0	0.70 ± 0.24
6 hores	1.93 ± 0.32	0	4.03 ± 1.34
9 hores	20.70 ± 1.75	0	24.56 ± 1.89
12 hores	14.60 ± 2.3	0	58.50 ± 0.86
24 hores	6.93 ± 0.77	0	71.90 ± 2.51

Taula 3

En els animals tractats amb MAA, la presència de BAX i Bcl-2 va ser evident en el citoplasma del espermatòcits primaris en fase de paquitè dels túbuls afectats començant 9 hores després de l'administració del tòxic, assolint nivells màxims a les 12 hores (Fig. 23) i mantenint-se elevats a les 24 hores. Quan es van analitzar seccions seriades es va poder observar que alguns espermatòcits primaris en fase de paquitè, presentaven co-localització a nivel testicular de la immunoreactivitat per a BAX i Bcl-2, malgrat que la intensitat del marcatge de Bcl-2 era més marcada que la de BAX (Fig. 23)

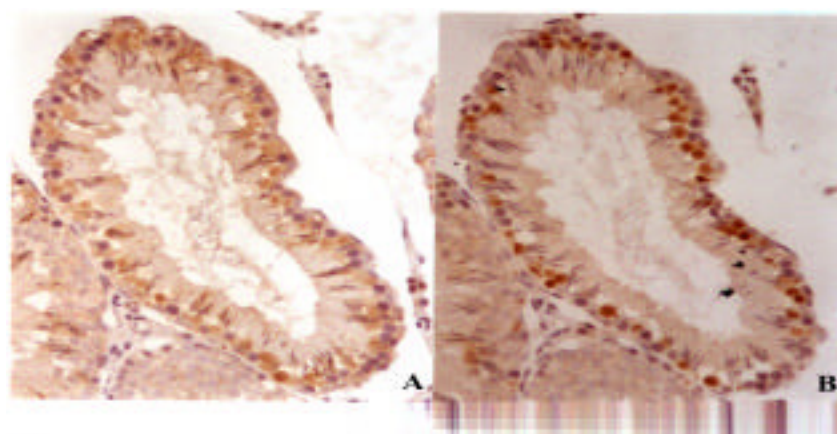


Fig. 23. Colocalització de BAX i Bcl-2 en seccions consecutives 24 hores després de l'administració de MAA.

Seguidament es va procedir a determinar si el marcatge de BAX i Bcl-2 estava present de manera estadi específic en els testicles dels animals tractats. L'examen dels resultats de la

immunohistoquímica va demostrar que BAX i Bcl-2 s'expressaven amb més intensitat durant els últims estadis del cicle espermatogènic, XI-XIII, coincidint amb el marcatge observat per la tècnica de TUNEL (Fig. 24).

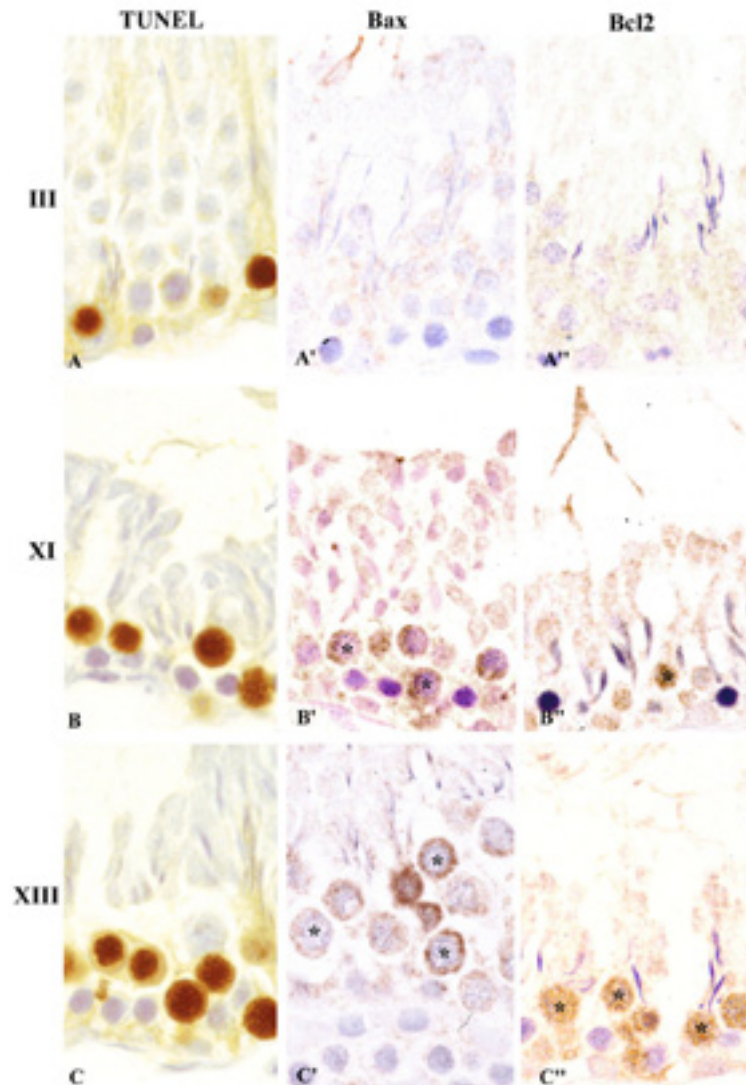


Fig. 24. Comparació entre TUNEL i la localització de les proteïnes BAX i Bcl-2 en funció de l'estadi.

4.7 Immunodetecció de BAX i Bcl-2 en els animals tractats amb EDS.

L'expressió de BAX i Bcl-2 als animals controls va ser la mateixa que l'observada en el cas del MAA. A les 24 hores després de l'administració del tòxic, va aparèixer marcatge tant per Bcl-2 (Fig. 25A) com per BAX (Fig. 25B) a nivell intersticial. Les cèl·lules marcades van ser identificades com cèl·lules de Leydig amb clara morfologia apoptòtica.

Als testicles procedents de rates sacrificades al 5 dies després del tractament amb EDS, es va poder observar marcatge positiu per a Bcl-2 (Fig. 25C) i també per BAX (Fig. 25D) en algunes cèl·lules intratubulars amb clara morfologia anòmala.

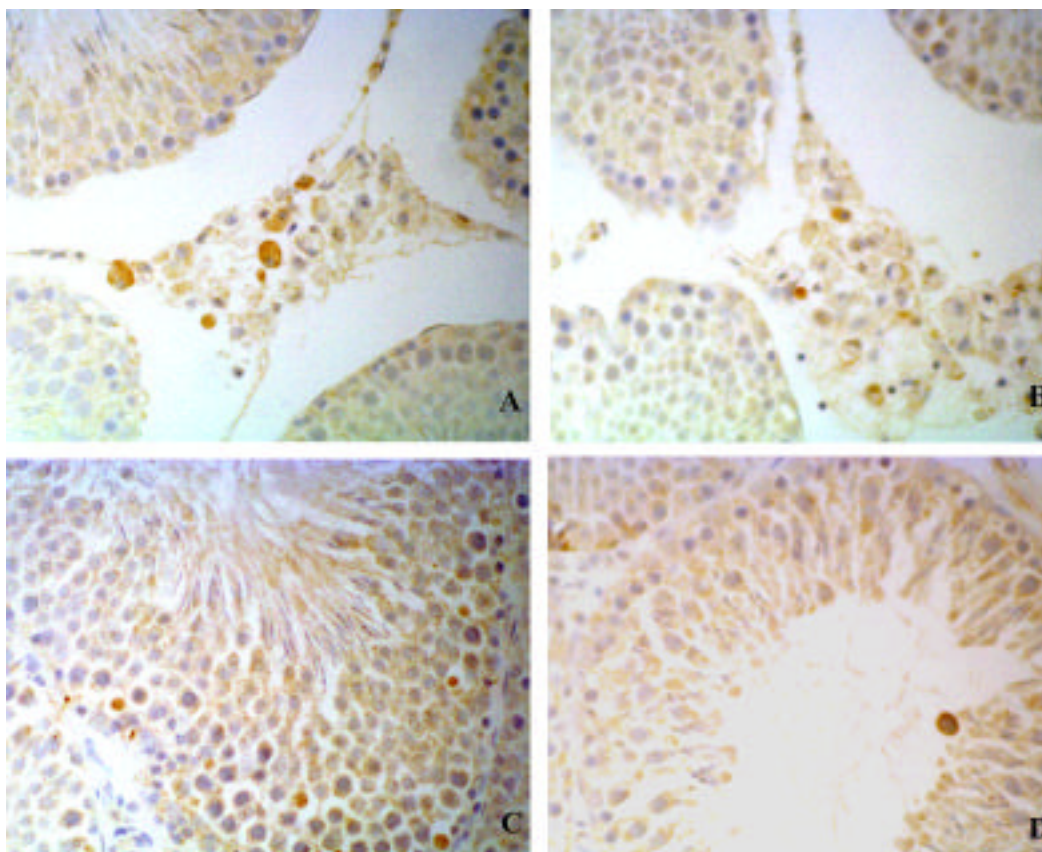


Fig. 25. Immunolocalització de BAX i Bcl-2 després de l'administració d'EDS.

4.8 Canvis d'expressió de les proteïnes BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS i Caspasa-3 després del tractament amb MAA.

L'expressió de les proteïnes BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS i Caspasa-3 va ser analitzada per *Western blot* per tal de corroborar que els canvis d'expressió proteica es correlacionaven amb els canvis observats en l'expressió del mRNA dels gens d'interès seguint el tractament amb MAA.

Malgrat que els nivells de la proteïna Bcl-2 van ser gaire be indetectables en els animals control, tant la proteïna BAX com Bcl-2 van mostrar un increment significatiu d'expressió des de les 9 fins les 24 hores després de l'administració del tòxic (Fig. 26).

Ambdues formes de la proteïna Bcl-x van ser observades en els animals control, malgrat tot, els nivells de la proteïna Bcl-xL van disminuir a les 12 hores després del tractament i van ser gaire be indetectable a les 24 hores, mentre que els nivells de la proteïna Bcl-xS van incrementar a les 12 i 24 hores després de l'administració del tòxic (Fig. 26).

Per tal d'examinar la possible relació de la proteïna Caspasa-3 en l'apoptosi induïda per MAA en els espermatòcits primaris en fase de paquitè, es va analitzar la relació entre el temps de proteolisi de la Caspasa-3 amb el tractament amb MAA mitjançant *Western blot*. En els animals control es va observar una banda d'aproximadament 32 kd (pro-caspasa-3). La intensitat d'aquesta banda va anar disminuint fins a nivells indetectables de les 6 fins a les 24 hores després del tractament amb MAA (Fig. 26). A les 9, 12 i 24 hores després del tractament van aparèixer formes més petites (actives) derivades de la proteolisi de la pro-caspasa-3 de 20 i 11 kd aproximadament (Fig. 26).

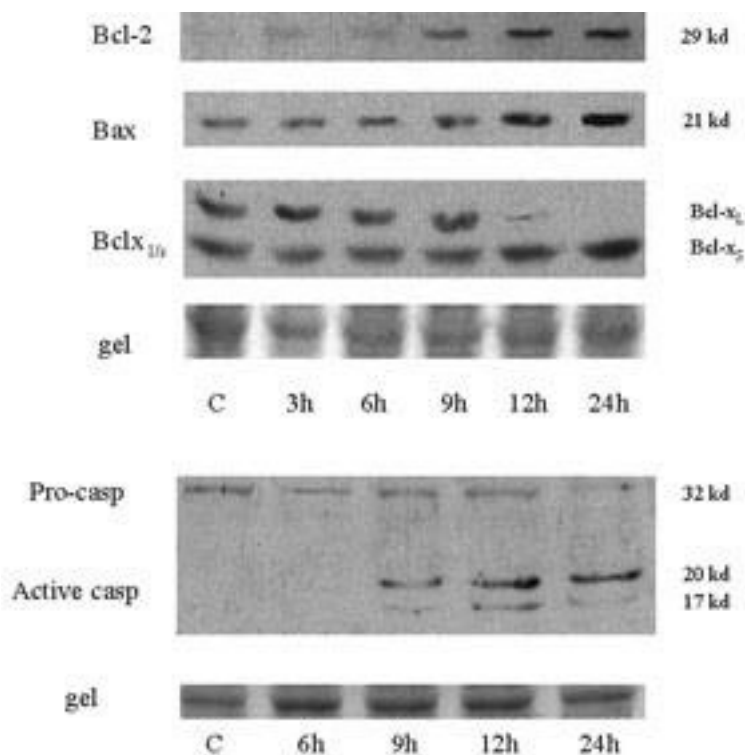


Fig. 26. Estudi per Western blot de l'expressió d'algunes proteïnes de la família de Bcl-2 i de la proteïna Caspasa-3 després del tractament amb MAA.