

4.9 Canvis d'expressió de les proteïnes BAX, Bcl-2 i Caspasa-3 després del tractament amb EDS.

De la mateixa manera que en el cas de les rates tractades amb MAA, els nivells de la proteïna Bcl-2 van ser gaire be indetectables en els animals control, però la proteïna de Bcl-2 va mostrar un increment significatiu de la seva expressió a les 24 hores i no va tornar a ser detectada fins als 5 i 7 dies després del tractament amb EDS. En el cas de la proteïna BAX, els seus nivells van incrementar a les 24 hores i es va mantenir elevada fins als 7 dies després de l'administració del tòxic (Fig. 27).

Pel que fa a la Caspasa-3, 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 als 5 i 7 dies després del tractament amb EDS (Fig. 27). En aquests dies després del tractament amb EDS va aparèixer una forma més petita (activa) derivada de la proteolisi de la pro-caspasa-3 de 20 kd aproximadament (Fig. 27).

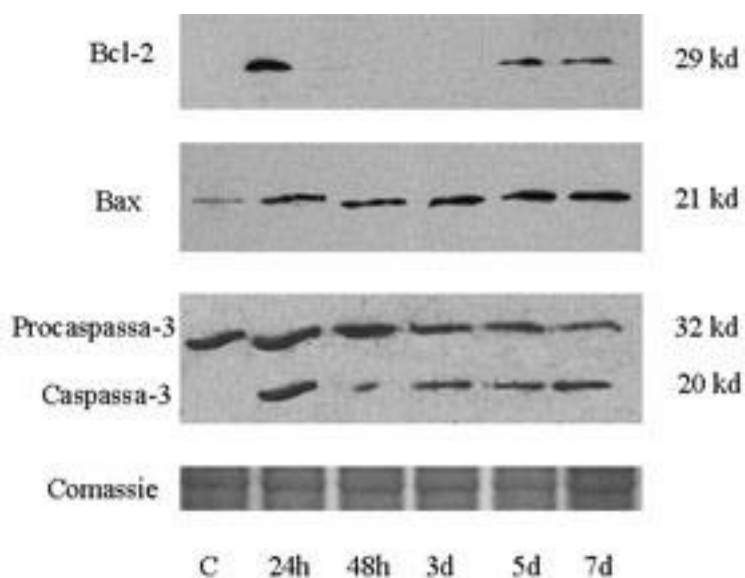


Fig. 27. . Estudi per Western blot de l'expressió de BAX i Bcl-2 i de la proteïna Caspasa-3 després del tractament amb EDS..

4.10 Expressió del mRNA del receptor d'andrògens en els animals tractats amb MAA i EDS.

L'estudi de l'expressió del mRNA de l'AR en les cèl·lules totals del testicle dels animals tractats amb MAA i EDS, mitjançant PCR, va donar lloc als següents resultats:

A les rates tractades amb MAA, no es van observar canvis significatius en els nivells d'expressió del mRNA d'AR (Fig. 28). En el cas de les rates tractades amb EDS, el fet més destacable va ser la disminució en l'expressió del mRNA d'AR a partir dels 3 dies fins a nivells pràcticament indetectables als 5 dies, i tornant a aparèixer expressió als 7 dies després de l'administració del tòxic (Fig. 28).

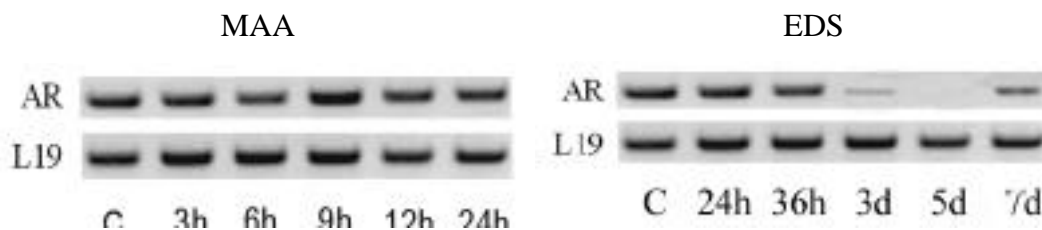


Fig. 28. Estudi de l'expressió del mRNA d'AR en els testicles tractats amb MAA (A) i EDS (B).

4.11 Immunodetecció d'AR en els animals tractats amb MAA i EDS.

En les seccions corresponents als testicles de les rates control es va observar immunoreactivitat a l'AR a les cèl·lules de Sertoli i de Leydig.

En el cas dels animals tractats amb EDS, es va poder observar un augment considerable de la immunoreacció a aquesta proteïna a nivell de les cèl·lules de Sertoli 3 dies (Fig. 29B) després del tractament, per a desaparèixer fins a nivells indetectables als dies 5 i 7 (Fig. 29 C i D).

En les seccions corresponents als testicles de les rates tractades amb MAA no es van observar diferències respecte els controls, però un estudi més detallat de la immunolocalització d'AR en els testicles d'aquests animals va posar de manifest tota una sèrie de canvis qualitius en l'expressió d'aquesta proteïna.

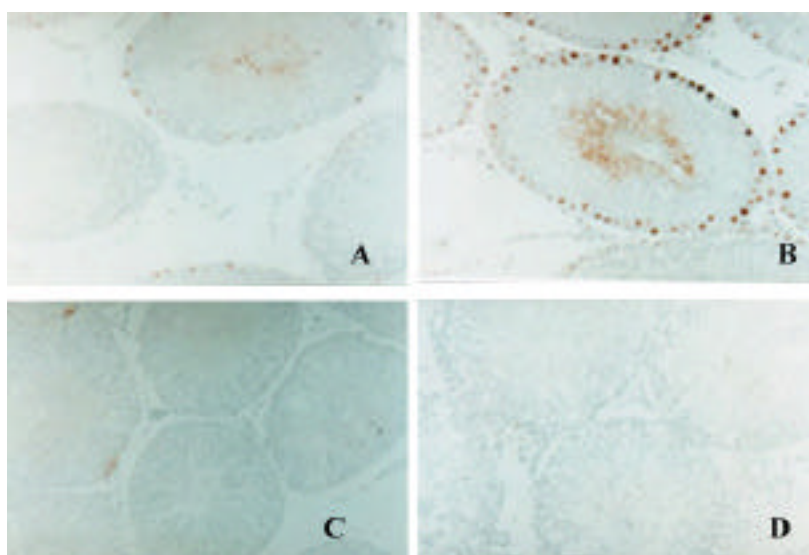


Fig. 29. Estudi de l'expressió de la proteïna AR en els animals tractats amb EDS.

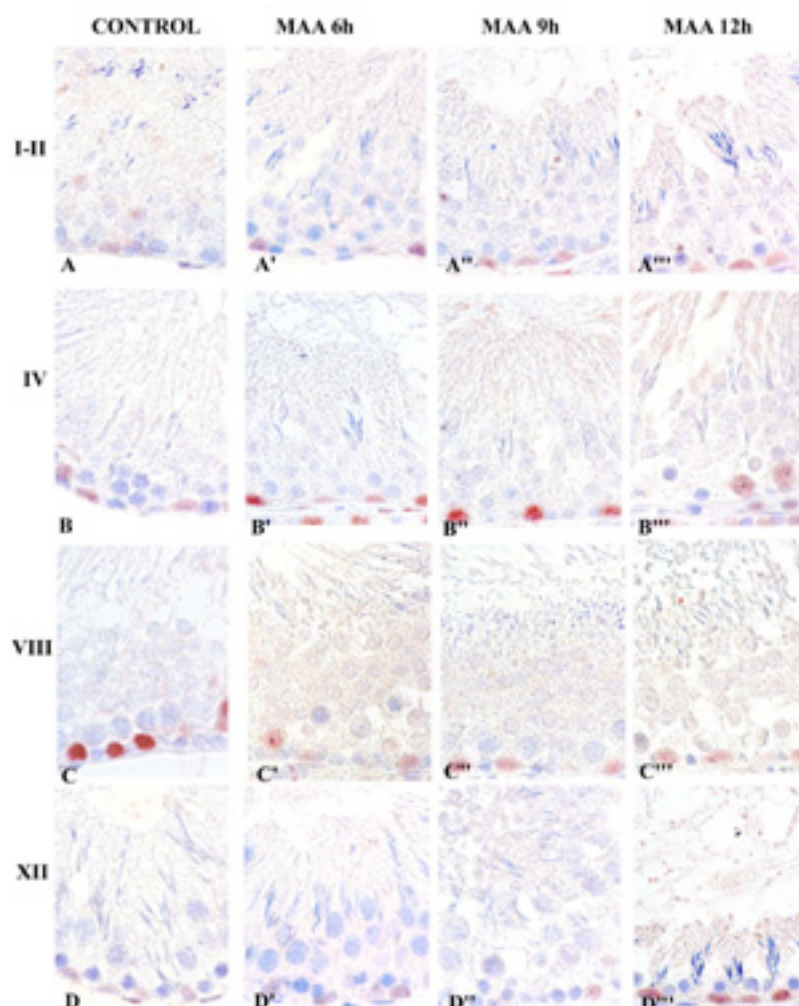


Fig. 30. Expressió de la proteïna AR en funció de l'estadi espermato-genètic després del tractament amb MAA

En les seccions corresponents als animals controls, l'AR va mostrar una màxima expressió als estadis VII-VIII (Fig. 30C). Els següents estadis en presentar més intensitat van ser els estadis III-IV (Fig. 30B). Els estadis I-II (Fig. 30A) i X-XII (Fig. 30D) van ser els que van mostrar menys intensitat en el marcatge. Transcorregudes 6 i 9 hores després de l'administració del tòxic, aquesta distribució de marcatge va canviar de manera que la màxima intensitat corresponia als estadis III-IV (Fig. 30B' i B''), mantenint-se baix als estadis I-II (Fig. 30A' i A'') i X-XII (Fig. 30D' i D''). En el cas dels estadis VII-VIII es va observar una clara disminució en la intensitat del marcatge (Fig. 30C' i C''). A les 12 hores després de l'administració del tòxic, la intensitat del marcatge va tornar a nivells semblant als controls (Fig. 30B'''). L'expressió de la proteïna es va mantenir igual en els estadis I-II (Fig. 30A''') i va continuar baixa als estadis VII-VII (Fig. 30C'''). Als estadis X-XII, però, la intensitat del marcatge va augmentar considerablement (Fig. 30D''').

4.12 Captura de túbuls seminífers de forma específica segons el seu estadi de cicle espermatogènic amb la tècnica de LCM.

La tècnica de LCM es va desenvolupar amb èxit en seccions congelades fixades amb alcohol etílic al 70%. Els diferents estadis del cicle espermatogènic van ser identificats visualment després de ser tenyits amb hematoxilina i eosina utilitzant un objectiu de 63 augments.

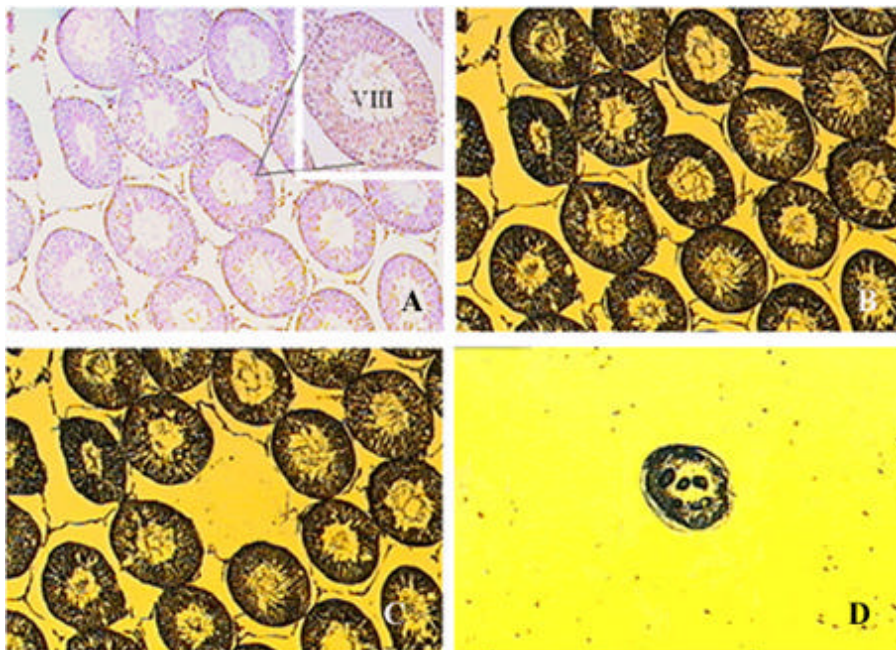


Fig. 31. Procés d'identificació i captura d'un estadi del cicle espermatogènic

En la figura 31 A es mostra un estadi VII-VIII del cycle espermatogènic així com el procés mitjançant el qual és capturat sense contaminació procedent de l'interstici (Fig. 31C i D).

4.13 Integritat del RNA extret a partir de túbuls capturats amb el Làser.

Els túbuls identificats segons el seu estadi van ser capturats amb un “thermoplastic polymer film-coated cap” pel mètode d'un sol pas de transferència descrit per (Suarez-Quian, 2000). Un total de 50 túbuls així capturats es van fer servir per extreure RNA total per posteriors anàlisis d'expressió gènica. La integritat del RNA extret es va fer palès per l'aparició de les bandes corresponents als RNAs ribosomals 28 i 18 s en un gel d'agarosa al 1% (Fig. 32).

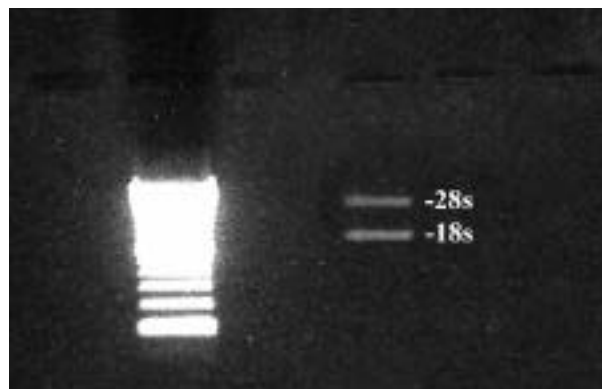


Fig. 32. Gel d'electroforesi del RNA extret de 50 seccions tubulars.

4.14 Expressió dels mRNAs d'AR i ABP en funció de l'estadi espermatogènic per RT-PCR a partir de túbuls seminífers capturats amb la tècnica de LCM.

A fi de corroborar els resultats obtinguts en la variació d'expressió de la proteïna del receptor d'andrògens en els diferents estadis del cycle espermatogènic després de l'administració de MAA, es va procedir a realitzar l'anàlisi de l'expressió del mRNA d'AR i d'una altra proteïna important en els processos en els quals intervenen els andrògens, la proteïna transportadora d'andrògens (ABP) (Fig. 33).

Pel que fa a l'ABP, el fet més destacable de l'anàlisi de la seva expressió segons l'estadi del cycle espermatogènic i en el transcurs del temps després de l'administració del tòxic va ser l'augment progressiu de la seva expressió als estadis VII-VIII.

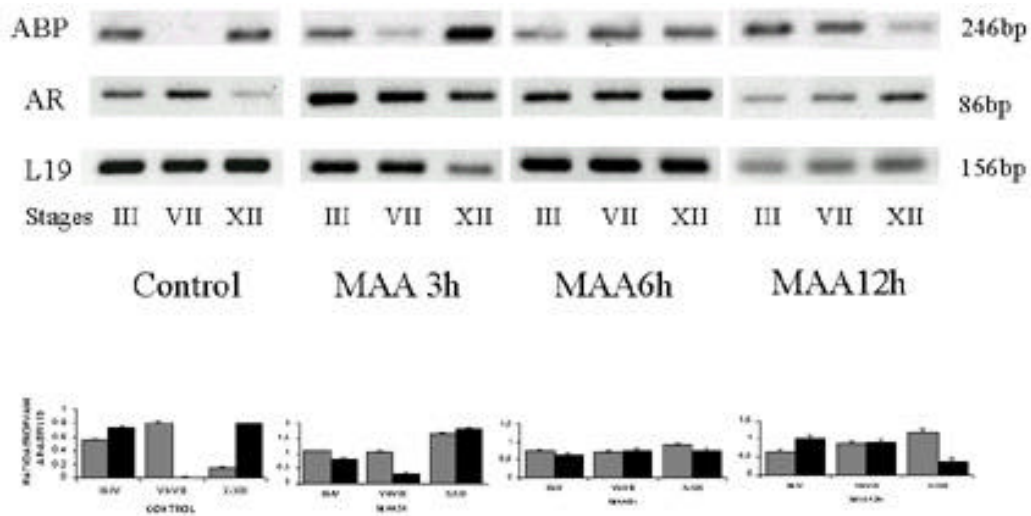


Fig. 33. Estudi de l'expressió dels mRNAs d'ABP i AR en funció de l'estadi capturat en rates tractades amb MAA.

Els canvis observats en l'expressió del mRNA d'AR varen ser semblants als descrits anteriorment en l'anàlisi de l'expressió proteica.

4.15 Expressió dels mRNAs d'AR i ABP en línies cel·lulars de Sertoli després de l'administració de MAA.

Per tal d'estudiar "in vitro" els efectes d'aquest tòxic sobre l'expressió d'AR i ABP en les cèl·lules de Sertoli, l'expressió dels mRNAs d'AR, en la línia cel·lular TM4 i d'ABP en línia cel·lular MSC-1, ambdues derivades de cèl·lules de Sertoli, va ser analitzada per RT-PCR després de ser tractades amb MAA, a la concentració que manifestava efectes nocius en experiments realitzats "in vivo" en el testicle de rates adultes (5 mM).

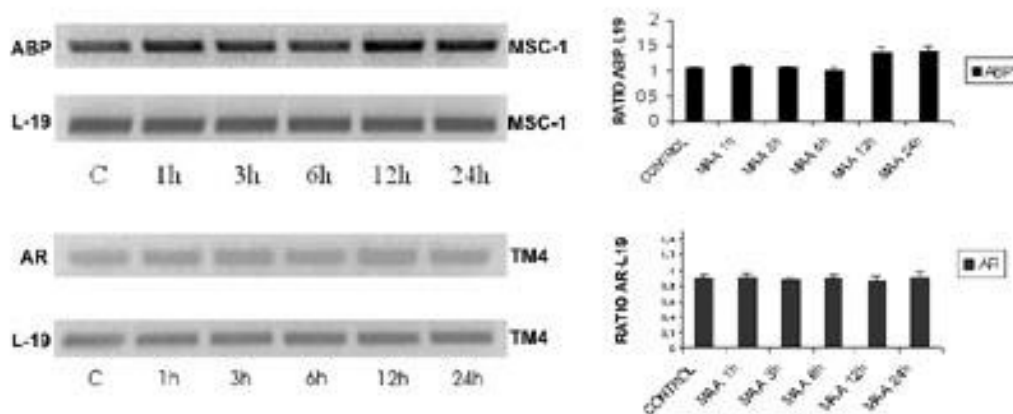


Fig. 34. Estudi de l'expressió del mRNA d'ABP en cèl·lules MSC-1 i d'AR en cèl·lules TM4 tractades amb MAA.

En condicions normals de cultiu, les cèl·lules MSC-1 expressaven el mRNA d'ABP, però no el d'AR. Mentre que les cèl·lules TM4 expressaven el mRNA d'AR però no el d'ABP (Fig. 34). L'expressió del mRNA d'ABP es va veure augmentada significativament 12 i 24 hores després de ser tractades amb el tòxic (Fig. 34). Pel contrari, l'expressió del mRNA d'AR no va variar significativament després de l'administració del tòxic.

4.16 Estudi de l'expressió proteica d'AR i ABP en línies cel·lulars de Sertoli després de l'administració de MAA.

L'estudi de l'expressió proteica en aquestes línies cel·lulars va corroborar els resultats obtinguts mitjançant els estudis d'expressió dels mRNAs d'aquest dos gens. Les cèl·lules MSC-1 van experimentar un increment en l'expressió de la proteïna ABP (45 kd) 12 i 24 hores després de ser tractades amb MAA, mentre que les cèl·lules TM4 no van mostrar cap canvi significatiu en l'expressió de la proteïna AR (110 kd) després de ser tractades amb el tòxic (Fig. 35).

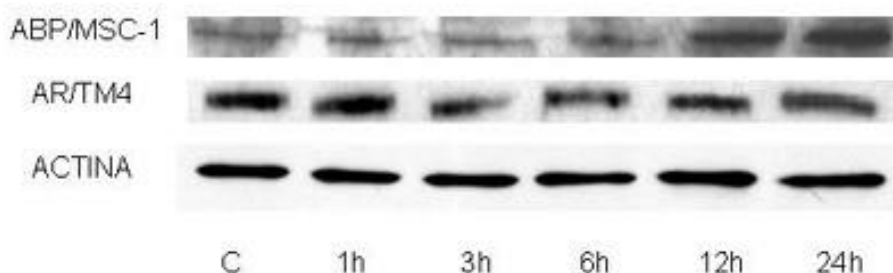


Fig. 35. Estudi de l'expressió proteica per Western blot d'ABP i AR en cèl·lules MSC-1 i TM4 respectivament tractades amb MAA.

4.17 Expressió del mRNA del receptor d'estrògens beta (ER β) després de l'administració de MAA.

Els nivells del mRNA d'ER β es van analitzar tant a les cèl·lules totals del testicle com a les cèl·lules germinals aïllades dels testicles dels animals tractats amb MAA. A les mostres procedents de les cèl·lules totals del testicle l'expressió del mRNA d'ER β no va incrementar fins 6 hores després del tractament amb MAA. En el cas de les cèl·lules

germinals aïllades, l'increment es va observar 3 hores després de l'administració del tòxic (Fig. 36). La identitat de totes les bandes de cDNAs amplificades va ser confirmada per l'anàlisi de seqüència.

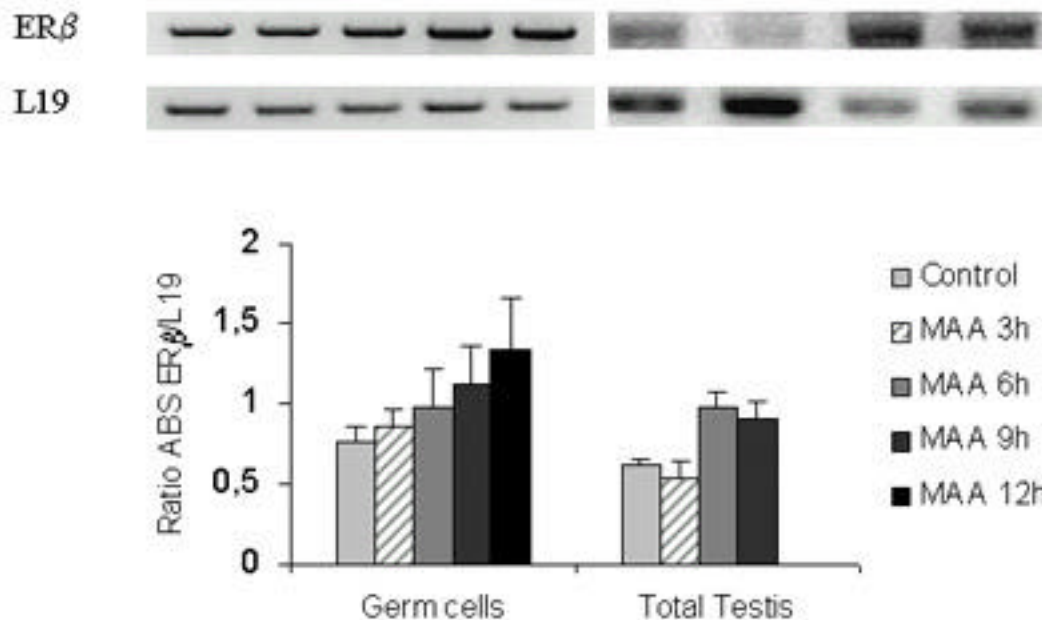


Fig. 36. Estudi de l'expressió del mRNA d'ER β en cèl.lules germinals aïllades i en cèl.lules totals testiculars en rates tractades amb MAA.

4.18 Immunodetecció del ER β en espermatòcits primaris en fase de paquità després de l'administració de MAA.

Com es mostra a la taula 3, l'examen de la tinció obtinguda per la tècnica de TUNEL en les seccions procedents d'animals tractats amb MAA, va revelar una distribució estadi específica del producte de la reacció en els espermatòcits primaris en fase de paquità a partir de les 6 hores després de l'administració del tòxic. Donat que, a l'igual que amb els gens de la família de Bcl-2, es va trobar un augment en l'expressió del mRNA de l'ER β , es va estudiar la possible relació entre aquest augment d'expressió i el procés apoptòtic.

Per investigar aquesta hipòtesi, es va estudiar on s'expressava aquesta proteïna en el testicle i quina era la seva distribució en els diferents estadis del cicle espermatogènic.

En les seccions corresponents als animals control, l'ER es va trobar expressat en els nuclis de les cèl·lules de sertoli, al citoplasma d'alguns dels diferents tipus de cèl·lules germinals (espermatòcits primaris en fase de paquitè, i espermàtides rodones) i també a nivell intersticial, a les cèl·lules de Leydig (Fig. 37).

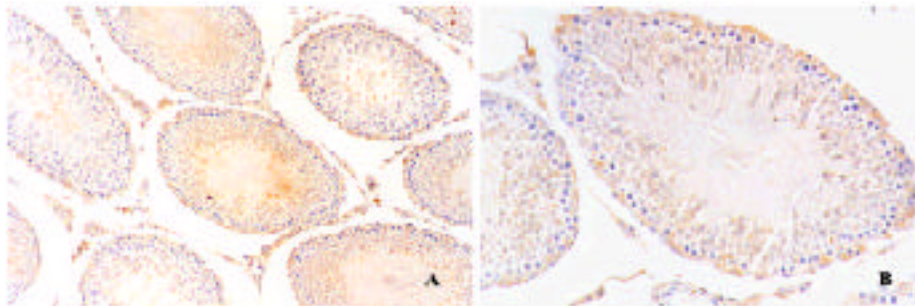


Fig. 37. Immunodetecció de la proteïna ER en el testicle de rates control.

A partir de les 9 hores de l'administració del tòxic i continuant fins a les 24 hores, va aparèixer un intens marcatge d' ER a nivell del citoplasma dels espermatòcits primaris en fase de paquitè de manera estadi específica coincidint amb el marcatge obtingut amb la tècnica de TUNEL (Fig. 38).

La majoria de cèl·lules que manifestaven l'expressió de la proteïna coincidia amb aquelles als estadis X i XII que havien donat positiu per a la tècnica de TUNEL (Fig. 39A', B' i A'', B'' respectivament), però no als estadis III-IV (Fig. 39A, B).

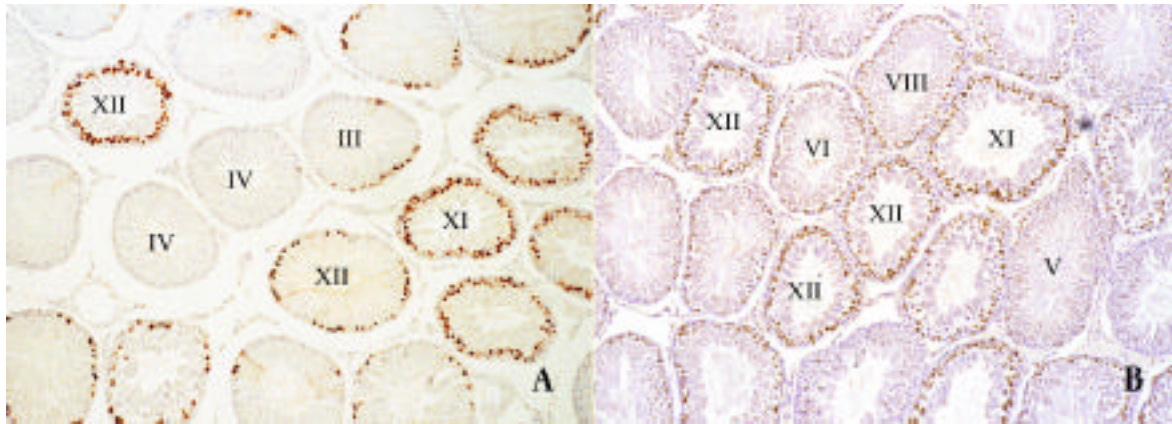


Fig. 38. Comparació entre la distribució de les cèl.lules TUNEL positives i les cèl.lules amb marcatge positiu per a ER a les 24 hores del tractament amb MAA.

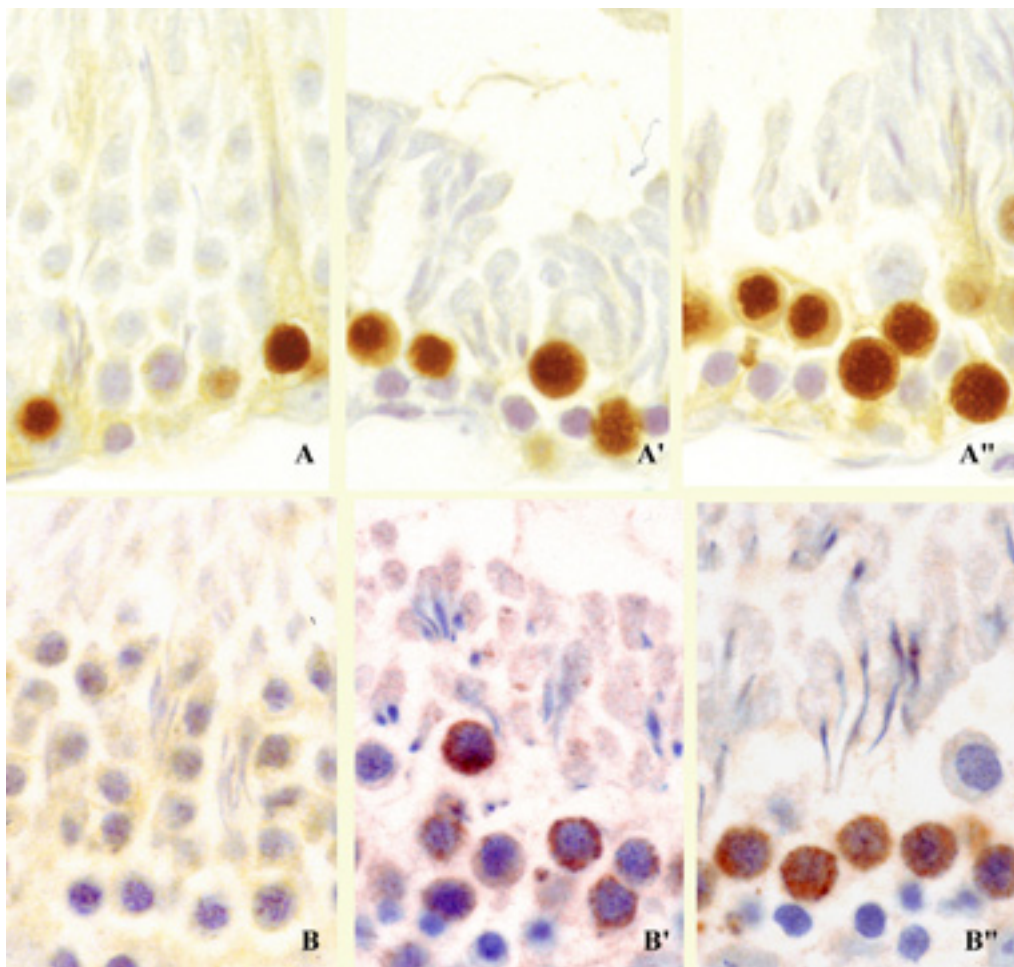


Fig. 39. Comparació entre la distribució de les cèl.lules TUNEL positives i les cèl.lules amb marcatge positiu per a ER a les 24 hores del tractament amb MAA en funció de l'estadi espermato-gènec.

4.19 Expressió dels mRNAs d'ER β en funció de l'estadi espermatogènic per RT-PCR a partir de túbuls seminífers capturats amb la tècnica de LCM 12 hores després del tractament amb MAA.

Amb el fi de verificar l'augment d'expressió de l'ER en els estadis X-XII del cicle espermatogènic, es va procedir a la captura dels diferents estadis (III-IV, VII-VIII, X-XII) del túbuls seminífers procedents d'animals sacrificats 12 hores després de l'administració del tòxic. Es va observar un augment en l'expressió del mRNA d'ER en tots tres grups d'estadis capturats (Fig. 40).

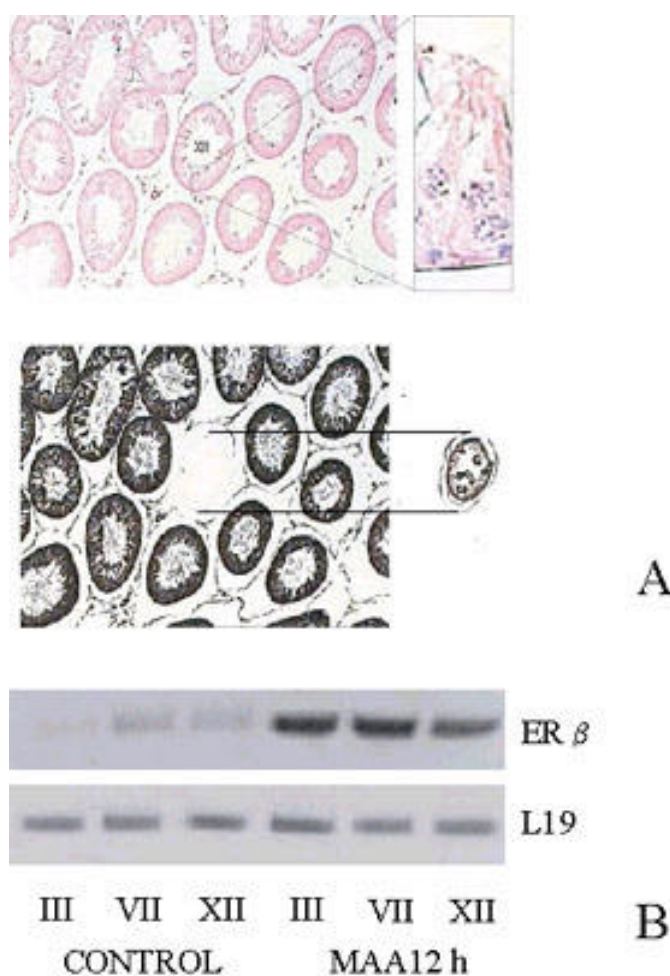


Fig. 40. Expressió dels mRNAs d'ER en funció de l'estadi espermatogènic per RT-PCR a partir de túbuls seminífers capturats amb la tècnica de LCM 12 hores després del tractament amb MAA.

4.20 Sobreexpressió de la proteïna de l'ER β després de l'administració de MAA.

Per tal de verificar els resultats d'expressió de la proteïna de l' ER obtinguts amb els estudis immunohistoquímics, es van realitzar assaigs de *Western blot* amb 2 anticossos de cases comercials diferents que reconeixien la banda d'ER de 55 kd.

Utilitzant ambdós anticossos es va observar un augment en l'expressió de la proteïna en la fracció citoplasmàtica dels extractes proteics obtinguts a partir dels testicles de les rates tractades amb MAA, però no en les fraccions nuclears (Fig. 41A), confirmant l'expressió de la proteïna en el citoplasma dels espermatòcits primaris en fase de paquitè observada en la immunohistoquímica.

En ambdós casos, el màxim d'expressió de la proteïna va ser observat a les 12 i 24 hores després de l'administració del tòxic. L'especificitat de l'anticòs va ser demostrada amb la desaparició de la banda en l'assaig de *Western blot* després d'incubar l'anticòs amb el pèptid contra el qual estava fet aquest anticòs (Fig. 41B).

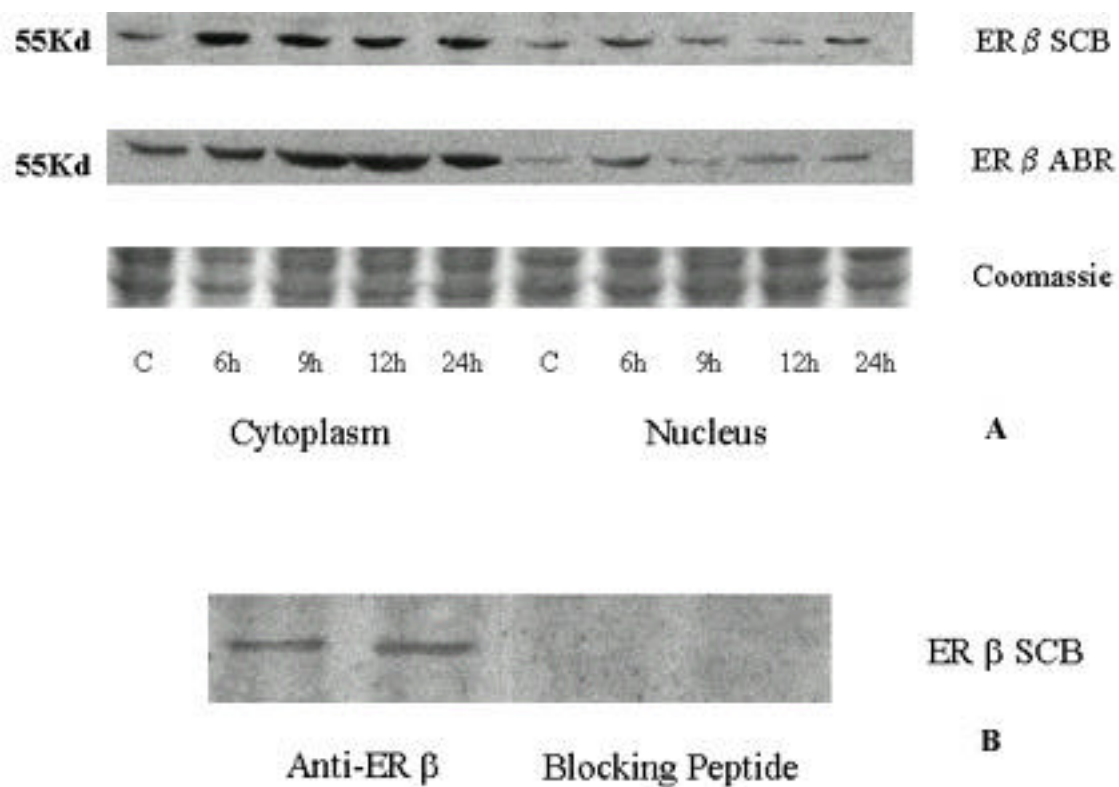


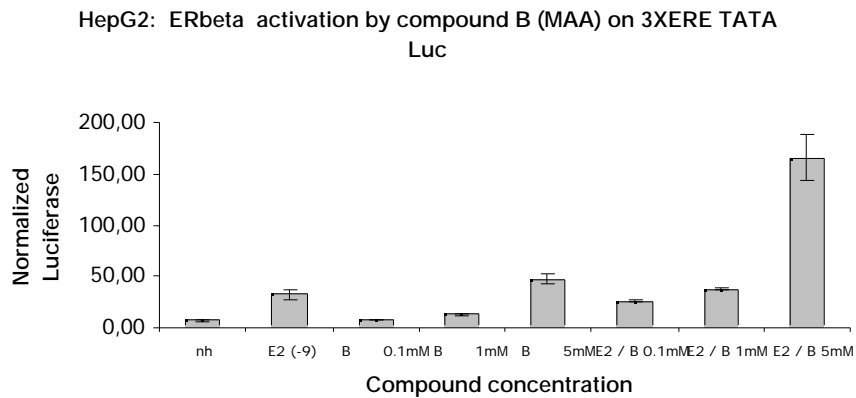
Fig. 41. Estudi de l'expressió proteica d'ER en les fraccions nuclears i citosòliques dels animals tractades amb MAA.

4. 21 Activació de l'ER β transfectat a cèl·lules HepG2 mitjançada per la interacció de MAA.

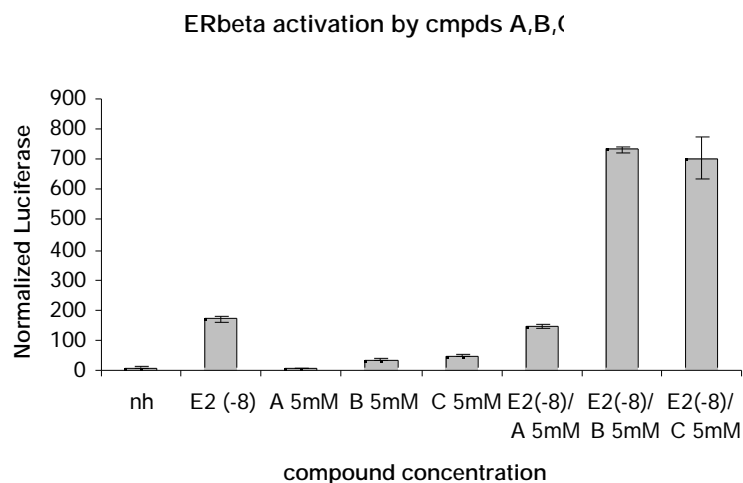
Per tal d'esbrinar si el tòxic podia estar actuant directament en l'activació de l'ER , o bé era la seva sobreexpressió era conseqüència indirecta de la seva acció sobre les cèl·lules dels túbuls seminífers, es van realitzar, en col·laboració amb el grup del Dr. McDonnell (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina), assaïjos d'activació del receptor esteroïdal mitjançant un sistema posat a punt pel seu grup (Gaido i cols., 2000).

L'assaig es va fer a cegues, utilitzant 3 compostos (A, B, C). El primer d'ells era sacarosa al 30% (A), mentre que el 2^o i el 3^o eren el compost MAA pur (B i C). Els 3 compostos es van afegir a les cèl·lules HepG2 que havien estat co-transfectades amb l'ER i un constructe luciferasa *reporter* que contenia 3 còpies d'un element de resposta (ERE) consens.

L'estradiol afegit a les cèl·lules a una concentració subsaturant (1nM) va produir estimulació de l'activitat luciferasa (Gràfica 1). Concentracions creixents del compost B també van produir estimulació de l'activitat luciferasa. A la concentració de 5 mM , concentració a la qual el MAA exerceix els seus efectes "in vitro", el compost B va ser capaç de produir el mateix nivell d'estimulació d'activitat luciferasa que l'estradiol a concentració de 1 nM (Gràfica 1). El compost C, va produir estimulació de l'activitat luciferasa igual que el compost B, mentre que el compost A no va tenir cap efecte (Gràfica 2). Quan es va afegir estradiol a 1 nM i el compost B a 5 mM simultàniament, es va observar un clar efecte sinèrgic (Gràfica 1). Resultats molt semblants van ser obtinguts quan els compostos A, B i C (5 mM) van ser afegits conjuntament amb una concentració d'estradiol 10 nM (Gràfica 2).



Gràfica 1



Gràfica 2

4.22 Expressió gènica diferencial detectada per *Differential Display* en les cèl·lules germinals aïllades del testicles de les rates tractades amb EDS i MAA.

La tècnica de *Differential Display* es va realitzar utilitzant els mRNAs procedents de les cèl·lules germinals aïllades dels testicles de rates control i rates tractades amb EDS (24, 36 i 72 hores) i MAA (3, 6 i 9 hores). L'ús d'aquests temps d'exposició als diferents tòxics es va realitzar per tal de trobar gens que poguessin estar directament relacionats amb la inducció del procés apoptòtic.

Utilitzant els encebadors H-T₁₁G 3' i H-AP 62 (GeneHunter), es van aïllar fins a 18 bandes expressades diferencialment, tant per un augment en la seva expressió com per a una disminució, però només dues de les que augmentaven la seva expressió van ser analitzades a fons (Fig. 42).

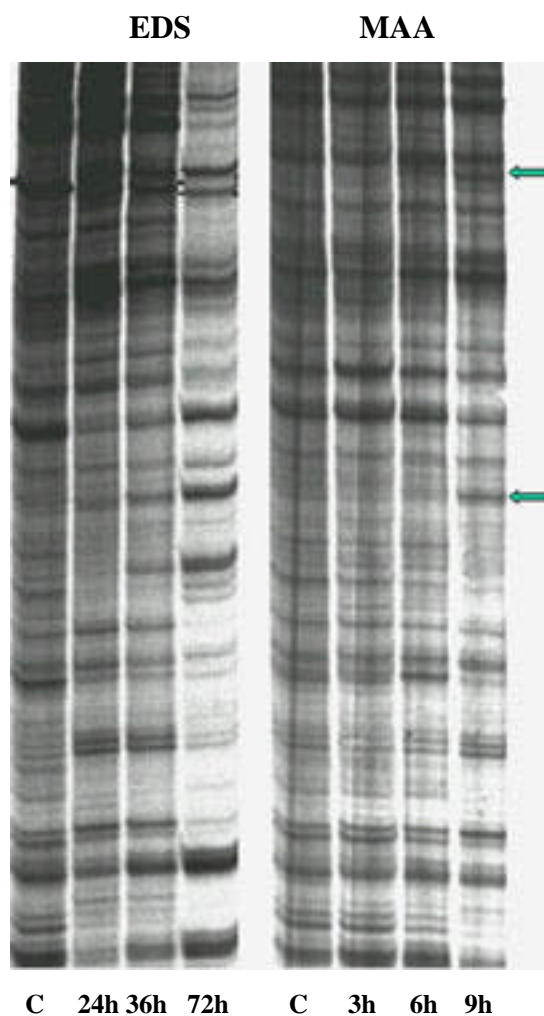


Fig. 42. Gel d'acrilamida comparant la diferencialitat de bandes entre controls i rates tractades amb EDS i MAA.

4.23 Reamplificació de les bandes retallades amb la tècnica del DD.

Les dues bandes seleccionades per ser estudiades van ser reamplificades per tal de comprovar que no hi hagués contaminació de bandes addicionals, i per comprovar, alhora, la grandària de la banda aïllada. La reacció de PCR es va realitzar amb els mateixos encebadors i a les mateixes condicions que el DD. Va ser aïllada una única banda en

cadascun dels casos, d'una grandària de 680 pb (banda A9) i 570 pb (banda C9) respectivament (Fig. 43).

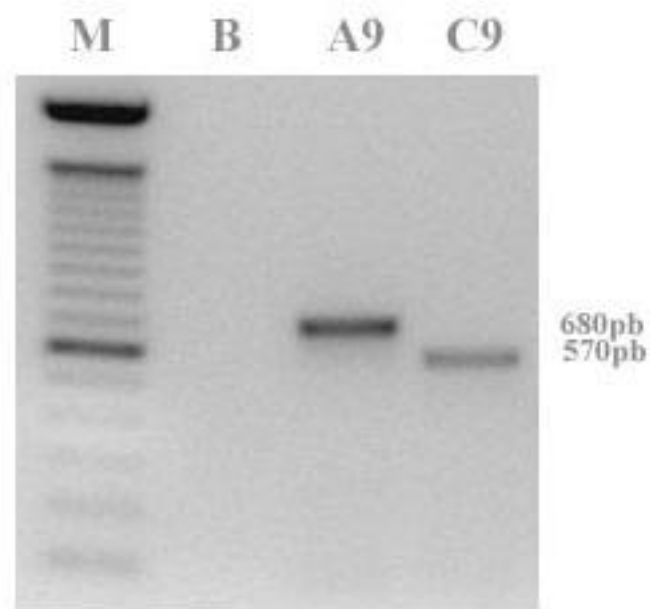


Fig. 43. Comprovació per RT-PCR de la grandària de les bandes aïllades per Differential display.

4.24 Identificació de les bandes reamplificades.

Després de reamplificar les bandes aïllades, aquestes van ser subclonades en vectors pCR2.1, purificades i seqüenciades. Les dues seqüències obtingudes van ser analitzades per comparació amb les seqüències publicades al banc de dades *GenBank* del *NCBI* utilitzant el programa *BLAST*. Els resultats d'aquesta comparació es resumeix a la Taula 4.

El clon A va presentar una homologia del 85,2% amb el mRNA d'una proteïna transmembrana de ratolí (Mdes). El clon C9 va presentar una homologia del 87,6% amb una proteïna relacionada amb una família de factors de creixement (HRP-1), també de ratolí.

 Anàlisi de les seqüències de cDNA

Clon	Referència	Identitat	Longitud (AA)
A9	Mus Musculus mRNA for Mdes transmembrane protein (mRNA 1778pb), EMB/Y08460/MMMDES	85,2% en 723 nt homologia	323
C9	Mus Musculus hepatoma-derived growth factor, related protein 1 (Hdgfrp1) (mRNA 1333)	87,6% en 496 nt homologia	286

Taula 4

4.25 Confirmació de la diferencialitat dels dos cDNAs diferencialment expressats per Northern Blot.

Amb la finalitat de demostrar la diferencialitat d'aquestes dues bandes, es va procedir a realitzar estudis d'expressió de RNA mitjançant la tècnica de Northern blot comparant l'expressió dels mRNAs objecte d'estudi entre els controls i les rates tractades amb MAA i EDS en diferents temps d'exposició als tòxics.

Les membranes de nitrocel.lulosa que contenien 15 µg de RNA total procedent de testicles de rates control no tractades, de rates sacrificades 3, 6 i 9 hores després de l'administració de MAA, i de rates sacrificades 24, 36 i 72 hores després de l'administració d'EDS, van ser hibridades amb els cDNAs A9 i C9 marcats amb ³²P.

Dos transcrits, un d'aproximadament 6 kb de grandària i un altre de 2 kb, van ser observats tant en els controls com en els animals tractats amb MAA i EDS, utilitzant com a sonda el cDNA A9 (Fig. 44). Tots dos transcrits van mostrar un augment d'expressió en relació al temps d'exposició dels 2 tòxics.

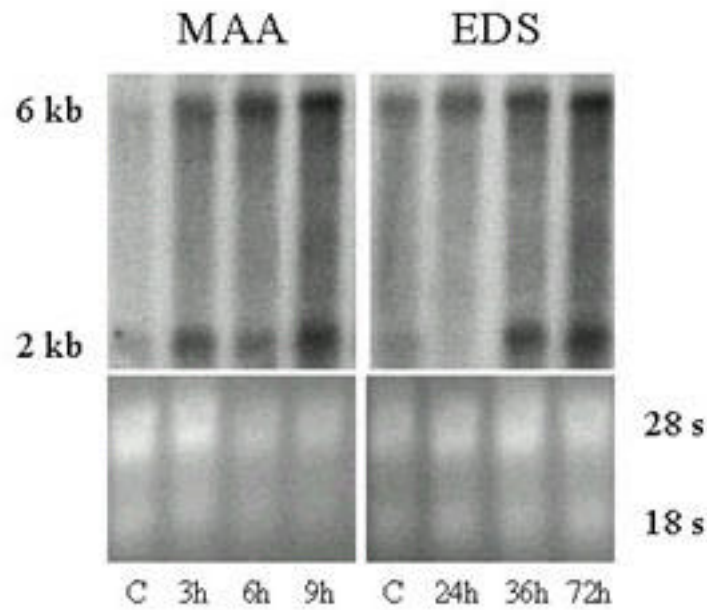


Fig. 44. Northern blot de Rdes

Un transcrit d'aproximadament 2,4 kb de grandària va ser observat tant en els controls com en els animals tractats amb MAA i EDS utilitzant com a sonda el cDNA C9 (Fig. 45). Com en el cas del clon A9, aquest transcrit va mostrar un augment d'expressió en relació al temps d'exposició als 2 tòxics.

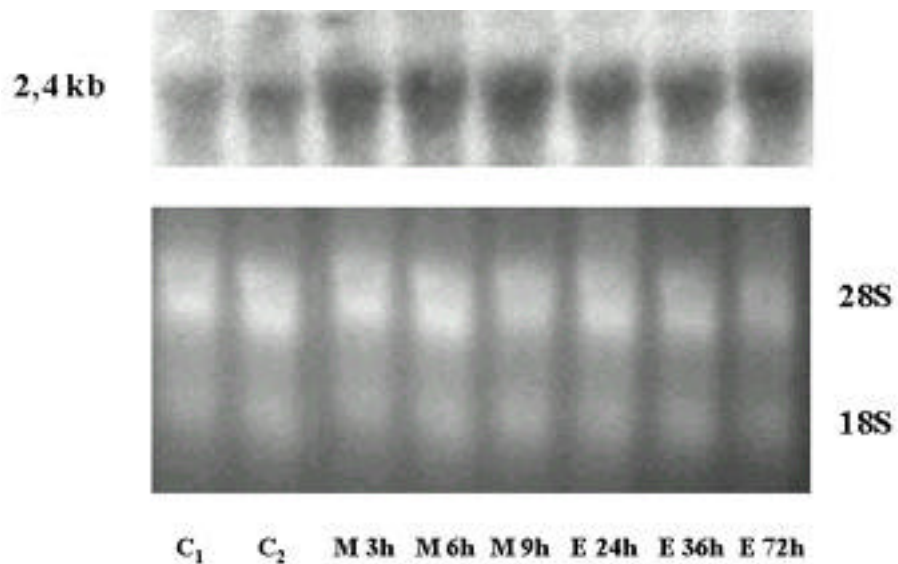


Fig. 45. Northern blot d'HARP.