

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



Expresión y regulación del transportador de
glucosa GLUT8 en testículo y en neuronas
motoras

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Olga Gómez Roda

Dirigida por:

José Terrado Vicente

José Emilio Mesonero Gutiérrez

Valencia, 2007

Universidad Cardenal Herrera- CEU

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

**Expresión y regulación del transportador de
glucosa GLUT8 en testículo y en neuronas
motoras**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Olga Gómez Roda

Dirigida por:
José Terrado Vicente
José Emilio Mesonero Gutiérrez

Valencia, 2007

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de esta tesis. Sobre todo a mis directores, José Terrado y José Emilio Mesonero, por su gran dedicación en la elaboración de este estudio.

A mis compañeros de laboratorio, muy especialmente a Inma, Emma, Cristina, Sergio, Pilar, M^a Pilar y Carmen.

A mis compañeras de equipo, Amparo y Begoña, por los buenos momentos que hemos pasado trabajando juntas.

Con mucho cariño a Sabina, mi compañera de despacho y sobre todo una gran amiga.

Gracias a mis padres, Maribel y Vicente, por su apoyo a lo largo de la elaboración de este trabajo. A mi hermana, a mi prima, a mi tía y a mis abuelos por animarme en los malos momentos. Y a Tono por su gran paciencia.

A los compañeros del departamento de Medicina y Cirugía Animal.

Muy especialmente quiero agradecer a las Unidades de Bioquímica y de Anatomía Patológica su gran ayuda, que me ha permitido poder llevar a cabo todas las técnicas de investigación empleadas en este trabajo. Y a la Unidad Fisiología por su colaboración en los estudios de diabetes.

Quiero dar las gracias a la Universidad Cardenal Herrera-CEU y a la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, por los proyectos de investigación PRUCH 02/18 y 03/20 y por la beca de formación de personal docente e investigador, que me ha permitido llevar a cabo este trabajo de investigación.

Y también deseo agradecer la financiación del proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología (BF12002-03590).

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LA GLUCOSA COMO FUENTE DE ENERGÍA. EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA	1
2. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA GLUT	1
3. EL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT8	8
3.1. Estructura de GLUT8	8
3.2. Expresión de GLUT8	9
3.3. Localización subcelular y función de GLUT8	10
4. TRANSPORTE DE GLUCOSA EN TESTÍCULO	13
4.1. Espermatogénesis	13
4.1.1. <i>El túbulo seminífero</i>	14
4.1.2. <i>Fases de la espermatogénesis</i>	15
4.1.3. <i>Formación del acrosoma</i>	18
4.1.4. <i>Estadios de la espermatogénesis en ratón y en rata</i>	20
4.2. Expresión de los transportadores de glucosa en testículo.....	21
4.3. Regulación por la insulina y estados diabéticos	25
5. EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	27
5.1. Expresión de los transportadores GLUT en el sistema nervioso central	27
5.2. Regulación de los transportadores	31
5.3. La axotomía del nervio facial como modelo para estudiar los transportadores de glucosa.....	32
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	35
1.1. Condiciones generales.....	35
1.2. Animales empleados en el estudio de los transportadores GLUT en testículo	35
1.2.1. <i>Ratones adultos y neonatos</i>	35
1.2.2. <i>Ratas. Inducción del estado diabético</i>	36
1.3. Ratones empleados en el estudio de los transportadores GLUT en el sistema nervioso central. Axotomía del nervio facial.....	37
2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR WESTERN BLOT	38

2.1. Aislamiento de proteínas de membrana	38
2.2. Cuantificación de las proteínas	39
2.3. Migración electroforética en gel de acrilamida (SDS- PAGE).....	39
2.4. Transferencia	40
2.5. Incubación con el anticuerpo primario	40
2.6. Incubación con el anticuerpo secundario y revelado	43
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOQUÍMICAS	44
3.1. Estudio de los transportadores en testículo	44
3.1.1. <i>Testículo</i>	44
3.1.2. <i>Espermatozoides</i>	49
3.1.3. <i>Tinción de PAS</i>	50
3.2. Estudio de los transportadores en el núcleo del facial tras la axotomía	50
4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm POR RT-PCR	51
4.1. Aislamiento de ARN total de testículo.....	51
4.2. Síntesis de la primera hebra ADNc a partir de ARN total mediante transcripción inversa (RT)	53
4.2.1. <i>Desnaturalización de ARNm</i>	53
4.2.2. <i>Anillamiento del ARNm con el cebador</i>	53
4.2.3. <i>Síntesis de ADNc</i>	54
4.2.4. <i>Eliminación del ARN</i>	54
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
IV. RESULTADOS	58
1. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN TESTÍCULO DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS. REGULACIÓN EN DIABETES	58
1.1. Expresión de GLUT8 en la espermatogénesis de ratón	58
1.1.1. <i>Control de la especificidad del anticuerpo anti GLUT8-COOH</i>	58
1.1.2. <i>Expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot</i>	59
1.1.3. <i>Localización de la proteína GLUT8 mediante inmunohistoquímica</i>	60
1.1.4. <i>Expresión del ARNm de GLUT8</i>	68
1.1.5. <i>Expresión de los transportadores GLUT3 y GLUT4</i>	69
1.2. Estudio de la expresión proteica de GLUT8 en testículo de rata.....	75
1.2.1. <i>Expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot</i>	75

1.2.2. Localización de la proteína GLUT8 mediante inmunohistoquímica	76
1.2.3. Expresión de los transportadores GLUT3 y GLUT4.....	79
1.3. Expresión de los transportadores de glucosa en el estado de diabetes.....	82
1.3.1. Modelo experimental.....	82
1.3.2. Alteraciones testiculares en las ratas diabéticas.....	84
1.3.3. Estudio de la expresión de la proteína GLUT8 en ratas diabéticas	84
1.3.4. Estudio de la expresión de la proteína GLUT3 en ratas diabéticas	86
1.3.5. Expresión de insulina en testículo de rata adulta.....	90
2. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN EL NÚCLEO DEL FACIAL TRAS LA AXOTOMÍA ...	96
2.1. Estudio de la expresión los transportadores de membrana en el tronco del encéfalo en ratón adulto	96
2.1.1. Expresión del ARNm de los transportadores en el tronco del encéfalo ...	96
2.1.2. Estudio de los transportadores en el tronco del encéfalo mediante western blot.....	96
2.1.3. Estudio de los transportadores de membrana mediante inmunohistoquímica	101
2.2. Estudio de la expresión de los transportadores en neonatos	115
2.2.1. Estudio de los transportadores en el tronco del encéfalo mediante western blot.....	115
2.2.2. Localización de los transportadores de membrana mediante inmunohistoquímica	119
V. DISCUSION	133
1. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN TESTÍCULO.....	133
1.1. Expresión de transportadores de glucosa en testículo.....	133
1.2. Posible función de GLUT8	135
1.3. Regulación por la diabetes.....	138
2. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN MOTONEURONAS RESPUESTA A LA AXOTOMÍA	141
3. CONSIDERACIONES FINALES.....	146
VI. CONCLUSIONES	147
VII. RESUMEN	149

VIII. SUMMARY151

IX. BIBLIOGRAFÍA..... 152

I. INTRODUCCIÓN

1. LA GLUCOSA COMO FUENTE DE ENERGÍA. EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA

La mayoría de las células eucariotas dependen de un aporte de glucosa continuo como su principal fuente de generación de ATP y almacenamiento de sustratos energéticos.

La glucosa se obtiene a través de la digestión y absorción de los nutrientes ingeridos en la dieta habitual. Una comida típica contiene una mezcla de carbohidratos, proteínas, lípidos, agua, electrolitos y vitaminas. Las grandes moléculas orgánicas deben ser digeridas para poder ser absorbidas, y de esto se encargan enzimas proteasas, lipasas y carbohidrasas que degradan las proteínas, los lípidos y los carbohidratos respectivamente a lo largo del tracto digestivo

Los carbohidratos son digeridos por α -amilasas y carbohidrasas secretadas por las glándulas salivares, el estómago, el intestino y el páncreas. Estas enzimas degradan los carbohidratos a su paso por el tracto digestivo hasta convertirlos en disacáridos y trisacáridos. La hidrólisis se completa en la superficie de las microvellosidades de los enterocitos donde la maltasa, isomaltasa, sacarasa y lactasa rompen los disacáridos y trisacáridos para convertirlos en azúcares simples, glucosa, fructosa y galactosa (Alpers, 1994).

La absorción de los azúcares tiene lugar en los enterocitos. Tras la absorción intestinal, los azúcares alcanzan la sangre, y a través de la circulación llegan a los diferentes tejidos donde son captados por las células para generar ATP, y con esta energía sintetizar los metabolitos necesarios para realizar su función.

El exceso de glucosa en sangre se almacena en tejidos como el hígado, y de manera insulino dependiente, en el músculo esquelético y el tejido adiposo, reduciendo así el impacto de futuras carencias. En este periodo de captación celular es necesaria la existencia de proteínas transportadoras específicas que faciliten la entrada de monosacáridos en las células de los diferentes tejidos.

2. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA GLUT

Los azúcares son moléculas hidrofílicas, por lo que no pueden atravesar directamente la bicapa lipídica de la membrana celular. Para poder ser transportados a

través de ella existen diversas moléculas transportadoras que facilitan este paso. Estas moléculas transportadoras pertenecen a dos familias con diferente mecanismo de acción: la familia Sodium Glucose Transporter (SGLT), que realiza un transporte activo secundario, y la familia GLUT de transportadores facilitadores (Scheepers et al., 2004; Uldry and Thorens, 2004; Wright and Turk, 2004).

Transportando siempre a favor de gradiente de concentración de su sustrato, los transportadores de la familia GLUT son los encargados de la entrada y salida de los monosacáridos en todas las células del organismo, y a pesar de que todos ellos son transportadores de hexosas, se sabe que estas proteínas difieren en cuanto a su expresión tisular, sus propiedades bioquímicas, la especificidad de sustrato, y la regulación de su expresión en diferentes estados metabólicos.

El primer transportador de esta familia, GLUT1, fue clonado en 1985 (Mueckler et al., 1985). Posteriormente, nuevas moléculas de esta familia fueron identificadas, y en la actualidad son ya 13 los transportadores GLUT identificados, cuyas características principales han sido revisadas recientemente (Joost and Thorens, 2001; Uldry and Thorens, 2004; Wood and Trayhurn, 2003). Todas estas moléculas están estructuralmente relacionadas. Son glucoproteínas con un peso molecular entre 45 y 55 kDa, que presentan doce dominios transmembrana en estructura α -hélice. Sus extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales, al igual que una gran asa central, se orientan hacia el lado citoplasmático. Además presentan un sitio de glucosilación en la región externa de la membrana. Cada una de las diferentes isoformas de los GLUT tiene ubicación y características cinéticas propias, adaptadas a las necesidades metabólicas de los distintos tejidos del organismo (Joost et al., 2002).

Los miembros de la familia GLUT se han dividido en tres subclases dependiendo de su estructura y función (Joost and Thorens, 2001) (figura I.1). Dentro de la **clase I** se incluyen los transportadores de glucosa GLUT1-4. Los residuos que parecen específicos en esta clase son una glutamina en la hélice 5 (motivo QL que corresponde con Q161 en GLUT1) y el motivo STSIF en el bucle extracelular 7 (Doege et al., 1998). La **clase II** comprende el transportador específico de fructosa GLUT5 y tres proteínas relacionadas, GLUT7, GLUT9 y GLUT11. Lo más característico en la secuencia de estos transportadores es la carencia de triptófano que sigue al motivo GPXXXP en la hélice 10. La **clase III** comprende cinco isotipos: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12, y HMIT1 (GLUT13). Esta clase se caracteriza por tener el bucle 1 extracelular muy corto y además no está glucosilado, ya que la glucosilación aparece en el bucle 9 (figura I.2).

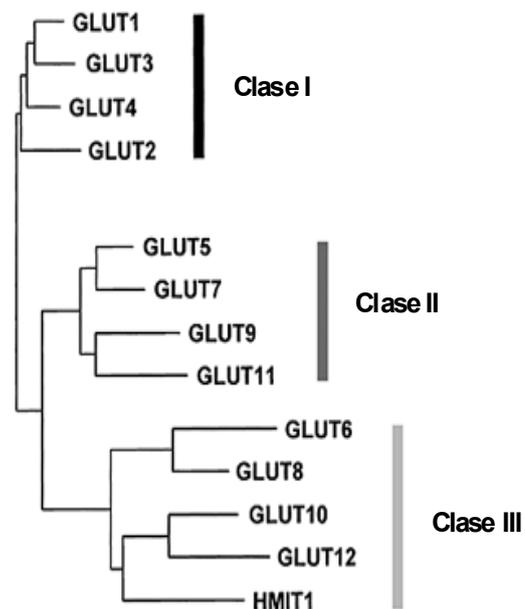


Figura I.1: Dendograma de la alineación múltiple de todos los miembros de la familia GLUT (según Joost y cols. 2002).

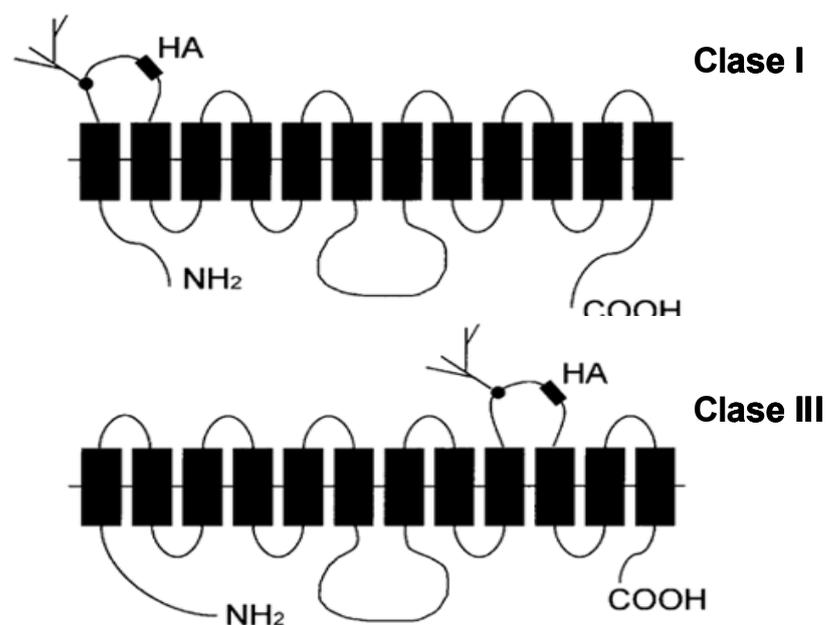


Figura I.2: Modelo de la estructura secundaria de transportadores GLUT pertenecientes a la clase I y clase III, donde se muestran las 12 hélices transmembrana y los posibles sitios de N-glicosilación (Lisinski et al., 2001).

Los componentes de la familia GLUT, su localización y sus características más importantes son los siguientes (tabla I.1):

GLUT1. Fue clonado por primera vez en humanos (Mueckler et al., 1985). Es una proteína de 492 aminoácidos. Transporta glucosa, galactosa, manosa y glucosamida. Se encuentra en casi todos los tejidos con distintos niveles de expresión en los diferentes tipos celulares. Los niveles de expresión normalmente se correlacionan con la tasa de metabolismo celular de glucosa. Se expresa principalmente en los eritrocitos, las células endoteliales, las células de la retina y las barreras hematoencefálica y placentaria (revisado en Guo et al., 2005).

GLUT2. Fue clonado en rata (Thorens et al., 1988) y en tejido humano (Fukumoto et al., 1988). Es una proteína de 524 aminoácidos. A diferencia de otros GLUT su afinidad por la glucosa es baja. Transporta además, galactosa, manosa y fructosa, y tiene una alta afinidad por el transporte de glucosalina. Está presente en la membrana basolateral del intestino y de las células epiteliales absortivas del riñón (Thorens et al., 1990), participando en el transporte transepitelial de glucosa. También se localiza en los hepatocitos y células β pancreáticas en cantidades elevadas. En los hepatocitos se encuentra en la membrana sinusoidal donde está involucrado en la captación y liberación de la glucosa a la sangre y en las células β pancreáticas en la membrana plasmática donde cataliza el primer paso en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Guillam et al., 2000; Matschinsky, 1996). Estudios funcionales han demostrado la importancia de GLUT2 en otras regiones, en particular en el sistema porta hepático (Burcelin et al., 2000), el hipotálamo y el tronco del encéfalo. Estas unidades sensibles a la glucosa están involucradas en el control de la regulación, absorción y captación de glucosa en los tejidos periféricos (Burcelin and Thorens, 2001; Marty et al., 2005).

GLUT3. Fue clonado en tejido humano (Kayano et al., 1988). Es una proteína de 496 aminoácidos. Aparte de glucosa, también transporta galactosa, manosa, maltosa y xilosa. En humanos, se expresa principalmente en cerebro y testículo, donde está presente en los espermatozoides (Haber et al., 1993), y también en músculo esquelético (Stuart et al., 1999). En ratón y rata, se ha detectado en grandes cantidades en cerebro (Choeiri et al., 2002; Fattoretti et al., 2001; Reagan, 2002).

GLUT4. Ha sido clonado en humano (Fukumoto et al., 1989), rata (Birnbbaum, 1989; Charron et al., 1989) y ratón (Kaestner et al., 1989). Es una proteína de 509 aminoácidos. Transporta glucosa y glucosamida. Se localiza principalmente en

músculo esquelético y cardíaco, y en tejido adiposo. Normalmente, se encuentra secuestrado en vesículas intracelulares, y la estimulación por la insulina lleva a una rápida y reversible redistribución hacia la membrana plasmática. La localización subcelular está regulada por la insulina, siendo el principal responsable de la captación de glucosa insulino-dependiente que ocurre en estos tejidos. Las vesículas intracelulares que contienen GLUT4 están sometidas a un ciclo continuo de exocitosis-endocitosis. Cuando la insulina se une a su receptor, se induce un cambio conformacional en éste, que estimula la actividad tirosina-cinasa del mismo. El receptor activado se autofosforila y, a su vez, fosforila varias proteínas en cascada, las cuales inducen todos los efectos celulares de la insulina. Las principales proteínas fosforiladas por el receptor son las denominadas Insulin Receptor Substrate (IRS), que, a su vez, activan otras proteínas, que desencadenan una cascada de eventos moleculares, incluyendo, entre otros, la translocación de las vesículas (Shepherd and Kahn, 1999). Esta exocitosis de vesículas incrementa momentáneamente el número de transportadores GLUT4 en la membrana del miocito o adipocito, y con ello la entrada de glucosa a estas células. Cuando el estímulo cesa se desencadena la endocitosis, en la que están implicados el citoesqueleto y la clatrina (Bryant et al., 2002).

GLUT5. Fue aislado a partir de células epiteliales intestinales humanas (Kayano et al., 1990), y de yeyuno de rata (Rand et al., 1993) y conejo (Miyamoto et al., 1994). Es una proteína de 501 aminoácidos. Prácticamente es un transportador de fructosa, ya que su afinidad por otros monosacáridos, incluyendo la glucosa, es muy pequeña. Se localiza en la membrana apical (Kayano et al., 1990) y basolateral (Blakemore et al., 1995) de los enterocitos, en los espermatozoides (Burant et al., 1992), y las células microgliales del cerebro (Manty et al., 1993).

GLUT6. Ha sido clonado en humanos (Doerge et al., 2000a). Es una proteína de 507 aminoácidos y se expresa predominantemente en cerebro, bazo y leucocitos periféricos. Presenta en su extremo N-terminal un motivo L-L que parece estar implicado en su internalización, siendo expresado aparentemente en compartimentos intracelulares, aunque no se conocen estímulos que faciliten su translocación hasta la membrana plasmática (Uldry and Thorens, 2004).

GLUT7. Ha sido clonado recientemente, demostrando que codifica 524 aminoácidos y comparte un 68% de similitud, y un 53% de identidad con GLUT5 (Li et al., 2004). En humanos está presente en intestino delgado, en colon, en testículo y próstata. En ratas se ha estudiado la expresión de la proteína y se ha detectado en intestino delgado

predominantemente en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos. También se sabe que posee una alta afinidad por el transporte de glucosa y fructosa (Manolescu et al., 2005).

GLUT8. Fue clonado independientemente por 3 grupos en tejido humano, de rata y de ratón (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000). La proteína posee 477 aminoácidos. Se encuentra predominantemente expresado en testículo, y en pequeñas cantidades en otros tejidos, como el cerebro, hígado, riñón, intestino, corazón y músculo esquelético.

GLUT9. Es una proteína de 540 aminoácidos (Phay et al., 2000). Es muy similar a GLUT5 sugiriendo que puede ser un transportador de fructosa. Su ARNm se ha detectado fundamentalmente en riñón e hígado y, a niveles muy bajos, en intestino delgado, placenta, pulmones y leucocitos. Además, se ha detectado la existencia de varias formas alternativas con expresión tejido-dependiente, que son aumentadas en estados diabéticos (Keembiyehetty et al., 2006).

GLUT10. Ha sido aislado a partir de tejido humano y de ratón (Dawson et al., 2001; McVie-Wylie et al., 2001). Es una proteína de 541 aminoácidos y presenta gran similitud con GLUT8. El ARNm humano se ha detectado en corazón, pulmones, cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas, placenta y riñón. Se ha sugerido su posible implicación en problemas de diabetes tipo 2 (Andersen et al., 2003), y mutaciones de este transportador parecen estar asociadas a determinadas patologías cardiovasculares (Coucke et al., 2006).

GLUT11. Es una proteína de 496 aminoácidos (Doege et al., 2001). Su ARNm se expresa en varios tejidos, principalmente en músculo esquelético y corazón, a niveles intermedios en cerebro, intestino delgado, pulmones y leucocitos; y a bajos niveles en el hígado, riñón y placenta. Es relativamente próximo a GLUT5, y se ha observado que su actividad de transporte de glucosa es inhibida por la fructosa. Además se han descrito tres variantes transcripcionales con diferentes promotores y expresión tisular diferenciada, aunque con similares características funcionales (Scheepers et al., 2005).

GLUT12. Ha sido clonado en humano (Rogers et al., 2002). Es una proteína de 617 aminoácidos. Se expresa en corazón, músculo esquelético, tejido adiposo marrón, próstata y glándula mamaria de rata (Macheda et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que GLUT12 parece estar implicado en la reabsorción de glucosa en la nefrona, y su expresión es aumentada en estados de hipertensión y diabetes (Linden

et al., 2006).

GLUT13. Ha sido clonado en rata y humano (Uldry et al., 2001). Tiene 629 aminoácidos. Es un transportador de mioinositol acoplado al H⁺ por lo que inicialmente fue denominado como HMIT1. Se expresa predominantemente en el encéfalo, con una alta expresión en hipocampo, hipotálamo, cerebelo y tronco encefálico. También se localiza en niveles más bajos en tejido adiposo y en el riñón. Como los otros GLUT posee los motivos propios de un transportador de glucosa aunque dicha función no ha sido demostrada todavía (Uldry and Thorens, 2004).

La existencia de esta amplia familia de transportadores de glucosa sugiere que el control de la homeostasis de la glucosa es mucho más complejo de lo que en un principio se pensaba. Aunque, como se ha indicado, se conocen algunos aspectos de la expresión de los transportadores en diferentes órganos y de su funcionamiento en determinadas situaciones, el papel concreto de cada transportador no está todavía aclarado.

Tabla 1.1. Familia de transportadores facilitadores de glucosa (GLUT).

PROTEÍNA	REFERENCIAS	Nº DE AMINOÁCIDOS	CARACTERÍSTICAS DEL TRANSPORTE
GLUT1	(Mueckler et al., 1985)	492	Transporte basal de glucosa
GLUT2	(Fukumoto et al., 1988)	524	Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en intestino y riñón
GLUT3	(Kayano et al., 1988)	496	Transporte basal de glucosa
GLUT4	(Fukumoto et al., 1989)	509	Transporte de glucosa estimulado por insulina
GLUT5	(Kayano et al., 1990)	501	Transporte de fructosa
GLUT6	(Doege et al., 2000a)	507	Transporte de glucosa estimulado por insulina
GLUT7	(Li et al., 2004)	524	Transporte de glucosa y fructosa
GLUT8	(Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000)	477	Transporte de glucosa

GLUT9	(Phay et al., 2000)	540	Transporte de glucosa
GLUT10	(McVie-Wylie et al., 2001)	541	Transporte de glucosa
GLUT11	(Doege et al., 2001)	496	Transporte de glucosa
GLUT12	(Rogers et al., 2002)	617	Transporte de glucosa
GLUT13	(Uldry et al., 2001)	629	Transporte de mioinositol

3. EL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT8

Por su localización, expresión y función, GLUT8 es uno de los transportadores más interesantes de los descritos recientemente. Fue clonado de manera independiente por tres grupos diferentes (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000). Cada uno de estos grupos ha estudiado diferentes aspectos del transportador de glucosa GLUT8, entre los que se encuentran la estructura y morfología de la proteína, su localización celular, la distribución tisular y su posible papel fisiológico.

3.1. Estructura de GLUT8

El gen GLUT8 tiene 10 exones, tanto en la especie humana como en ratón, con un tamaño aproximado de 9 Kb (Scheepers et al., 2001) (figura I.3). La secuencia de aminoácidos humana y de ratón son idénticas en un 86,2 % y en ambas especies constituyen una proteína de 477 aminoácidos. Esta secuencia comprende 12 hélices transmembrana y varios motivos conservados dentro de la familia GLUT que son esenciales para la actividad transportadora de azúcares. En particular los motivos GRK en el bucle 2, PETPR en el bucle 6, QQLSGVN en la hélice 7, DRAGR en el bucle 8, GWGPIPW en la hélice 10, y PETKG en la cola terminal (figura I.4). Además, conserva residuos de triptófano (Trp³⁸⁸ y Trp⁴¹²) presentes en GLUT1 y que están implicados en la unión del inhibidor de transporte citocalasina B.

GLUT8 tiene otras características estructurales que lo diferencian de otros miembros de la familia GLUT. Su bucle 1 es mucho más corto y no está glucosilado, presentando un motivo de glucosilación en el bucle 9, al igual que GLUT6, GLUT10 y

GLUT12, encuadrados todos en la clase III (Joost and Thorens, 2001). Además posee un dominio C-terminal considerablemente corto en comparación con otros GLUTs (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000).

Se puede decir que la proteína GLUT8 comparte la estructura general de los transportadores facilitadores de glucosa que componen la familia GLUT y contiene en su secuencia motivos conservados propios de un transportador de glucosa. Sin embargo, muestra características estructurales que lo distinguen, y su secuencia de aminoácidos presenta gran homología con transportadores de azúcares de plantas y bacterias. Por estas razones, GLUT8 ha sido englobado dentro de la clase III junto con otros transportadores que poseen características similares (Joost and Thorens, 2001).

3.2. Expresión de GLUT8

Gran parte de los estudios realizados hasta la fecha describen la expresión del ARNm de GLUT8 por northern blot, detectándose los mayores niveles de expresión en testículo. El gen también se expresa de manera moderada en otros tejidos como bazo, próstata, intestino delgado y grueso, corazón, distintas regiones del encéfalo y músculo esquelético (Doege et al., 2000b), así como en la glándula adrenal, hígado, tejido adiposo, riñón y estómago (Ibberson et al., 2000). También existe una fuerte expresión en placenta y en el estado embrionario de blastocisto (Carayannopoulos et al., 2000). Igualmente se ha detectado un aumento en la expresión del transportador en la línea celular 3T3-L1 (células pre-adipocitarias) tras la diferenciación celular de los adipocitos (Scheepers et al., 2001), así como en células de carcinoma de colon humano, Caco-2, en las que se expresa fundamentalmente cuando las células se están dividiendo activamente (Romero et al., 2007).

Son menos numerosos los trabajos que estudian la presencia de la proteína, pero distintos trabajos han detectado la presencia de la proteína por western blot o por técnicas inmunohistoquímicas en testículo (Ibberson et al., 2002; Schurmann et al., 2002), blastocisto (Carayannopoulos et al., 2000), varias regiones del encéfalo (Ibberson et al., 2002; McEwen and Reagan, 2004; Reagan et al., 2002; Sankar et al., 2002) y en intestino delgado y grueso (Gómez, 2004). Igualmente se ha descrito la presencia de GLUT8 en la glándula mamaria de la vaca, tejido en el que aumenta su expresión 10 veces al final de la gestación e inicio de la lactación, sugiriendo un papel para el transportador en la captación de glucosa por las células de este órgano (Zhao et al., 2004).

En la mayoría de estos estudios para detectar proteína se utiliza un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de GLUT8 (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000; Reagan et al., 2001) por ser una de las regiones más específicas a la hora de diferenciar los transportadores de la familia GLUT, pero algunos autores, además, también utilizan un anticuerpo dirigido contra una región del bucle citoplasmático que corresponde a los aminoácidos 203-257 (Ibberson et al., 2000).

En cuanto a la detección de la proteína GLUT8 existe una cierta discrepancia en cuanto a su tamaño. Mientras Doege y colaboradores describen una proteína de 42 kDa (Doege et al., 2000b), otros autores observan una proteína entre 38 y 47 kDa mostrándose como una banda difusa en células Cos-7 transfectadas, y una banda de unos 37 kDa en tejido de ratón (Carayannopoulos et al., 2000). Por otra parte, el grupo de Ibberson detecta una banda difusa entre 37 y 50 kDa en células HEK293T transfectadas con GLUT8. Pero que después de deglucosilar las muestras con PNGaseF, la proteína posee un tamaño de 35 kDa.

Como se ha comentado anteriormente, los mayores niveles de expresión proteica y de ARNm de GLUT8 han sido observados en el testículo. Sin embargo, existe una considerable controversia en los resultados mostrados por los diferentes grupos que han estudiado esta cuestión. Así, mientras algunos autores describen la expresión de GLUT8 únicamente en espermatoцитos primarios (Ibberson et al., 2002) en la rata, otros muestran inmunoreactividad en las células más internas del túbulo seminífero y en los espermatozoides, donde parece asociada al acrosoma y la membrana plasmática, en ratones y humanos (Schurmann et al., 2002). Por otra parte, Chen y colaboradores describen los mayores niveles de expresión de GLUT8 en las células de Leydig (Chen et al., 2003). Mientras que Carosa y colaboradores lo han detectado también en células de Sertoli (Carosa et al., 2005).

3.3. Localización subcelular y función de GLUT8

La función de GLUT8 como transportador de glucosa fue demostrada en los primeros estudios generalizados sobre esta proteína. Estos trabajos demostraron que GLUT8 es un transportador de glucosa. Su actividad transportadora se ha conocido gracias a estudios fisiológicos y de competición de sustratos en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el de ARNc de GLUT8 de rata (Ibberson et al., 2000), y en liposomas de lecitina donde se incorporaron proteínas de GLUT8 purificadas a partir

de membranas celulares de células Cos-7 previamente transfectadas con el ADNc de GLUT8 (Doege et al., 2000b). Sin embargo, su función real *in vivo* a nivel celular o de un tejido en concreto, no se ha aclarado todavía.

Parece existir una gran unanimidad por la mayor parte de los trabajos publicados en situar a GLUT8 como una proteína transportadora que se encuentra localizada en compartimentos intracelulares, la cual y bajo determinados estímulos puede modificarse llegando incluso hasta la membrana celular.

En células HEK293T transfectadas con el correspondiente ADNc de GLUT8 se ha demostrado que GLUT8 se mantiene internalizado gracias a un motivo dileucina (L-L) en el extremo amino terminal de la proteína. Si esta región era mutada, por ejemplo por dos motivos alanina, la proteína aparecía expresada directamente en la membrana plasmática (Ibberson et al., 2000), sugiriendo que este motivo L-L sería el responsable de la internalización o secuestro del GLUT8 en determinados compartimentos intracelulares.

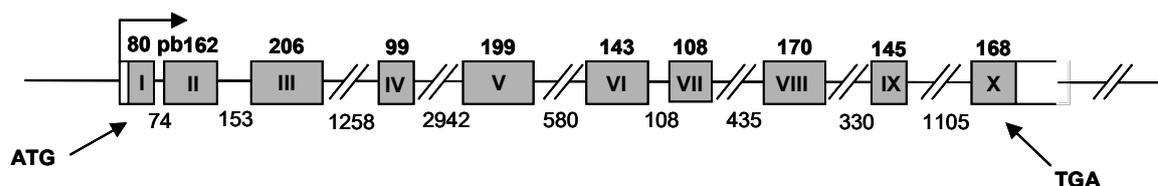
En blastocistos de ratón se ha demostrado mediante inmunofluorescencia la presencia de GLUT8 en compartimentos o vesículas intracelulares en un estado basal. Al tratar los blastocistos con insulina, la distribución celular de GLUT8 cambia, apareciendo la proteína en la membrana plasmática para transportar glucosa en una función que parece esencial para la supervivencia de los blastocistos (Carayannopoulos et al., 2000; Pinto et al., 2002). Otros estudios inmunohistoquímicos en ratas (Reagan et al., 2001) sugieren también que GLUT8 se localiza en compartimentos citoplasmáticos aunque no descartan la posibilidad de que pueda translocarse a la membrana plasmática bajo determinados estímulos.

En el hígado de ratón la expresión de GLUT8 también se modifica gracias a la insulina. Los niveles de ARNm de GLUT8 están correlacionados con la cantidad de insulina circulante: en diabetes de tipo I (ratones tratados con estreptozotocina) disminuye la expresión, mientras que en diabetes de tipo 2 (ratones heterocigotos para GLUT4) aumenta su expresión, sugiriendo que la insulina regula la expresión de GLUT8, en relación con la homeostasis de la glucosa (Gorovits et al., 2003). Otros estudios muestran que la administración de glucosa provoca un cambio en la localización de GLUT8 en el retículo endoplásmico del hipocampo de rata, cambio que es anulado en estados diabéticos inducidos por estreptozotocina, lo que sugiere que la insulina es un estímulo para la translocación del transportador en este sistema. Sin

embargo, este cambio de localización no lleva al transportador a la membrana plasmática sino a otras zonas del retículo endoplásmico (Piroli et al., 2002), concretamente la proteína se transloca desde las LDM (vesículas de baja densidad) hasta las HDM (vesículas de alta densidad), sugiriendo que el papel del transportador podría estar relacionado más con el tráfico intracelular de glucosa en los procesos de glucosilación y deglucosilación que con la entrada de glucosa en la célula. Sin embargo, el papel de la insulina regulando la localización de GLUT8 ha sido puesta en cuestión por otros trabajos (Shin et al., 2004) que no han apreciado translocación de GLUT8 en respuesta a la insulina en células de neuroblastoma N2A.

En un estudio reciente se ha observado que la inactivación del gen *glut8* en ratón no provoca alteraciones vitales ni en el desarrollo embrionario y ni postnatal, aunque el número de ratones homocigotos nacidos es algo menor del esperado, lo que sugeriría una cierta letalidad embrionaria. Los ratones adultos *glut8*^{-/-} tienen un desarrollo normal, siendo también normal la homeostasis de la glucosa. Los únicos efectos observados en estos ratones es un aumento en la proliferación de células del hipocampo, sin observarse defectos ni en la adquisición ni en retención de la memoria y ligeras modificaciones, sin efectos patológicos, en el electrocardiograma (Membrez et al., 2006).

GLUT8 de ratón



GLUT8 humano

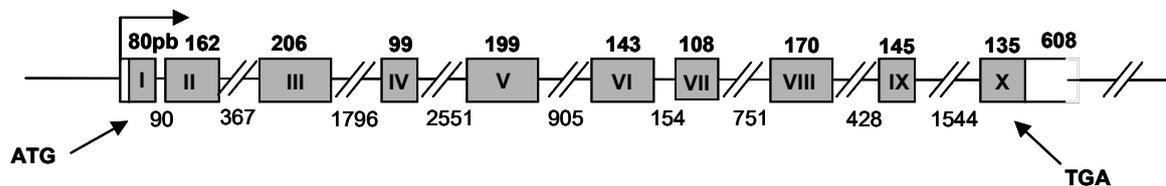


Figura I.3. Organización exónica - intrónica del gen GLUT8 de ratón y humano (según Scheepers et al., 2001).

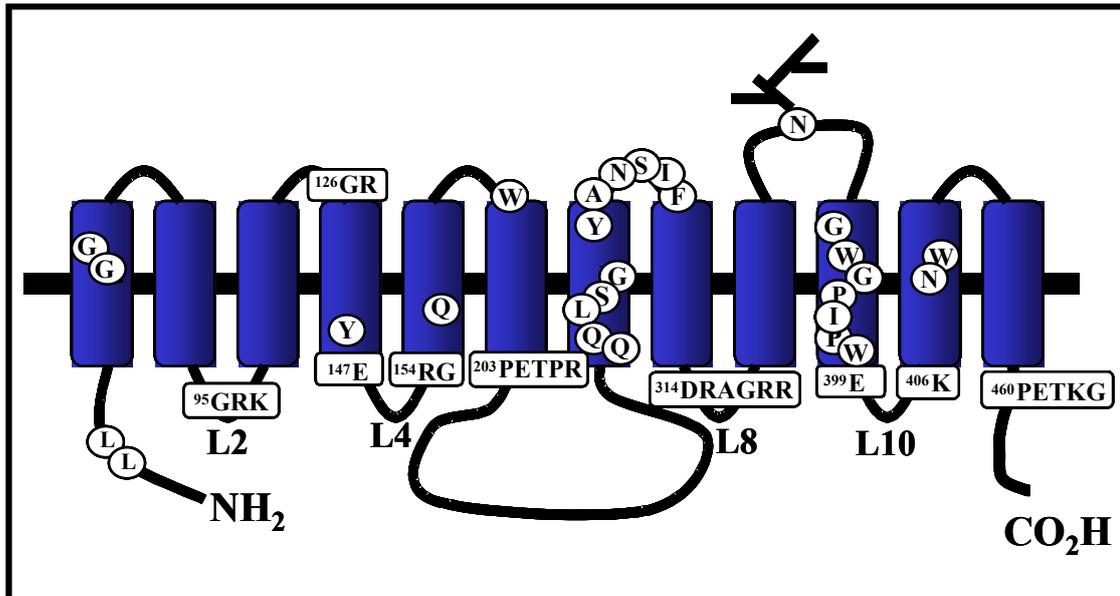


Figura I.4. Estructura de GLUT8 basada en predicciones estructurales obtenidas con el programa HELIXMEM (según Doege et al., 2000b). GLUT8 tiene 12 hélices transmembrana, un motivo GRR/K en los bucles 2 y 8, residuos de glutamato y arginina en los bucles 4 y 10, los motivos PESPR y PETKG después de las hélices transmembrana 6 y 12. Características diferenciales: la glicosilación en el bucle 9, y posee un motivo dileucina en la región amino-terminal implicado en su internalización.

4. TRANSPORTE DE GLUCOSA EN TESTÍCULO

4.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un complejo proceso mediante el cual las células germinales del macho se transforman gradualmente en espermatozoides dentro de los túbulos seminíferos del testículo. Las células germinales, que se encuentran en la membrana basal o germinal de estos túbulos seminíferos, se dividen y diferencian a medida que migran desde la base hasta la luz, donde se localizan los espermatozoides (para revisión ver Grootegoed et al., 2000; Hess, 1999; Johnson et al., 2000; Krester, 1998; Russell et al., 1990).

El testículo se compone de túbulos seminíferos (figura I.5), en los que se produce la espermatogénesis, separados por tejido intersticial, compuesto por vasos sanguíneos, células linfáticas y células de Leydig, que secretan grandes cantidades de

andrógenos que regulan el proceso de la espermatogénesis (Krester, 1998).

4.1.1. El túbulo seminífero

Los túbulos seminíferos constituyen una extensa red de tubos dentro del testículo, en cuyo epitelio se realiza la espermatogénesis. El epitelio de los túbulos consiste en dos tipos básicos de células: las células de Sertoli y las células germinales.

Las células de Sertoli son células somáticas cuyo citoplasma se extiende en el espesor de los túbulos y cuya función principal es nutrir a las células germinales a lo largo de su ciclo de desarrollo y diferenciación. Las uniones entre células de Sertoli forman una barrera que ayuda a proteger las células germinales de agentes potencialmente dañinos que circulan por la sangre (Hess, 1999).

Las células germinales se encuentran a diferentes niveles desde la base, donde se encuentran las células más inmaduras, hasta la luz (figura 1.5), a la que se liberan los espermatozoides, y están rodeadas por el citoplasma de las células de Sertoli. Las células germinales se desarrollan como unidades clonales conectadas por puentes intercelulares. Esto provoca una separación incompleta de las células tras la división celular y permite una rápida comunicación de las células y un desarrollo sincrónico de las mismas. Esta sincronía en el desarrollo tiene como resultado que grandes áreas de un túbulo seminífero contengan un gran número de células en el mismo estadio de desarrollo (Russell et al., 1990).

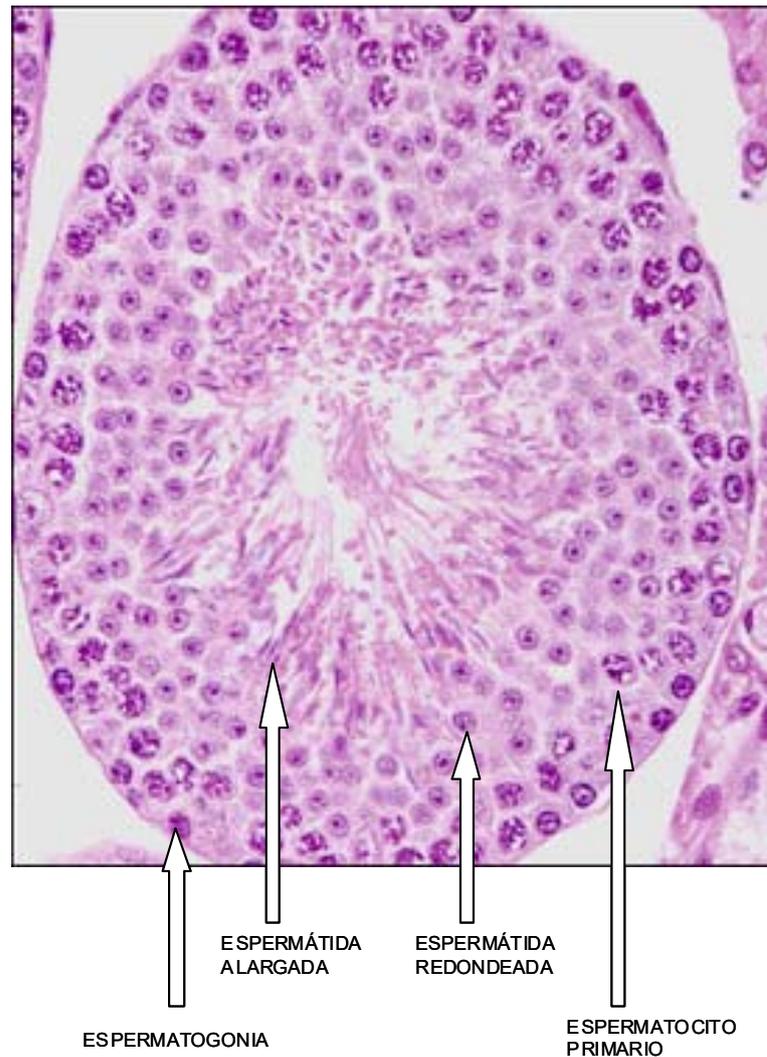


Figura I.5: Tinción de hematoxilina-eosina de una sección de túbulo seminífero de testículo de ratón adulto, en la que se señalan algunos ejemplos de los tipos de células germinales. Magnificación 400X.

4.1.2. Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis se divide en tres fases: proliferación, meiosis y diferenciación, cuyo desarrollo lleva consigo la aparición de tipos celulares específicos (figura I.6).

Proliferación. Las espermatogonias son las células germinales más inmaduras del túbulo seminífero y se localizan en la base del epitelio. Proceden de las células germinales primordiales que han migrado al testículo en desarrollo durante la vida fetal. Las espermatogonias proliferan por mitosis repetidas siendo capaces por una

parte de autorenovarse y por otra de iniciar la diferenciación que llevará la producción de espermatozoides. Se han descrito diversos tipos de espermatogonias según la especie. En los roedores se han identificado varias espermatogonias de tipo A, que se dividen mitóticamente y forman espermatogonias intermedias y de tipo B. Las espermatogonias de tipo B son las últimas que se dividen por mitosis.

Meiosis. Las últimas espermatogonias producidas por divisiones mitóticas entran en meiosis convirtiéndose en espermatocitos primarios, que se dividirán posteriormente para formar espermatocitos secundarios. Estos últimos son células con vida media muy corta que se dividen rápidamente para formar las espermátidas redondeadas. En resumen, el proceso de meiosis consiste en un mecanismo en el que las células germinales duplican su contenido en ADN y posteriormente se dividen dos veces produciendo cuatro células, cada una de las cuales contiene la mitad de los cromosomas que el resto de células del organismo.

La duplicación del ADN ocurre en la fase de proleptotene en el espermatocito primario. Tras este proceso se inicia la profase de la primera división meiótica en la que el espermatocito pasa por las fase de leptotene (en la cual los cromosomas se hacen visibles), cigotene (los cromosomas se emparejan con sus homólogos), paquitene (fase en la cual los cromosomas se acortan y engruesan, aumenta la síntesis de ARN y proteínas y el tamaño de la célula), diplotene (los cromosomas empiezan a separarse) y diacineis (durante la cual se separan completamente los cromosomas, desaparece la membrana nuclear y la célula se dispone a pasar a metafase). El espermatocito primario completa la primera división meiótica (metafase, anafase y telofase) dando lugar a dos espermatocitos secundarios que de nuevo se dividen rápidamente por medio de la segunda división meiótica dando lugar cada uno de ellos a dos células pequeñas y haploides denominadas espermátidas, que inician la siguiente fase denominada diferenciación o espermiogénesis.

Diferenciación o espermiogénesis. Las espermátidas redondeadas producidas como resultado de la segunda división meiótica sufren una serie de importantes cambios que las van a transformar en espermatozoides. Estos cambios se pueden resumir en tres principales que son: i) el núcleo se alarga, se sitúa en la periferia de la células y la cromatina se condensa; ii) el aparato de Golgi produce un gránulo similar a los lisosomas que se sitúa entre el núcleo y la membrana celular y que constituirá el acrosoma; iii) a partir de uno de los centriolos se forma un largo flagelo que en su parte proximal está rodeado por las mitocondrias. El resto del citoplasma es eliminado formando el cuerpo residual que será fagocitado por las

células de Sertoli. Una vez finalizada la diferenciación los espermatozoides recién formados son liberados a la luz de los túbulos.

Las enormes modificaciones morfológicas que experimentan las espermátidas desde su formación inicial como células redondeadas, pasando por su posterior elongación y hasta su transformación final en espermatozoides, permiten diferenciar varias etapas en la espermiogénesis atendiendo a la forma de las células en un momento determinado. Las fases en que se clasifican las espermátidas varían en función de la especie. Por ejemplo, en la rata se describen 19 pasos (Abou-Haila and Tulsiani, 2000). En el ratón se describen 16 pasos desde que una espermátida está recién formada hasta que se libera a la luz (figura I.6) (Russell et al., 1990).

Aunque los primeros espermatozoides no aparecen hasta la madurez sexual, la espermatogénesis se inicia ya en fases tempranas del desarrollo ya que las primeras mitosis de las células germinales, que conducen a su autorenovación, tienen lugar incluso antes del nacimiento de los animales. En el ratón, tras el nacimiento, durante los siete primeros días de vida, se produce la fase de mitosis, durante la cual las células germinales sufren divisiones mitóticas y dan lugar a las espermatogonias. Posteriormente empiezan a aparecer los primeros espermatoцитos primarios que se detectan ya el 10º día postnatal en fase de leptotene, el 12º día en cigotene, en torno al 14º día de vida en fase de paquitene y el 17º en fase de diplotene. Los espermatoцитos secundarios se detectan por primera vez el día 18, las espermátidas redondeadas el día 20, las alargadas el 30, apareciendo los primeros espermatozoides libres en la luz de los túbulos el día 35 de vida (figura I.7) (Zindy et al., 2001).

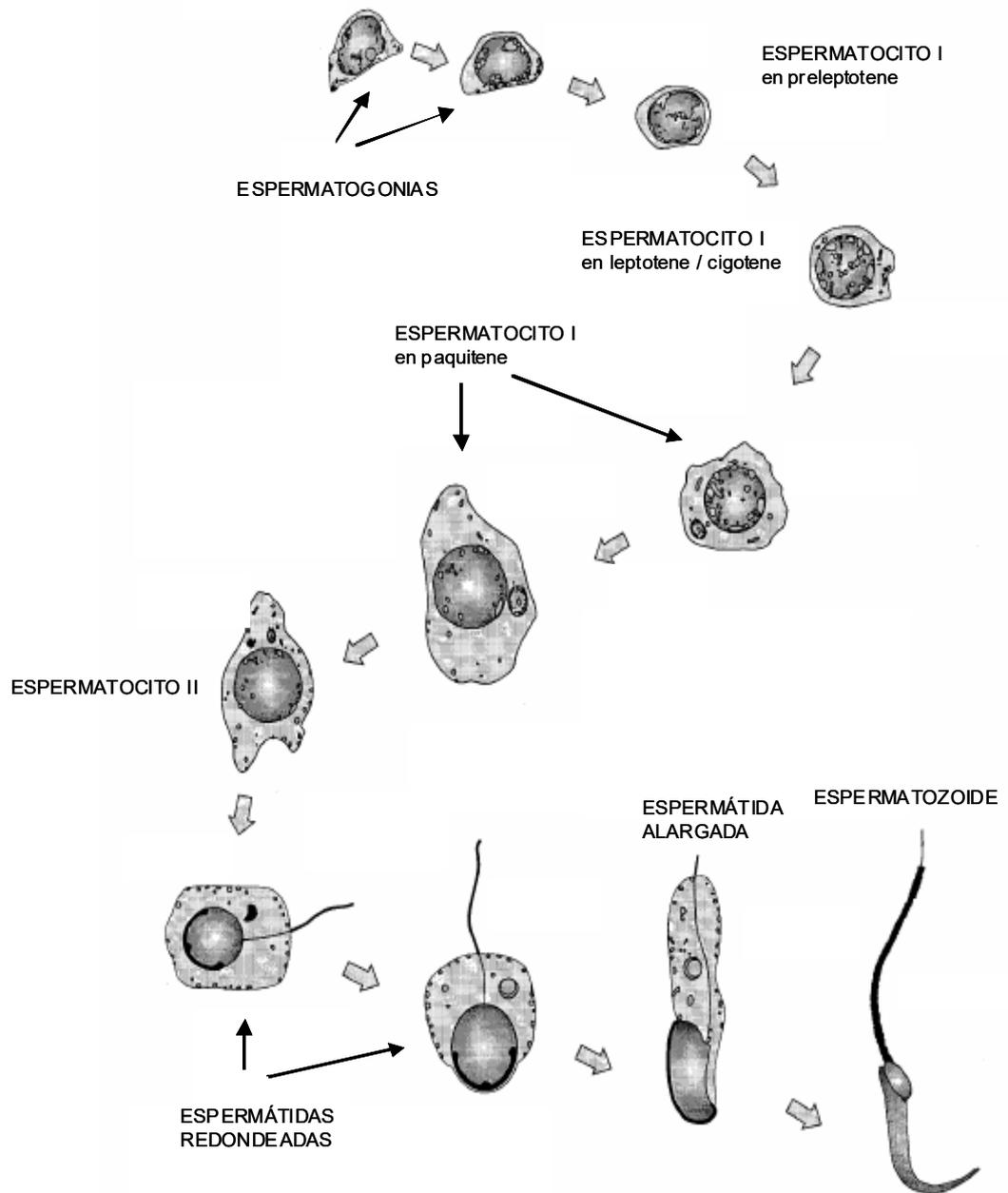


Figura I.6: Esquema de los diferentes tipos celulares que aparecen en la espermatogénesis del ratón. Modificado de (McLachlan et al., 1996).

4.1.3. Formación del acrosoma

Uno de los procesos más importantes que tienen lugar durante la diferenciación de las espermátidas es la formación del acrosoma. El acrosoma es una vesícula derivada del aparato de Golgi, que se localiza en la cabeza de los espermatozoides, y que contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas necesarias en la interacción del espermatozoide con el ovocito y su fecundación. Consta de una

membrana interna, situada sobre la membrana nuclear, y una membrana externa, bajo la membrana plasmática, que posee las moléculas implicadas en el reconocimiento y unión a la zona pelúcida del ovocito en el inicio de los procesos de fecundación. Además de su importancia fisiológica, la forma cambiante del acrosoma en formación permite la identificación de los estadios concretos en los se encuentran las espermátidas.

Durante la formación y evolución del sistema acrosómico se pueden distinguir varias fases en función de la forma que adopta el acrosoma (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Oko and Clermont, 1999; Ramalho-Santos et al., 2002; Yoshinaga and Toshimori, 2003).

Fase de Golgi: En las fases iniciales de la espermiogénesis (espermátidas redondeadas) el aparato de Golgi consiste en un sistema de túbulos y vesículas localizado cerca de uno de los polos del núcleo. En esta fase se forman numerosos gránulos pro-acrosómicos a partir del aparato de Golgi que se dirigen hacia las proximidades del núcleo. Estos pequeños gránulos se fusionan entre sí para formar un gránulo acrosómico de gran tamaño que establece contacto con la envoltura nuclear.

Fase de capucha o cubierta: El tamaño de la vesícula acrosómica aumenta por la adición de nuevas glucoproteínas procedentes del aparato de Golgi. El sistema acrosómico en desarrollo crece y se expande sobre la superficie nuclear, y acaba cubriendo aproximadamente la mitad del núcleo.

Fase de acrosoma: El aparato de Golgi se separa del acrosoma cesando así el aporte de glucoproteínas del mismo. Posteriormente el aparato de Golgi será eliminado. Al mismo tiempo, el acrosoma se condensa y se adapta a la forma del núcleo, que posee una forma típica dependiendo de cada especie.

De esta manera el acrosoma queda como una vesícula que contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas, tales como glicohidrolasas ácidas, proteinasas, esterasas y aril sulfatasas (Tulsiani et al., 1998). Una vez formados los espermatozoides en el tránsito a través del epidídimo, el acrosoma sufre algunas modificaciones, fundamentalmente concentrando su contenido y modificando alguna de sus proteínas. La principal función del acrosoma es llevar a cabo la denominada reacción acrosómica, que consiste en la liberación del contenido del acrosoma para facilitar la penetración del espermatozoide en el ovocito (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Tulsiani et al., 1998).

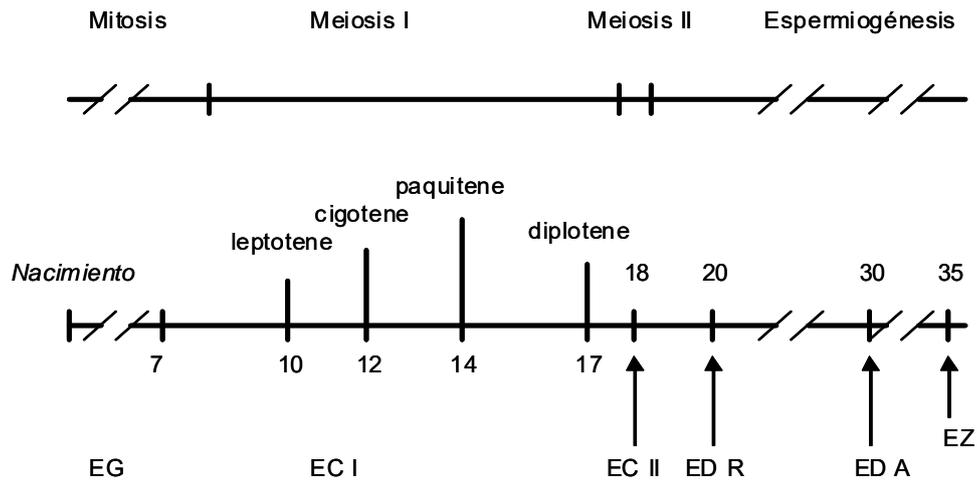


Figura I.7.: Esquema de la primera ola de la espermatogénesis en ratón con indicación de la secuencia de sucesos que tienen lugar en los primeros 35 días de vida. Durante los primeros días las únicas células germinales presentes son espermatogonias (EG), que se multiplican por mitosis. A continuación, empiezan a entrar en meiosis transformándose en espermatocitos primarios (EC I), que pasan por las fases de leptotene, cigotene, paquitene y diplotene antes de dividirse en espermatocitos secundarios (EC II). Éstos a su vez rápidamente sufren una segunda división meiótica que produce las primeras espermatocitos redondeados (ED R), las cuales se transforman progresivamente en espermatocitos alargados (ED A) y posteriormente en espermatozoides (EZ) (según Zindy et al., 2001).

4.1.4. Estadios de la espermatogénesis en ratón y en rata

Un estadio o asociación celular de la espermatogénesis viene definido por el grupo de células germinales en una determinada fase de desarrollo, que aparecen en una sección transversal de los túbulos. En la espermatogénesis de la rata se describen 14 estadios y en la del ratón 12 (figura I.8). Cada estadio está compuesto por varios tipos concretos de células germinales, y siendo el estadio VIII durante el que se produce la liberación de los espermatozoides a la luz en ambas especies (ver figura I.8). La clasificación de los diferentes estadios se realiza analizando las células presentes en la sección de un túbulo seminífero, prestando especial atención a las espermatocitos y más concretamente a la forma del acrosoma. Es ésta una estructura de forma variable que determina, en función de la forma que adopta a lo largo de su desarrollo, la descripción de varios tipos de espermatocitos según la especie. Así, se describen 19 tipos de espermatocitos en rata y 16 en ratón. (Hess, 1999; Russell et al.,

1990).

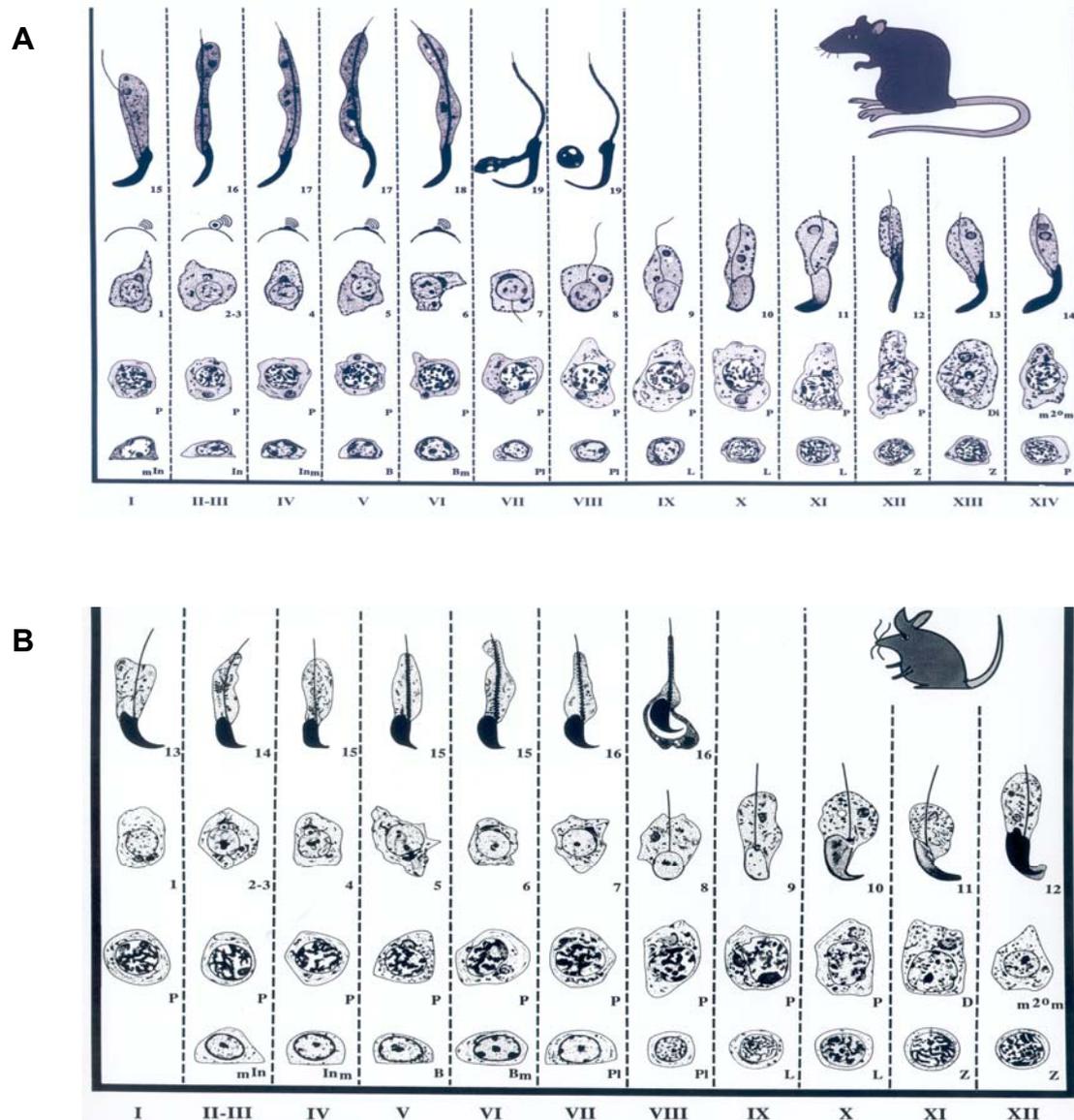


Figura I.8. Mapas del ciclo de la espermatogénesis en rata (A) y ratón (B). Las columnas, designadas con números romanos indican asociaciones (estadios). La progresión de una célula se sigue de izquierda a derecha. Al llegar al final de una fila, la progresión sigue en la fila superior, empezando por la izquierda (Russell et al. 1990).

4.2. Expresión de los transportadores de glucosa en testículo

El metabolismo de los azúcares en el testículo presenta peculiaridades

respecto a otros órganos, ya que una parte importante de sus células no se nutren directamente a partir de la glucosa. En concreto, las espermatidas no utilizan la glucosa directamente como fuente de energía, sino que se nutren casi exclusivamente a partir del lactato liberado por las células de Sertoli, células que, por el contrario sí que consumen grandes cantidades de glucosa (al igual que las espermatogonias y los espermatoцитos). Cuando los espermatozoides son finalmente liberados a la luz de los túbulos, vuelven a utilizar tanto la glucosa como la fructosa como material energético (Bajpai et al., 1998).

A medida que se han ido identificando transportadores de la familia GLUT, el estudio de su expresión y función en el testículo ha adquirido mayor complejidad. Por una parte, el número de transportadores que aparecen expresados en este órgano es creciente. Y por otra, parece existir una cierta variabilidad entre especies en relación a la expresión y localización de algunos transportadores en el testículo. Incluso en una misma especie, distintos autores muestran expresiones diferentes para un mismo transportador (ver tabla I.2).

Tabla I.2.: Localización de los transportadores de glucosa en testículo.

TRANSPORTADOR	TIPO CELULAR	MÉTODO DE DETECCIÓN	REFERENCIA
GLUT1	Células endoteliales y del estroma (baja expresión, en rata y humano)	Inmunohistoquímica (IHC)	Burant and Davidson, 1994
	Células de Leydig en cultivo (rata)	RT-PCR	Chen et al., 2003
	Células de Sertoli en cultivo	Northern blot y RT-PCR	Carosa et al., 2005
	Células mioides peritubulares, células intersticiales, células endoteliales y espermatoцитos de rata (no se expresa ni en ratón ni en humano)	IHC	Kokk et al., 2004
	Células germinales maduras (humano) y espermatozoides de humano, rata y toro	IHC	Angulo et al., 1998
GLUT2	Células de Sertoli, células mioides peritubulares, espermatoцитos, espermatidas, células endoteliales y células intersticiales de rata y ratón. No se detecta en humano.	IHC	Kokk et al., 2004
	No se detecta en rata	WB	Burant and Davidson, 1994

	Células germinales maduras (humano) y espermatozoides de humano, rata y toro	IHC	Angulo et al., 1998
GLUT3	Células de Leydig en cultivo (rata)	RT-PCR	Chen et al., 2003
	Células germinales maduras y espermatozoides (rata y humano)	WB, IHC	Burant and Davidson, 1994
	Células de Sertoli, células mioides peritubulares, células intersticiales, células endoteliales testiculares y espermatocitos (humano, ratón, rata).	IHC	Kokk et al., 2004
	Espermátidas (humano) y espermatozoides de humano, rata y toro.	IHC	Angulo et al., 1998
	Células de Leydig	IHC	Ballester et al., 2004
GLUT4	No se detecta en humano, ratón ni rata	IHC	Kokk et al., 2004
	No se detecta en rata	WB	Burant and Davidson, 1994
	Células germinales maduras (humano). No se observa en espermatozoides (rata, toro, humano).	IHC	Angulo et al., 1998
GLUT5	Espermátidas alargadas y espermatozoides humanos	RT-PCR, IHC	Burant et al., 1992
	Espermátidas maduras (humano) y espermatozoides (humano, rata y toro.)	IHC	Angulo et al., 1998
GLUT7	Testículo	Northern blot	Li et al., 2004
GLUT8	Espermatocitos	RT-PCR, hibridación <i>in situ</i> , y WB	Ibberson et al., 2002
	Células de Leydig, células germinales (rata)	RT-PCR y western blot	Chen et al., 2003
	Espermátidas y espermatozoides	Northern blot e IHC	Schurmann et al., 2002
	Células de Sertoli en cultivo	RT-PCR y Northern blot	Carosa et al., 2005

A pesar de las contradicciones que reflejan los diversos estudios respecto a la expresión de transportadores de glucosa en testículo, en los últimos años GLUT8 se ha mostrado como uno de los transportadores con mayores niveles de expresión (Chen et al., 2003; Ibberson et al., 2002; Schurmann et al., 2002). Sin embargo, existen discrepancias en los resultados mostrados por estos grupos en cuanto a las células que expresan este transportador.

Ibberson y colaboradores (2002) analizando testículos de rata mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, observaron que la expresión de GLUT8 no se producía en todos los túbulos seminíferos, sino que sólo aparecía en algunos de ellos. Estos resultados parecen indicar que la expresión de GLUT8 no se produce en todas las células germinales testiculares de la rata, y sugieren que el marcaje obtenido en unos túbulos o en otros depende de la fase del ciclo espermatogénico en que cada túbulo se encuentre. En concreto, según estos autores, las células que expresan GLUT8 son los espermatoцитos primarios en sus fases iniciales de preleptotene, leptotene y cigotene. Además, señalan que la expresión de GLUT8 se restringe a las células de los túbulos seminíferos, sin observar ninguna expresión en el estroma testicular, ni en las células de Leydig.

Prácticamente al mismo tiempo, otro grupo (Schurmann et al., 2002) detectó por inmunohistoquímica la presencia de GLUT8 en las células más internas de los túbulos seminíferos (sin especificar los tipos celulares), en el acrosoma de los espermatozoides, y en los túbulos del epidídimo de ratones macho.

Posteriormente otro grupo observó, sin embargo, la expresión por RT-PCR de GLUT8 en extractos de células germinales testiculares, en células germinales aisladas del epidídimo y en células de Leydig de rata (Chen et al., 2003).

Más recientemente también se ha detectado GLUT8, mediante northern blot y RT-PCR, en células de Sertoli aisladas y puestas en cultivo (Carosa et al., 2005).

De estos resultados se deduce que GLUT8 es uno de los principales transportadores de glucosa del testículo, aunque existen discrepancias sobre su exacta localización celular. Aparte de GLUT8, otros transportadores de difusión facilitada de la familia GLUT son también expresados en este tejido. De entre los que se han descrito, GLUT3 y GLUT5 son los de mayor relevancia (ver tabla I.2).

En relación a GLUT3, se ha publicado que en la especie humana sólo se expresa en las células germinales más maduras (probablemente espermátidas y

espermatozoides), mientras que en la rata parece expresarse en casi todas las células germinales (Burant and Davidson, 1994), y en las células de Leydig (Ballester et al., 2004; Chen et al., 2003). En los espermatozoides está localizado en todas las especies estudiadas en su pieza intermedia. Aunque en humano y rata también se expresa a lo largo de todo el flagelo (Angulo et al., 1998). Otros autores, por el contrario, detectan la expresión en espermatocitos primarios, células de Sertoli, mioideas y endoteliales (Kokk et al., 2004).

Respecto a GLUT5, se conoce que en la especie humana sigue el mismo patrón que GLUT3 (Angulo et al., 1998; Burant et al., 1992).

Además de estos transportadores se ha descrito la presencia de otros con niveles de expresión muy inferiores. Se ha descrito la expresión de bajos niveles de GLUT1 en rata y humano, probablemente en células endoteliales y del estroma (Burant and Davidson, 1994); pero también en células de Leydig de rata (Chen et al., 2003) y en células mioideas, endoteliales y espermatocitos de rata, pero no en humano ni en ratón (Kokk et al., 2004). Se han detectado niveles más elevados de este transportador, GLUT1, en testículos de rata prepúberes, sobre todo en las células de Sertoli inmaduras (Carosa et al., 2005), y en espermatozoides y células germinales de rata, humano y toro (Angulo et al., 1998). También se ha detectado el ARNm de GLUT7, transportador próximo por su estructura y función a GLUT5, en testículo humano sin que se haya descrito la presencia de la proteína (Li et al., 2004). Respecto a GLUT2, algunos autores describen su expresión en rata y ratón (en células de Sertoli, espermatocitos, espermatidas y células endoteliales) pero no en humano (Kokk et al., 2004), otros lo detectan en espermatozoides humanos (Angulo et al., 1998), mientras que otros trabajos no lo han detectado (Burant and Davidson, 1994).

4.3. Regulación por la insulina y estados diabéticos

Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa provocan diferentes disfunciones en la reproducción. Los espermatozoides de hombres diabéticos son de menor tamaño, presentan mayor grado de inmadurez y menor movilidad. Tanto sus núcleos como los acrosomas presenta formas anormales, la membrana plasmática está rota en un porcentaje importante de las células germinales, existiendo además, un aumento de la apoptosis de estas células. Por el contrario, no hay diferencias significativas en los niveles de LH, FSH y testosterona ni en el volumen seminal, concentración y número total de espermatozoides con respecto a los individuos sanos

(Baccetti et al., 2002).

La administración de estreptozotocina (stz) en animales induce un estado de diabetes tipo 1. La stz penetra en las células beta pancreáticas mediante GLUT2 y provoca cambios en el ADN que conducen a su muerte celular (Szkudelski, 2001). El tratamiento con stz en ratas y ratones produce una reducción del tamaño de los testículos, la aparición de defectos en las células de Leydig, con un descenso de producción de testosterona y un incremento de secreción pituitaria de LH y FSH (Anderson and Thliveris, 1987; Ballester et al., 2004; Sanguinetti et al., 1995). También se ha observado en ratas tratadas con estreptozotocina una reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos y un incremento en el número de vasos sanguíneos y diversas alteraciones en las células germinales (Anderson and Thliveris, 1986). En ratas diabéticas también se ha descrito un descenso de la fertilidad, prolificidad y del libido (Anderson and Thliveris, 1986; Ballester et al., 2004).

A pesar de las evidentes alteraciones en el metabolismo de la glucosa provocadas por la diabetes hay pocos trabajos que estudien la variación de los transportadores de este azúcar en testículo de animales diabéticos. Hace ya tiempo Burant y Davidson mostraron que los niveles de GLUT3 estudiados por RT-PCR, western blot e IHC no se modificaban en los testículos ratas diabéticas (Burant and Davidson, 1994). Más recientemente, otros autores han mostrado que, aunque los niveles totales medidos por western blot no están alterados, la intensidad del marcaje por inmunohistoquímica se ve disminuida (Ballester et al., 2004).

GLUT8, como se ha indicado anteriormente, es uno de los principales transportadores de glucosa del testículo, y aparece como un posible candidato a estar regulado en estados diabéticos, puesto que en algunos sistemas se ha descrito su regulación por la glucosa y la insulina, especialmente, cuando GLUT4, el principal transportador insulino-dependiente, no es expresado (Carayannopoulos et al., 2000; Pinto et al., 2002).

En blastocistos de ratón el tratamiento con insulina modifica la localización celular de GLUT8 haciendo que se sitúe la proteína en la membrana plasmática, presumiblemente para transportar glucosa (Carayannopoulos et al., 2000), función que parece esencial para la supervivencia de los blastocistos (Pinto et al., 2002). En células 3T3-L1, los niveles de GLUT8 disminuyen con la reducción de los niveles de glucosa del medio (Scheepers et al., 2001), algo similar a lo que ocurre en células Caco-2 durante su fase de exponencial y puesta en marcha de su diferenciación

(Romero et al., 2007). En hígado, la insulina y la glucosa regulan la expresión de GLUT8 de forma compleja, según se trate de animales con diabetes tipo 1 ó tipo 2 (Gorovits et al., 2003). Otros estudios muestran que la administración de glucosa provoca un cambio en la localización de GLUT8 en el retículo endoplásmico del hipocampo de rata, cambio que es anulado en estados diabéticos inducidos por estreptozotocina (Piroli et al., 2002). Por el contrario, en células de neuroblastoma la insulina no induce la translocación de GLUT8 a la membrana plasmática (Shin et al., 2004).

Finalmente, hay que indicar que el papel de la insulina en la función reproductiva masculina puede ser más complejo de lo que inicialmente se pensaba. Recientemente se ha descrito que los espermatozoides humanos producen y liberan insulina, sugiriendo una regulación autocrina del metabolismo de la glucosa por parte de la insulina. Estudios inmunohistoquímicos revelan que la insulina se localiza en los espermatozoides no capacitados, en la zona subacrosómica, en la pieza intermedia y en la cola; mientras que en los espermatozoides capacitados su expresión se reduce ya que es liberada al líquido seminal (Ando and Aquila, 2005; Aquila et al., 2005).

5. EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

5.1. Expresión de los transportadores GLUT en el sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) utiliza como principal fuente de energía la glucosa, siendo este monosacárido un factor limitante en las funciones nerviosas, desde las más simples como la transmisión de impulsos nerviosos en las neuronas periféricas, hasta las más complejas llevadas a cabo en los centros superiores cerebrales de integración de la información. Varios miembros de la familia de transportadores de difusión facilitada son los responsables de la entrada de glucosa en el tejido nervioso. De los 13 transportadores descritos hasta el momento varios de ellos se expresan en el SNC. Los estudios realizados hasta el momento muestran que GLUT1, GLUT3 y GLUT4 son los principales responsables del transporte de glucosa en cerebro (McEwen and Reagan, 2004). También se ha demostrado la expresión, en menores cantidades, de GLUT2, GLUT5 y recientemente GLUT8 en determinadas regiones del sistema nervioso central. Igualmente, se ha identificado la presencia de

ARNm de GLUT6; aunque no se ha determinado ni su distribución celular ni su localización en el cerebro (ver tabla I.3).

Tabla I.3.: Localización de los transportadores de glucosa en el sistema nervioso central.

TRANSPORTADOR	TIPO CELULAR	REGIÓN CEREBRO	REFERENCIAS
GLUT1	Endotelio de la barrera hematoencefálica. Astrocitos	Homogénea en gran parte del cerebro	Choeiri et al., 2002; Boado y Pardridge, 1990; Kasanicki et al., 1987; Maher et al., 1994; Vannucci et al., 1994; Rayner et al., 1994.
GLUT2	Astrocitos	Núcleo hipotalámico ventricular, núcleo arcuato, y la región hipotalámica lateral	Li et al., 2003; Kip y Hawkins, 2005; Marty et al., 2005
GLUT3	Neuropilo Cuerpo de las neuronas	Gran parte del cerebro	Fattoretti et al., 2001; Reagan et al., 2002; McCall et al., 1994; Gerhart et al., 1992; Choeiri et al., 2002.
GLUT4	Cuerpo de las neuronas, y dendritas	Gran parte del sistema nervioso central	El Messari et al., 1998; Choeiri et al., 2002.
GLUT5	Microglía	Homogénea en gran parte del cerebro	McEwen y Reagan, 2004.
GLUT6	No descrito	No descrito	Doege et al., 2000a
GLUT8	Somatodendritas de neuronas	Hipocampo, corteza, cerebelo, amígdala y núcleo supraóptico	Vannucci et al., 1998a; Choeiri et al., 2002; Reagan et al., 2002; Sankar et al., 2002; McEwen y Reagan, 2001; Pirolli et al., 2002.

La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento muestran que la distribución de los distintos transportadores no es, en general, específica para determinados núcleos encefálicos. La mayoría de los GLUTs que se expresan en sistema nervioso se localizan en la mayor parte de regiones del cerebro y médula espinal, aunque en general parece existir una mayor concentración en las regiones del hipocampo, la corteza cerebral y cerebelo (Choeiri et al., 2002; El Messari et al., 2002;

El Messari et al., 1998; Ibberson et al., 2002; Ibberson et al., 2000; Reagan et al., 2002; Sankar et al., 2002). Sin embargo, la especificidad de su expresión radica más en el tipo de células que los expresan (neuronas, glía) o la parte de las mismas en las que se localizan (soma, neuritas) que en los núcleos concretos.

El primer transportador de glucosa identificado en cerebro fue GLUT1, detectándose dos isoformas que difieren en su nivel de glucosilación. Una isoforma altamente glucosilada de 55 kD permite el transporte de glucosa a través del endotelio vascular que forma la barrera hematoencefálica (Boado and Pardridge, 1990; Kasanicki et al., 1987). Además, una isoforma menos glucosilada de 45 kD se localiza en astrocitos, alrededor de las microvellosidades en el plexo coroideo, y con menor expresión en el parénquima cerebral (Maher et al., 1994; Vannucci et al., 1998). Aunque existen diferencias entre especies, GLUT1 se distribuye de forma heterogénea en la barrera hematoencefálica siendo 3 ó 4 veces superior su presencia en la membrana abluminal que en la luminal (Duelli and Kuschinsky, 2001; Simpson et al., 2001). Varios estudios han detectado por western blot la presencia de GLUT1 de forma homogénea en gran parte del cerebro, con una mayor intensidad en el cerebelo. Mediante inmunohistoquímica se ha observado también la expresión de GLUT1 en la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio (Dobrogowska and Vorbrodt, 1999) y en el estriado (Brant et al., 1993), con los mayores niveles en el córtex frontal y en el hipocampo (Choeiri et al., 2002). Otros estudios han observado ARNm de GLUT1 en la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, el mesencéfalo, el tronco del encéfalo y el cerebelo (Rayner et al., 1994).

Diversos trabajos han mostrado la presencia de GLUT2 en los astrocitos en núcleo hipotalámico ventricular, el núcleo arcuato, y la región hipotalámica lateral (Li et al., 2003; Marty et al., 2005). Sin embargo, otros estudios no han detectado la proteína GLUT2 en el cerebro (Rayner et al., 1994). Se ha sugerido que este transportador puede tener una función de “*sensor de glucosa*” en el cerebro, función que dependería de su expresión en los astrocitos (Marty et al., 2005).

GLUT3 se considera el principal transportador de glucosa de las neuronas. La mayoría de los estudios revelan que GLUT3 se localiza en el neuropilo, estando ausente del cuerpo de las neuronas (Fattoretti et al., 2001; McCall et al., 1994), aunque otros trabajos también han descrito su presencia en el soma neuronal (Choeiri et al., 2002; Gerhart et al., 1992). En cuanto a las regiones concretas que expresan este transportador, se puede considerar que está ampliamente distribuido en todo el SNC (Choeiri et al., 2002; McEwen and Reagan, 2004). Un grupo ha descrito GLUT3

en la membrana de las microvellosidades del cerebro (Gerhart et al., 1992), aunque otros estudios no lo detectan (Choeiri et al., 2002).

GLUT4 se localiza principalmente en el cuerpo de las neuronas, aunque también se ha detectado en las dendritas y las zonas de sinapsis (Choeiri et al., 2002; El Messari et al., 1998). En menor medida el transportador también se localiza en las células de la glía del hipocampo y del cerebelo, en las células endimarias de los ventrículos y en las células endoteliales de las microvellosidades (Choeiri et al., 2002; Vannucci et al., 1998) donde el transportador se co-expresa con GLUT1. El transportador está ampliamente distribuido en el SNC, habiéndose detectado en la médula oblongada, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el cuerpo calloso, el septo, el tálamo, el hipocampo, el mesencéfalo, la médula espinal, en las células endimarias del tercer y cuarto ventrículo, y el cerebelo (Choeiri et al., 2002; El Messari et al., 2002; El Messari et al., 1998; Vannucci et al., 1998). En el cerebelo, donde la expresión del transportador es elevada, GLUT4 se localiza en los procesos neuronales de la capa molecular, en el citoplasma de células granulares y en el soma de las células de Purkinje (Choeiri et al., 2002; El Messari et al., 2002), si bien otros trabajos no han detectado GLUT4 en las células de Purkinje ni en la capa molecular (Vannucci et al., 1998).

Acerca de GLUT5, transportador de fructosa con baja afinidad por la glucosa diversos estudios inmunohistoquímicos revelan que se expresa en la microglía de cerebro humano y de roedores (Maher et al., 1994; Payne et al., 1997).

Respecto a GLUT8, se ha mostrado su expresión en el soma y dendritas neuronales, pero no en la membrana plasmática. Por el contrario, no se detecta el transportador ni en los astrocitos ni en la microglía (Choeiri et al., 2002; Reagan et al., 2002; Sankar et al., 2002). La presencia de este transportador en el SNC parece bastante extendida, habiéndose descrito, entre otras áreas, en la corteza, el cerebelo, el hipocampo, la amígdala y el núcleo supraóptico de la rata (McEwen and Reagan, 2004; Piroli et al., 2002; Reagan et al., 2001).

Curiosamente, estos transportadores presentan diferencias en su expresión ligadas al desarrollo. De esta manera se ha observado que la expresión de GLUT1 se incrementa con el desarrollo en el cerebro de ratas, siendo mayor la intensidad de expresión del transportador en animales de 27 días de edad que a los de 14 días de edad (Vannucci and Simpson, 2003). De forma similar GLUT4 también aumenta con el desarrollo, detectándose una mayor presencia de la proteína a los 21 días tras el

nacimiento en cerebro de ratones (Sankar et al., 2002). Por el contrario, para GLUT8 se ha detectado un descenso en los niveles del transportador a partir de los 21 días de edad (Sankar et al., 2002). Y por último, la regulación de GLUT3 con la edad parece ser la más compleja, ya que su expresión en cerebro aumenta en ratón tras el nacimiento (Rajakumar et al., 2004), pero disminuye en algunas áreas del hipocampo de ratas viejas (Fattoretti et al., 2001).

5.2. Regulación de los transportadores

Poco a poco se va conociendo la distribución y el papel de los transportadores de glucosa en condiciones fisiológicas; sin embargo las implicaciones que éstos tienen en diversos procesos patológicos del sistema nervioso son en gran medida una incógnita.

La mayor parte de los estudios se han centrado en analizar el papel de estas moléculas en modelos animales diabéticos. En este sentido, se ha mostrado un aumento en la expresión de GLUT1 en células madre adultas del SNC sometidas a un elevado aporte de glucosa e hipoxia (Maurer et al., 2006), y en ratas hipoglucémicas (Simpson et al., 1999). Sin embargo, otros trabajos han mostrado que GLUT1 no se altera en cerebelo de ratas diabéticas (Badr et al., 2000), ni en ratones nacidos diabéticos en relación a ratones control (Vannucci et al., 1998). Por otra parte, se ha observado un aumento en la expresión de GLUT3 en diferentes tipos celulares sometidos a estados de hipoxia e hiperglucemia (Maurer et al., 2006), y su translocación del citosol a la membrana plasmática en las neuronas tras la administración de insulina y la despolarización de la membrana (Uemura and Greenlee, 2006). Asimismo, la administración del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) provoca un aumento en la expresión de GLUT3 (Fladeby et al., 2003). Sin embargo, la deficiencia en la utilización local de glucosa en el cerebro no está asociada con alteraciones en los niveles de GLUT1 o GLUT3 (Sonntag et al., 2006), mientras que la expresión de GLUT1 y GLUT3 en la corteza cerebral parece estar regulada por la hormona tiroidea, aunque de forma compleja ya que varía según la edad del animal (Santalucia et al., 2006).

GLUT4 y GLUT8 son transportadores translocables considerados insulino-dependientes en el cerebro, si bien este hecho presenta ciertas dudas en el caso de GLUT8 (Alquier et al., 2006). Los niveles cerebrales de GLUT4 parecen estar controlados por los niveles sanguíneos de insulina y glucosa (Vannucci et al., 1998), al

mismo tiempo que la insulina induce la translocación de GLUT4 del citoplasma a la membrana plasmática en células SH-SY5Y, derivadas de un neuroblastoma humano (Benomar et al., 2006). Sin embargo, la regulación de la expresión de GLUT8 cerebral parece menos clara, puesto que, aunque se ha visto que la variación de la glucemia produce cambios en la localización intracelular de células del hipocampo (Piroli et al., 2002), otros trabajos indican que la diabetes inducida por estreptozotocina produce un aumento de los niveles de ARNm pero no así de proteína (Reagan et al., 2001).

5.3. La axotomía del nervio facial como modelo para estudiar los transportadores de glucosa

Muy poco se conoce acerca de la utilización de la glucosa y de la expresión de sus transportadores en procesos patológicos que afectan a las neuronas motoras, entre los que se incluyen enfermedades tan devastadoras como la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Estas enfermedades, que cursan con muerte de las neuronas motoras y, que generalmente en pocos años acaban con la vida de las personas que las padecen, son en gran medida de causa desconocida. Se sabe que diversas mutaciones en la enzima superóxido dismutasa son la causa de la enfermedad en aproximadamente el 20% de los casos familiares de Esclerosis Lateral Amiotrófica (Guegan and Przedborski, 2003), lo que supone aproximadamente un 2% del total de casos. Del resto no se saben las causas. Por otra parte, lesiones de nervios motores, como por ejemplo las que puede sufrir el propio nervio facial, con causas de diversos orígenes (traumatismos, tumores) pueden provocar la parálisis de los músculos inervados con consecuencias que pueden llegar a ser graves.

Para estudiar los mecanismos implicados en la muerte de las motoneuronas se utilizan varios modelos. Uno de los más empleados es el de la axotomía del nervio facial en roedores (Moran and Graeber, 2004). El nervio facial inerva la musculatura facial ipsilateral. Su núcleo se sitúa en el tronco del encéfalo y mide aproximadamente 1,7 mm de largo en la rata, especie en la que cuenta entre 3200 y 6500 motoneuronas, según el método de recuento utilizado. En el ratón son en torno a 2500 el número de motoneuronas de este núcleo (Terrado et al., 2000).

La axotomía del nervio facial presenta algunas ventajas frente a otros modelos. En primer lugar, la distancia de la lesión (tras la salida del nervio por el agujero estilomastoideo) no supone un trauma directo en el SNC. Por otra parte, la gravedad de la lesión es moderada, comparado con otros modelos ya que, a la altura en que se

realiza la axotomía el nervio consiste únicamente en fibras motoras. Además, la presencia del núcleo contralateral en proximidad permite que sea usado como control del lesionado. Finalmente, se pueden producir diversos tipos de lesión con grado variable de severidad: un aplastamiento del nervio permite la reinervación a las 2-3 semanas de la lesión. La transección completa tiene mayor gravedad y necesita mayor tiempo para su recuperación, lo que se ve aumentado si se produce la ligación del nervio seccionado. La lesión de mayor gravedad se produce si se realiza una avulsión del nervio, lo que conduce a la muerte neuronal (Moran and Graeber, 2004). En los roedores adultos, la mayor parte de las motoneuronas faciales sobreviven a la sección del mismo, siendo mayor la supervivencia en ratas que en ratones. Sin embargo, esta misma lesión en animales recién nacidos provoca una muerte neuronal masiva (ver por ejemplo Moran and Graeber, 2004; Perrelet et al., 2000; Terrado et al., 2000) y un incremento de los genes asociados con la apoptosis (Moran and Graeber, 2004). Esto parece ser debido a que conforme avanza el desarrollo postnatal las dependencias tróficas de estas células parecen cambiar y el resultado es que las motoneuronas son mucho más resistentes a la lesión.

Existen algunos trabajos cuyos resultados sugieren que la utilización de la glucosa podría estar implicada en los procesos regenerativos de las motoneuronas. Ito y colaboradores mostraron que la utilización de glucosa tras la axotomía del nervio facial varía con la edad del animal lesionado. Así, en ratones recién nacidos se produce una disminución de la entrada de glucosa, mientras que la misma lesión en adultos produce su aumento (Ito et al., 1999). Un estudio anterior también indicó que la axotomía del nervio hipogloso de rata adulta se traduce en un aumento de la utilización de glucosa, que es máximo a las 24 horas postlesión y que dura al menos entre 1 y 3 días (Smith et al., 1984). Por otra parte, los ratones con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa, que desarrollan unos síntomas muy parecidos a los de los enfermos de esclerosis lateral amiotrófica, muestran niveles reducidos de transporte de glucosa en la corteza cerebral (Guo et al., 2000).

A pesar de su papel en la entrada de glucosa en las neuronas, no se han descrito las consecuencias que la lesión de las neuronas motoras pueda tener en la expresión de transportadores de glucosa. En este trabajo pretendemos realizar ese estudio utilizando como modelo la axotomía del nervio facial en ratones adultos y recién nacidos.

II. OBJETIVOS

Los transportadores de glucosa son un elemento esencial para la mayoría de las células de un organismo, siendo ampliamente utilizados los transportadores de difusión facilitada, que no representan un gasto energético para la célula.

Estos transportadores la puerta de entrada de un sustrato energético fundamental en la mayoría de los casos para su supervivencia, pero también en otros casos son fundamentales para que dicha célula pueda llevar a cabo las funciones que le han sido asignadas en el conjunto del organismo.

Partiendo de estos hechos, e intentando contribuir al conocimiento global de la expresión de los transportadores facilitadores de glucosa de la familia GLUT, nos propusimos conocer la expresión y distribución de estos transportadores, fundamentalmente el recientemente identificado GLUT8. Además queríamos conocer cómo variaba o se modificaba su expresión en determinadas situaciones, para de esta manera poder identificar su posible papel dentro de esos tejidos y células.

En función de lo expuesto anteriormente nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar las células que expresan GLUT8 en el testículo de ratón adulto y a lo largo de la espermatogénesis. Comparación de la expresión de GLUT8 con la de GLUT3.
2. Identificar las células que expresan GLUT8 en el testículo de rata y estudiar si la inducción de la diabetes provoca variaciones en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT8 y GLUT3 en el testículo.
3. Estudiar la regulación de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 como respuesta a la axotomía del nervio facial en ratones adultos, en los que esta lesión no provoca una muerte neuronal masiva.
4. Estudiar la regulación de los mismos transportadores de glucosa como respuesta a la axotomía del nervio facial en ratones recién nacidos, en los que, por el contrario esta lesión produce la muerte progresiva de las motoneuronas lesionadas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1.1. Condiciones generales

Los animales empleados en los experimentos de este trabajo proceden de la empresa proveedora de animales de laboratorio Harlan Interfauna Ibérica (Harlan Interfauna Ibérica S.L, Barcelona). Tras su llegada y recepción en nuestro laboratorio, fueron sometidos a un periodo de adaptación al animalario con libre acceso al agua y alimentados con pienso completo para ratones y ratas *ad libitum* bajo condiciones controladas de temperatura (22° C), humedad (40-45 %) y fotoperiodo de 12 horas (luz de 7:30 horas a 19:30 horas).

Las instalaciones, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, y la Transposición de la Directiva Comunitaria 86/609/CEE acordada en Estrasburgo.

1.2. Animales empleados en el estudio de los transportadores GLUT en testículo

1.2.1. Ratones adultos y neonatos

En este estudio se utilizaron ratones macho Balb/cAnNHsd no consanguíneos de 14 días, 24 días y adultos (7-8 semanas). El número de animales utilizados fue de 3 por cada edad para los estudios de inmunohistoquímica y de RT-PCR y 5 para los experimentos de western blot. Los animales empleados en los estudios correspondientes a los 14 días de edad nacieron en el animalario, bajo las mismas condiciones citadas anteriormente y se mantuvieron con sus madres hasta el momento del sacrificio. Los ratones que se sacrificaron a los 24 días de edad también nacieron en el animalario, fueron destetados a los 15 días, se separaron por sexos y se mantuvieron en las condiciones señaladas hasta el sacrificio.

El sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical en el caso de animales adultos y de 24 días de edad, mientras que los animales de 14 días fueron

sacrificados por decapitación. Tras el sacrificio se extrajeron inmediatamente los testículos para evitar el deterioro del tejido, se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido para su conservación hasta su posterior utilización en la extracción de ARN y preparación de proteínas. Para los estudios de inmunohistoquímica los testículos se fijaron inmediatamente con líquido de Bouin (75 ml solución acuosa saturada con ácido pícrico (Panreac, Barcelona), 25 ml formol (Guinama, Valencia) y 5 ml ácido acético glacial (J.T. Baker, Servi-química, Barcelona)) tras el sacrificio.

1.2.2. Ratas. Inducción del estado diabético

En este experimento se utilizaron ratas macho Wistar adultas (7-8 semanas) de unos 300 gr. de peso. Se realizaron tres grupos de animales: ratas control (C), ratas diabéticas no tratadas (D), ratas diabéticas tratadas con insulina por vía subcutánea (DI) (constituidos los dos primeros grupos por 6 animales y el último por 7).

La diabetes en las ratas se provocó mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma, Madrid) a una dosis de 65 mg por kg de peso (disolviendo previamente la estreptozotocina en tampón citrato sódico 10 mM de pH 5,5, a una concentración de 40mg/ml). A las ratas control se les administró un volumen de líquido equivalente, pero inyectando únicamente el vehículo. La estreptozotocina actúa provocando la destrucción de los islotes beta del páncreas, por lo que ocasiona una diabetes de tipo 1 o dependiente de insulina. A las 72 horas se midió la glucosa en sangre y se consideraron diabéticas las que presentaban unos niveles de glucosa superiores a 200-250 mg/dl (los niveles normales de glucosa en las ratas oscilan de 83 a 200-250 mg/dl (El-Remessy et al., 2006; Obrosova et al., 2005)). Los niveles de glucosa se midieron extrayendo una muestra de sangre mediante una incisión en la cola del animal, posteriormente se extendió la muestra sobre una tira Accu-Check® sensor confort (Roche, Madrid) y se introdujo en el medidor de glucosa Accutrend® sensor (Roche). Este sistema analítico nos proporcionó los resultados en las unidades de mmol/dl, que posteriormente fueron transformados en mg/dl para su presentación final. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron cada 24 horas durante toda la duración del experimento en todos los animales.

El grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina estaba compuesto por animales a los que se les inducía una diabetes tipo 1 mediante una inyección de estreptozotocina tal y como se ha descrito previamente, y posteriormente se trataban con insulina glargina (Insulina Lantus 100 UI/ml, Aventis, Barcelona) para controlar la hiperglucemia provocada. La insulina glargina es una insulina modificada similar a la insulina humana

que tiene una acción prolongada y constante de reducción del azúcar en sangre. A este grupo se les administraba una dosis de 50 mU/gr de Insulina Lantus vía subcutánea periódica a las 17:00h, antes de que se apagara la luz del estabulario y los animales iniciaran su periodo de actividad nocturna.

Al cabo de 1 mes se sacrificaron los animales mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Vétoquinol, Madrid) por vía intraperitoneal. Tras el sacrificio se extrajeron los testículos y se pesaron. Posteriormente, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis proteico o de ARN. Por otra parte, las muestras destinadas al estudio de inmunohistoquímica se sumergieron en fijador de Bouin.

1.3. Ratones empleados en el estudio de los transportadores GLUT en el sistema nervioso central. Axotomía del nervio facial.

En este estudio se utilizaron ratones adultos C57BL/6JOlaHsd adquiridos con aproximadamente 20–25 gr. de peso y una edad entre 7-8 semanas. Los animales neonatos que se utilizaron en el estudio nacieron en el animalario, tal y como se ha descrito anteriormente.

En el estudio se axotomizó, bajo anestesia y con ayuda de una lupa, el nervio facial izquierdo tras su salida por el agujero estilomastoideo. Los ratones adultos (7-8 semanas de edad) se anestesiaron con clorhidrato de Ketamina (Imalgene1000, MERIAL, Barcelona) a una dosis de $1\ \mu\text{l}$ por gramo de peso y con xilacina (Rompun 2%, BAYER, Barcelona) a una dosis de $0,45\ \mu\text{l}$ por gramo de peso, ambas sustancias se diluyeron cinco veces en solución NaCl 0,9 % (Fisiológico Braun, Barcelona) y se administraron por vía intraperitoneal. Los ratones neonatos de 3 días de edad se anestesiaron mediante hipotermia. Una vez realizada la axotomía, los animales se recuperaron de la anestesia sobre una placa térmica a 40°C . Posteriormente, los ratones adultos se devolvieron al animalario y los neonatos con sus madres hasta el momento de su sacrificio. Al día siguiente, se comprobó que los animales operados presentaban parálisis facial del lado izquierdo.

Los animales se sacrificaron a las 24 horas, a los 3 días y a los 8 días posteriores a la realización de la lesión del nervio facial. El número de animales adultos utilizados fue de 5 para los estudios de inmunohistoquímica y de RT-PCR, y 7 para los experimentos de western blot. El número de ratones neonatos fue de 20 para los estudios de western blot, y de 7 para los análisis inmunohistoquímicos y de expresión de ARN.

Los ratones adultos se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal) por inyección intraperitoneal y los neonatos mediante decapitación. Tras el sacrificio se extrajeron inmediatamente los encéfalos. Por una parte, en las muestras destinadas a los estudios de PCR y de western blot se diseccionó el tronco del encéfalo separando la zona derecha, que se utilizó como control, y la izquierda, correspondiente a la zona lesionada. Posteriormente, se congelaron rápidamente ambas zonas por separado en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras obtenidas de neonatos, debido a su reducido tamaño, fue necesario almacenarlas en grupos de cuatro o cinco animales para así poder extraer suficiente cantidad de proteínas para los estudios de western blot. Por otra parte, los encéfalos destinados a los estudios de inmunohistoquímica se fijaron en Bouin, y todo el encéfalo fue analizado conjuntamente disponiendo en la misma imagen de la parte dañada izquierda con su correspondiente control del lado derecho del encéfalo.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR WESTERN BLOT

Por medio de western blot se estudió la presencia de los transportadores en las proteínas de membrana extraídas a partir de las muestras de tejidos obtenidas previamente de los animales. Este procedimiento consiste en el aislamiento de las proteínas de membrana a partir del tejido homogenizado, proteínas que se migran por electroforesis en geles de acrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de cada transportador GLUT se pone de manifiesto por medio de anticuerpos específicos para cada uno de ellos ligados a algún sistema de detección y visualización (figura III.1). El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

2.1. Aislamiento de proteínas de membrana

Durante todo el procesado para la extracción de las fracciones proteicas se trabajó en frío, sobre hielo, o en baño de agua con hielo, para evitar la degradación proteica. Los tejidos previamente almacenados en nitrógeno líquido o en el congelador a -80°C , fueron introducidos en tubos que contenían 2ml (testículos y tronco del encéfalo de ratones adultos y neonatos) o 4ml (testículos de rata) de TES pH 7,1 frío (Tris 20 mM (Bio-Rad, Barcelona), EDTA 1 mM (Panreac), Sacarosa 255 mM (Sigma)), al que se había añadido una mezcla de inhibidores de proteasas Complete EDTA-free (Roche) y PMSF 10 mM (Roche). Se homogenizaron las muestras (3 veces durante 15 segundos en cada una de ellas) con la ayuda de un UltraTurrax (T25 basic, Ika Carborotechnik). Las

muestras homogeneizadas se sonicaron 3 veces durante 15 segundos cada una a una potencia de 360 w/cm² utilizando un sonicador modelo Ultraschallprozessor UP 200S (Dr Hielscher, Teltow, Alemania), para fragmentar completamente el tejido. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 13.200 rpm en una microcentrífuga (modelo 5415R, Eppendorf, Hamburg, Alemania) a 4°C. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con las proteínas de membrana y los microsomas de alta densidad en 200 µl (en el caso de las proteínas procedentes de testículo y tronco del encéfalo de ratón) o en 400µl (en el caso de las proteínas procedentes de testículo de rata) de Tris 2 mM / manitol 50 mM (Sigma), pH 7, al que se añadieron inhibidores de proteasas (PMSF 10 mM y un cóctel de inhibidores EDTA-free). En el caso de los testículos de rata destinados al estudio de la expresión de la insulina se almacenó también el sobrenadante, de tal manera que la expresión de la insulina fue analizada en ambas fracciones, precipitado y sobrenadante.

2.2. Cuantificación de las proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit de detección de BioRad, y siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro modelo Spectronic® 20 (Genesys™, Waltham, Massachussets, EEUU).

2.3. Migración electroforética en gel de acrilamida (SDS - PAGE)

La electroforesis se realizó en geles de acrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema de cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell (BioRad). Los geles se prepararon a partir de una solución de acrilamida/BIS 40% (BioRad) a la que se añadió agua, TEMED (BioRad), APS 10% (persulfato amónico, BioRad) y la solución 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS (Sigma) (para el gel concentrador) o la solución 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS (para el gel separador) en función del tipo de gel preparado. El gel separador utilizado en la mayoría de las ocasiones fue del 10% de acrilamida que permite una perfecta discriminación para proteínas de tamaño entre 40 y 70 kDa, aunque en algunas ocasiones se utilizaron porcentajes mayores del 12% para proteínas de menor tamaño. Las muestras se cargaron en el gel concentrador, colocado sobre el separador, el cual permite que todas las proteínas de éstas se agrupen en límite entre ambos geles. Por

otra parte, el gel separador separa los diferentes polipéptidos según su tamaño. El grosor de los geles era de 1,5 mm.

Antes de realizar la migración electroforética, se desnaturalizaron las muestras, incubándolas a 100°C durante 5 minutos. Se migraron 50 µg de proteínas junto con el tampón de carga (3% SDS, 10% glicerol (Panreac), 0,02% azul de bromofenol, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3,2% β-mercaptoethanol (Scharlau, Barcelona) en un volumen final de 50 µl. Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad). La migración electroforética de las proteínas y del marcador se realizó durante 50 minutos a 200 V, en un tampón de electroforesis ((25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3) (BioRad)).

2.4. Transferencia

Tras la migración se transfirieron las proteínas del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona) por el método electroforético húmedo (Sambrook, 2001). Antes de realizar la transferencia se sumergió la membrana de nitrocelulosa en agua destilada durante unos segundos y seguidamente en tampón de transferencia durante 5 minutos. El tiempo de transferencia fue de 1 hora a 100 V en tampón de transferencia (25 mM Tris, 0.192 M glicina, 20% metanol (Rathburn, Walkerburn, Escocia)) preparado en el momento. Durante este tiempo la cubeta en la que se realizaba la transferencia se mantuvo envuelta en hielo para evitar su sobrecalentamiento y así el posible deterioro de las proteínas.

Finalizada la transferencia, las membranas se visualizaron mediante su tinción con Rojo de Ponceau (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza) para comprobar que las proteínas se habían transferido correctamente. Posteriormente, se lavaron varias veces con PBS-T (1X PBS (10X PBS, BioRad) y 0,1% de Tween-20 (Q-Biogene, Francia)).

2.5. Incubación con el anticuerpo primario

A continuación, se mantuvieron las membranas durante dos horas con PBS-T, al 5% de leche desnatada en polvo (La Asturiana), con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica en la membrana.

Para detectar la presencia de la proteína GLUT8 se utilizó el anticuerpo policlonal anti-GLUT8-COOH, que reconoce la secuencia de los últimos 11 aminoácidos de GLUT8 de ratón (LE QVT AHF EGR). Este mismo anticuerpo se utilizó para estudiar la expresión de GLUT8 en rata ya que la proteína de la rata difiere únicamente en un aminoácido (Isoleucina por Valina) en los 11 aminoácidos C-terminales. El anticuerpo fue preparado en conejos por la empresa Q-Biogene.

Por otra parte, para detectar la presencia de los transportadores GLUT1, GLUT3 y GLUT4 se utilizaron anticuerpos comerciales de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). En el estudio de la proteína GLUT3 se empleó también otro anticuerpo de Alpha Diagnostic Internacional (Texas, EEUU). Por último, para estudiar la expresión de la insulina en testículo de rata se empleó el anticuerpo comercial de Santa Cruz (Santa Cruz, California). Como control interno y patrón de expresión se utilizó un anticuerpo primario anti-actina (Sigma) (tabla III.1).

Tras el lavado, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C, con el primer anticuerpo, anti-GLUT8-COOH, a una dilución 1:500 en PBS-T con el 5% de leche en polvo desnatada. Cuando se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios, anti-GLUT1, anti-GLUT3, anti-GLUT4 y anti-insulina la dilución utilizada fue de 1:300. Las membranas incubadas con estos cuatro últimos anticuerpos se mantuvieron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de continuar la incubación durante toda la noche a 4°C. Tras incubar las membranas con el primer anticuerpo se lavaron 4 veces con PBS-T.

Tabla III.1. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en la detección de las proteínas GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT8 e insulina y de los anticuerpos secundarios empleados en las técnicas de western blot y de inmunohistoquímica.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Descripción
Anti-GLUT1	Calbiochem	400060	Policlonal de conejo
Anti-GLUT3	Calbiochem	400063	Policlonal de conejo
Anti-GLUT3	Alpha Diagnostic Internacional	GT31-A	Policlonal de conejo
Anti-GLUT4	Calbiochem	400064	Policlonal de conejo
Anti-Insulina (H-86)	Santa Cruz	SC--9168	Policlonal de conejo
Anti G8-COOH	Q Biogene	No comercial	Policlonal de conejo
Anti-actina	Sigma	A 5060	Policlonal de conejo
Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Referencia	Descripción
Anti rabbit IgG-HRP	Amersham Pharmacia	NA934V	Policlonal de burro
Anti rabbit IgG Biotilizado	Vector Laboratories	PK-6103	Policlonal de cabra

Como control interno y para la posterior cuantificación de la expresión de cada proteína, las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo anti-actina a una concentración 1:1000. Antes de realizar esta incubación se decapó la membrana para eliminar el anticuerpo empleado previamente (anti-GLUT1, anti-GLUT3, anti-GLUT4, anti-GLUT8 o anti-insulina), lavándola durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de glicina 200 mM (pH 2,5) y 0,4 % SDS en continua agitación. El resto del proceso para la detección de la actina se realizó del mismo modo que el procedimiento descrito anteriormente.

En el estudio de los transportadores en el tronco del encéfalo tras la axotomía se incubaron las membranas con cada uno de los anticuerpos de los GLUTs (cada vez en

un orden diferente) decapando la membrana entre cada incubación con un anticuerpo diferente, tal y como se ha expuesto anteriormente.

2.6. Incubación con el anticuerpo secundario y revelado

A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:2000 en PBS-T durante 1 hora. El anticuerpo secundario que se utilizó para revelar la unión del anticuerpo primario fue un anti-conejo IgG ligado a HRP (peroxidasa de rábano). La información detallada acerca del anticuerpo secundario utilizado se recoge en la tabla III.1.

Seguidamente, se lavaron las membranas 4 veces con PBS-T y se realizó su revelado de la señal obtenida y autorradiografía de la misma. Este segundo anticuerpo, que reconoce la IgG de conejo, está unido a HRP por lo que puede ser detectado mediante un sistema de revelado por quimioluminiscencia. Para la detección utilizamos el sistema ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), exponiendo las membranas a películas Hyperfilm™ECL™ (GE Healthcare) variando los tiempos de exposición a la película entre 3 y 15 minutos.

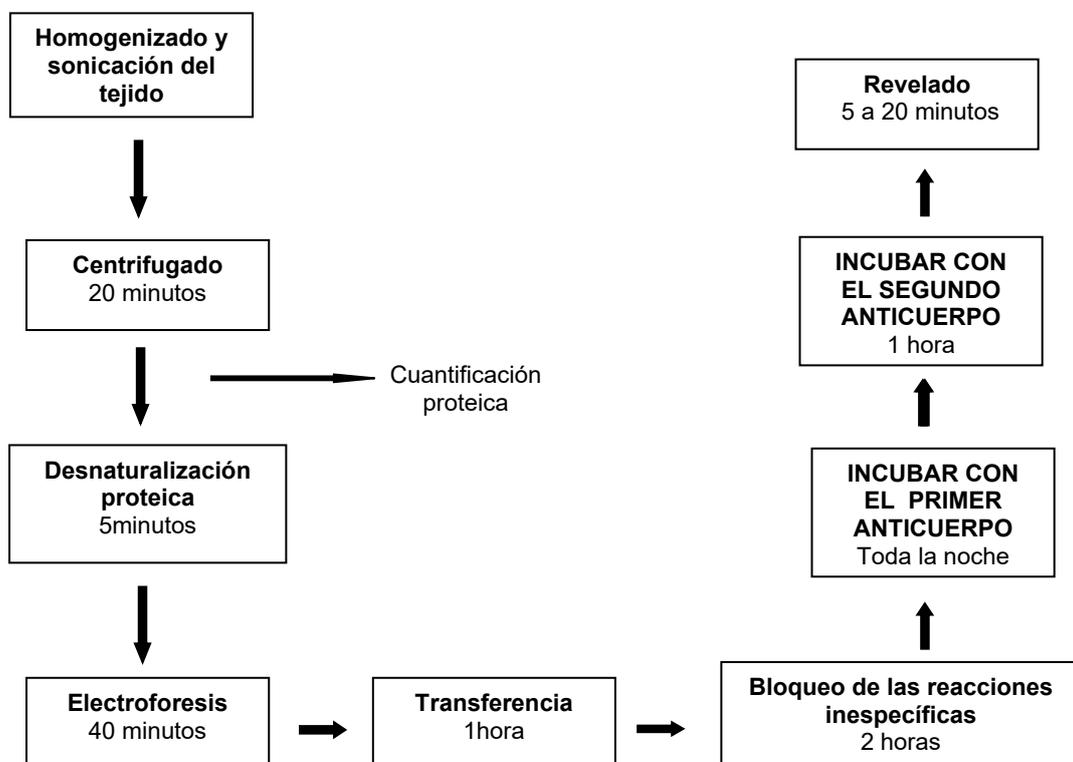


Figura III.1: Esquema de la realización de la preparación de las proteínas y del desarrollo de la técnica de western blot.

Se realizó una cuantificación densitométrica de los blots y se calculó la relación entre la señal obtenida para cada transportador o para la insulina y la señal obtenida para la actina con el software de análisis de imagen Quantity one de Biorad.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICA

Por medio de la técnica de inmunohistoquímica se estudió la localización de las proteínas de GLUT3, GLUT4, GLUT8 e insulina en cortes histológicos de testículo de ratón y de rata. Por otra parte, se estudio la presencia de GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 en el tronco del encéfalo de ratón adulto y neonato tras la axotomía del nervio facial izquierdo (figura III.2).

En estos estudios se ha utilizado el método indirecto de la avidita-biotina, en el que el anticuerpo secundario esta unido a la biotina, la cual reconoce a un complejo formado por la avidina unida a una peroxidasa biotinilada (ABC). Al final se forma una cadena molecular que une el antígeno buscado a la enzima peroxidasa, la cual reduce al H_2O_2 liberando O_2 localmente que oxida al reactivo 3,3-diaminobenzidina (DAB), dando lugar a un producto insoluble y coloreado que muestra la presencia de la proteína buscada. El protocolo utilizado se describe en los siguientes apartados.

3.1. Estudio de los transportadores en testículo

3.1.1. Testículo

Fijación e inclusión de las muestras

En un principio se realizaron diferentes métodos de fijación para así determinar cual era el más adecuado en nuestros estudios inmunohistoquímicos. Se llevaron a cabo las siguientes pruebas en testículos de ratón:

- Fijación por inmersión directa en paraformaldehído 4% en PBS a pH 7,7 durante 7 horas a temperatura ambiente en ratones adultos y durante 4 horas en animales de 14 y 24 días de edad.

- Fijación por inmersión directa en fijador de Bouin (75 ml solución acuosa saturada con ácido pícrico, 25 ml formol y 5 ml ácido acético glacial) siguiendo las mismas pautas de tiempo que en el caso anterior.
- Perfusión del animal entero por vía cardiaca con paraformaldehído 4% a pH 7,7, y, a continuación, extraer los testículos y sumergirlos durante 4 horas en el mismo fijador.
- Perfusión del animal entero por vía cardiaca con fijador de Bouin y, a continuación, realizar los mismos pasos que en el caso anterior.

Tras realizar los primeros estudios inmunohistoquímicos con el anticuerpo anti-GLUT8 observamos que las muestras sumergidas directamente en fijador de Bouin presentaban una mejor calidad, y se apreciaba de forma más clara la localización concreta de nuestra proteína.

Por consiguiente, la fijación del resto de muestras obtenidas se realizó mediante inmersión directa en fijador de Bouin durante 7 horas a temperatura ambiente en el caso de adultos y 4 horas en el caso de animales pre-púberes.

En el caso de testículo de rata se continuó empleando el fijador de Bouin, aunque primero se fraccionaron las muestras en dos partes para mejorar la penetración del fijador en el tejido. Las muestras se mantuvieron sumergidas en el fijador durante 6-7 horas a temperatura ambiente y, posteriormente toda la noche a 4°C.

A continuación, se lavaron los tejidos con alcohol al 30% (Guinama) varias veces hasta eliminar el color amarillo del fijador, y finalmente se sumergieron las muestras en alcohol al 70% para iniciar la inclusión en parafina con un procesador automático de tejidos (inclusor HMP110, MYR), programado con los siguientes tiempos de incubación en las siguientes soluciones:

- 2 horas con alcohol al 80%
- 2 horas con alcohol al 96%
- 1 hora con alcohol al 100%
- 1 hora con alcohol al 100%
- 2 horas con alcohol-xilol
- 1 hora con xilol
- 1 hora con xilol
- 2 horas con parafina
- 2 horas con parafina

Preparación de las secciones

Se realizaron cortes de 3 µm de grosor con un microtomo de parafina HM310 (Microm, Barcelona), y se depositaron sobre un baño de agua a 45°C para evitar pliegues en las muestras. Posteriormente, se montaron los cortes sobre portas impregnados de Poly-L-Lisina (Polysine, Menzel-Glaser, Alemania) y se mantuvieron durante al menos 1 hora en una estufa (Raypa Incubator, Tarrasa, Barcelona) a 37°C, para que se unieran correctamente al portaobjetos. A continuación, se desparafinaron e hidrataron los cortes realizando 2 lavados con xilol durante 10-15 minutos, 2 lavados de 5 minutos con etanol 100%, 1 lavado de 5 minutos con etanol 96 %, 1 lavado de 5 minutos con etanol 60% y, finalmente, 5 minutos en agua corriente.

Desenmascaramiento

En los estudios destinados a la localización de las proteínas GLUT3, GLUT4 e insulina fue necesario proceder a un proceso de desenmascaramiento de las proteínas. Para ello, las secciones de testículo desparafinadas e hidratadas se sumergieron en tampón citrato 10mM a pH 6 a 100°C durante 30 minutos.

Inactivación de la peroxidasa interna

Tras lavar los cortes se inactivó la peroxidasa interna incubando las muestras durante 30 minutos con una solución de metanol con agua oxigenada al 0,3%, eliminando de esta manera el ruido de fondo en nuestras preparaciones. Esta solución se preparó en el momento de su uso a partir de una solución madre 3% H₂O₂ (J.T.Baker). Después se lavaron las preparaciones 2 veces con PBS durante 10 minutos cada una.

A continuación, se rodearon las muestras con una barrera hidrofóbica con Super Pap Pen (Daldo Sangyo Co.) para trabajar con cantidades más pequeñas de las soluciones que contienen los correspondientes anticuerpos.

Incubación con el primer anticuerpo

Para bloquear las reacciones inespecíficas posibles de los diferentes anticuerpos utilizados, se incubaron las secciones durante 20 minutos con suero de cabra

proporcionado por el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) (4 gotas cada 10 ml de PBS al 3% de Albúmina Sérica Bovina (Sigma)). Luego se eliminó el exceso de suero y, sin lavar, se incubaron con el primer anticuerpo diluido en PBS al 3% de Albúmina Sérica Bovina. Las diluciones utilizadas, que dependieron del anticuerpo utilizado en cada estudio, fueron las siguientes:

- Anti-GLUT3 (Calbiochem o Alpha Diagnostic Internacional) : 1:300
- Anti-GLUT4 (Calbiochem) : 1:300
- Anti-GLUT8: 1:800
- Anti-insulina (Santa Cruz): 1:200

Los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico fueron los mismos que los utilizados en la técnica de western blot.

El tiempo de incubación de las muestras con los anticuerpos primarios también varió dependiendo de éstos últimos, siendo los tiempos de incubación utilizados los siguientes:

- La incubación con el anticuerpo anti-GLUT8 se realizó a 4°C durante 16-18 horas (toda la noche).
- Las incubaciones con los anticuerpos anti-GLUT3, anti-GLUT4 y anti-insulina se realizaron en primer lugar durante dos horas a temperatura ambiente y, a posteriormente toda la noche (16-18 horas) a 4°C.

Al día siguiente, se eliminó el resto de anticuerpo primario y se realizaron 2 lavados con PBS de 10 minutos cada uno de ellos.

Incubación con el segundo anticuerpo y revelado de la reacción

A continuación, las secciones se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo biotinilado y conjugado con la HRP del kit Elite ABC (1 gota cada 10 ml de PBS) (tabla III.1).

Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron 40 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-peroxidasa, que

se une a la biotina del segundo anticuerpo. Este complejo se preparó 30 minutos antes de su uso y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su utilización.

Finalmente, se lavaron las preparaciones 2 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante 3 ó 5 minutos hasta que se produjo la reacción peroxidasa. Tras esto, los cortes se lavaron durante 5 minutos en agua corriente para detener la reacción, se deshidrataron pasándolos por los alcoholes de 60%, 96% y 100%, a continuación, las muestras se montaron con medio de inclusión (DPX) para histología (BioChemika, Madrid) y, por último, se analizaron al microscopio óptico. Se utilizó un microscopio Nikon ECLIPSE E600 conectado a un sistema de cámara digital NIKON FDX-35. Las imágenes se captaron en el ordenador mediante el programa ACT-1 para DXM 1200 (Nikon).

Controles

Como controles de las técnicas inmunohistoquímicas y de la especificidad del anticuerpo se emplearon:

- La utilización de tejidos que expresan de forma habitual la proteína objeto de estudio como control positivo. Para el anticuerpo de la insulina se usaron secciones de páncreas de ratón y de rata, en los estudios de la proteína GLUT4 se usaron cortes de músculo esquelético y en los experimentos con GLUT3 se utilizó riñón. Por último, para el anticuerpo GLUT8 no se usó ningún control positivo ya que el propio testículo de ratón adulto expresa de forma habitual gran cantidad de esta proteína
- Eliminación del anticuerpo primario de la reacción, con lo que desaparecía la señal específica.
- Como control negativo de la reacción frente a la proteína GLUT8 se incubaron secciones adyacentes de tejido testicular sustituyendo el primer anticuerpo por suero preinmune de conejo a una dilución de 1:500. Como se puede observar en el apartado de Resultados, en estas preparaciones desaparecía la señal específica.

Otras secciones adyacentes a las utilizadas para el estudio de GLUT8 en testículo de ratón fueron teñidas con hematoxilina–eosina (Bio-Optica, Navarra) para analizar

mejor la estructura celular. Por otra parte, algunas de las secciones incubadas con los diferentes GLUTs se tiñeron con hematoxilina antes de deshidratarlas para visualizar así mejor la estructura.

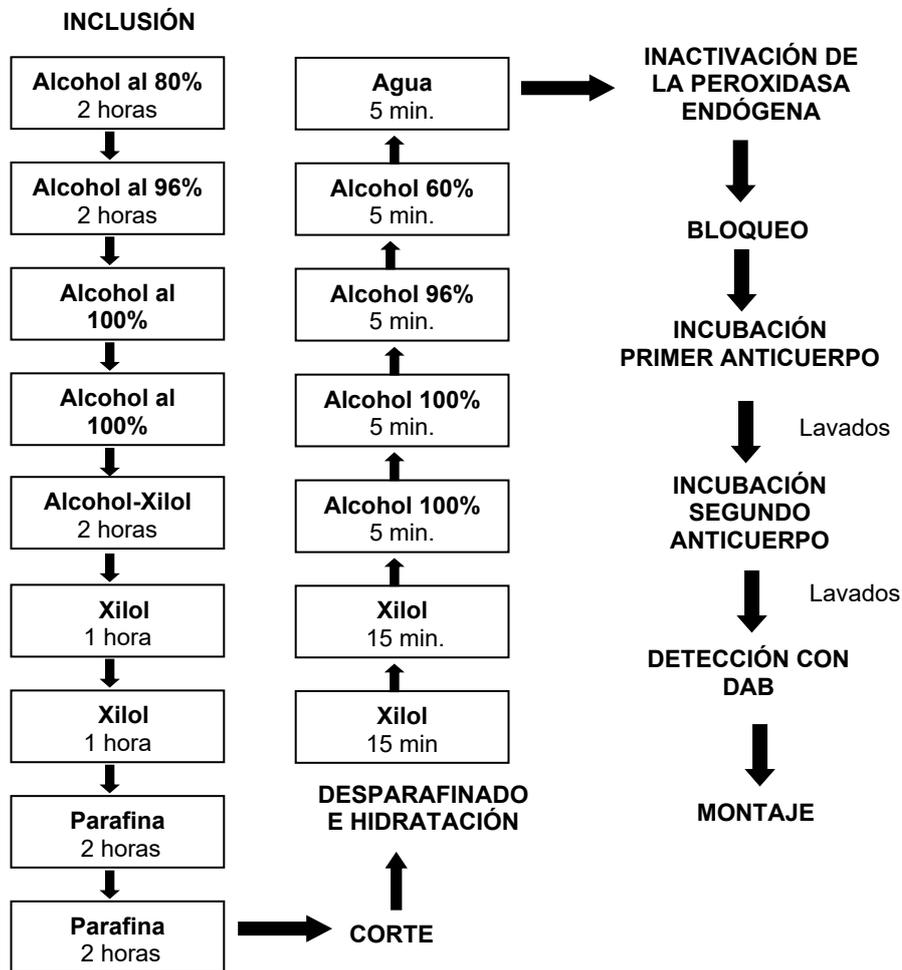


Figura III.2: Esquema de la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

3.1.2. Espermatozoides

Se realizó también el estudio de la localización de las proteínas GLUT8 y GLUT3 en espermatozoides de ratón y de rata obtenidos del epidídimo. Para ello se realizó una incisión mediana en el epidídimo de animales adultos y se tomaron muestras de los espermatozoides por medio de un hisopo estéril con el que se realizó un frotis en el portaobjetos. Las muestras se fijaron sumergiendo los portaobjetos en paraformaldehído 4% a pH 7,7 durante 50 minutos, y se lavaron dos veces durante 10 minutos en PBS-T. A continuación, para inactivar la peroxidasa interna, las muestras se incubaron 30 minutos

con una solución de metanol con agua oxigenada al 0,3%. Una vez inactivada la peroxidasa se continuó con el protocolo de inmunohistoquímica descrito en el apartado anterior 3.1.1.

3.1.3. Tinción de PAS

La tinción de PAS se emplea para la demostración histoquímica de componentes celulares que contienen glicoles, tales como carbohidratos, glucoproteínas, etc. En nuestro estudio se utilizó esta tinción para identificar el acrosoma de las espermátidas en cortes de testículo consecutivos a los utilizados en la técnica de inmunohistoquímica, y también en los espermatozoides obtenidos del epidídimo de animales adultos. El protocolo seguido consistió en desparafinar e hidratar las muestras como se describe en el apartado 3.1.1., sumergirlas en ácido periódico al 1% (Sigma) a temperatura ambiente durante 20 minutos, lavar 20 minutos en agua corriente y teñir 1 hora en Reactivo de Schiff (Panreac) a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las muestras durante 10 ó 15 minutos, se deshidrataron pasándolas por los alcoholes de 60%, 96% y 100%, y, por último, se montaron las secciones con DPX.

3.2. Estudio de los transportadores en el núcleo del facial tras la axotomía

Se estudió mediante inmunohistoquímica la localización de las proteínas GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 en el núcleo del facial en cortes histológicos del tronco del encéfalo en ratones adultos y neonatos sacrificados a diferentes tiempos tras la operación. La técnica de inmunohistoquímica empleada en este estudio fue similar a la explicada en el apartado 3.1.1, únicamente se realizaron las siguientes modificaciones.

Los encéfalos de ratones adultos se mantuvieron durante 7 horas sumergidos en el fijador de Bouin a 4°C, mientras que las muestras de neonatos se sumergieron 4-5 horas en estas mismas condiciones.

A continuación, las muestras se procesaron siguiendo los mismos pasos que se han descrito anteriormente. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor del tronco del encéfalo hasta localizar el núcleo del facial, que fue visualizado mediante la tinción cresil-violeta al 1% (Sigma), realizada a temperatura ambiente durante 10 minutos.

En los estudios destinados a localizar las proteínas GLUT1, GLUT3 y GLUT4 fue necesario realizar un proceso previo de desenmascaramiento. Las secciones se

mantuvieron sumergidas, bien en tampón citrato a pH 6 o bien en tampón Tris/EDTA a pH 9 (12gr. Tris, 1gr. de EDTA en 500ml de agua destilada), a 100°C durante 40 minutos. Los resultados obtenidos con ambos tampones fueron similares aunque las imágenes obtenidas eran algo más evidentes cuando se usaba el tampón EDTA.

A continuación, se inactivaron las peroxidasas endógenas de los cortes histológicos, se incubaron las secciones con el primer anticuerpo (anti-GLUT1, anti-GLUT3, anti-GLUT4 y anti-GLUT8) y, posteriormente con el anticuerpo secundario, de la manera expuesta en el apartado de expresión de los transportadores en testículo (apartado 3.1.1). La única variación fue la utilización de un nuevo anticuerpo primario, GLUT1, a una dilución 1:300.

Se empleó como control negativo de la reacción frente a GLUT8, al igual que en el primer experimento en testículo, suero preinmune de conejo (dilución 1:500) en secciones del núcleo del facial de ratón adulto adyacentes a las incubadas previamente con anti-GLUT8.

El análisis de las secciones incubadas con los anticuerpos se realizó a ciegas por dos observadores independientes.

4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm POR RT-PCR

El estudio de la presencia de ARN mensajero (ARNm) de GLUT8 en testículo de ratón de diferentes edades se realizó mediante RT-PCR, así como de los transportadores GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 en el tronco del encéfalo de ratones, y de la insulina en testículo de rata. En este experimento se aisló el ARNm del tejido y se sintetizó su ADN complementario (ADNc). Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento del ADNc cuya presencia, tras migración en gel de agarosa, fue detectada por medio de bromuro de etidio (Continental Lab Products, CLP) (figura III.3).

4.1. Aislamiento de ARN total de testículo

La obtención del ARN total a partir de las muestras de tejido homogenizado se realizó mediante el kit comercial Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Este sistema combina las propiedades de la unión selectiva de la membrana silica-gel con la velocidad de centrifugación.

En primer lugar, se trituraron y lisaron las muestras con un Ultra-Turrax T25 basic (Ika Labortechnik) en presencia de tampón de lisis, que inactiva inmediatamente las RNasas para asegurar el aislamiento del RNA intacto. Se utilizaron 600 μ l de tampón, al que se añadió β -mercaptoetanol (10 μ l por cada ml de tampón) para facilitar la lisis, por cada 30 mg de tejido. Después se homogenizaron las muestras en una columna QIAshredder (Qiagen) mediante centrifugación.

A partir de las muestras de tejido homogenizado se obtuvo el ARN total del tejido. El procedimiento consiste en añadir etanol a las muestras homogenizadas para conseguir unas condiciones apropiadas de unión a la membrana de la columna. Al pasarlas por la columna, el ARN mayor de 200 pb queda unido a la membrana, y después de lavar los contaminantes eficientemente, se eluye finalmente el ARN que ha quedado unido a la columna con agua libre de RNasas.

Tras obtener el ARN total se comprobó su calidad mediante migración electroforética en gel de agarosa 1%, y se visualizó gracias al bromuro de etidio.

Después de comprobar la calidad, se cuantificó la cantidad de ARN aislado midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro modelo GENESYS 10 UV (Termo Spectronic). Y se calculó la concentración teniendo en cuenta la siguiente relación: 1 D.O. = 40 μ g ARN/ml.

Para eliminar posibles restos de ADN genómico durante la extracción, el ARN se trató con la enzima DNase I-RNase free (Roche). Para este tratamiento se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 2 μ g de ARN total purificado.
- 1 μ l de tampón de reacción (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂).
- 1 μ l de enzima DNase I-RNase free.
- Agua tratada con DEPC hasta un volumen final 10 μ l

Se incubó la mezcla de reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió 1 μ l de EDTA (25 mM) y se incubó durante 15 minutos a 65°C para inactivar la enzima.

4.2. Síntesis de la primera hebra ADNc a partir de ARN total mediante Transcripción inversa (RT)

Para la síntesis del ADN complementario se utilizó el kit “SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen, Barcelona) siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizó el termociclador GeneAmp®PCRSystem2700 (Applied Biosystem, Barcelona). Este Kit utiliza la enzima “SuperScript II RT” como transcriptasa inversa. El protocolo que se siguió se puede resumir en cuatro pasos:

4.2.1. Desnaturalización de ARNm

En este primer paso, se preparó una mezcla con el ARN obtenido previamente y los cebadores (oligos dT):

1 µg ARN total (1µg/µl)	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Oligo (dT) (0.5 µg/µl)	1 µl
Agua tratada con DEPC	7 µl

Se incubó la muestra a 65°C durante 5 minutos, y luego se dejó como mínimo 1 minuto en hielo.

4.2.2. Anillamiento del ARNm con el cebador

Mientras la primera muestra permanecía en incubación se preparó la siguiente muestra de reacción:

10X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 µl

Tras sacar la muestra ARN/cebadores (10 µl) del hielo se le añadió 9 µl de mezcla de reacción y se incubó a 42°C durante 2 minutos.

4.2.3. Síntesis de ADNc

A continuación, se añadió 1 μ l (50 unidades) de SuperScript II RT y se incubó la muestra a 42°C durante 50 minutos y por último se calentó a 70° C durante 15 minutos para terminar la reacción. Tras esto la muestra se enfrió sobre hielo.

4.2.4. Eliminación del ARN

Una vez sintetizado el ADNc y para eliminar el ARN, se añadió 1 μ l de RNase H y se incubó durante 20 minutos a 37°C antes de la amplificación del ADNc objeto de estudio.

Con este procedimiento se obtiene la hebra de ADN complementaria (ADNc) a las secuencias del ARNm. Estas muestras de ADNc se conservaron a -20° C hasta su utilización, para evitar su degradación.

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar de forma exponencial un fragmento de ADN mediante dos cebadores específicos que flanquean un fragmento seleccionado, aplicando repetidos ciclos de una reacción. Dichos ciclos provocan la desnaturalización del ADN, el anillamiento o unión de los cebadores al ADN y la extensión de los mismos por acción de una enzima DNA polimerasa termoestable.

Gracias a esta técnica se amplificó la primera hebra de ADNc obtenido previamente mediante la técnica de transcripción inversa, utilizando un termociclador GeneAmp®PCRSYSTEM2700.

Conociendo la secuencia de nucleótidos del ARNm de los transportadores de difusión facilitada de ratón, y de insulina en rata se diseñaron los cebadores adecuados (tabla III.2) para amplificar un fragmento interno de cada uno de ellos. El tamaño de los fragmentos internos amplificados es de 390 pb, 337pb, 310 pb, 507pb y 282 pb para GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT8 e insulina, respectivamente.

Tabla III.2: Cebadores diseñados para amplificar los transportadores de difusión facilitada GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8, la insulina y la GAPDH de ratón y de rata.

Cebadores	Secuencia 5'→ 3'	Nº de acceso en GenBank	Longitud amplificada
MGLUT1UP	ATTGGTTCCTTCTCTGTCCG	NM_011400	390 pb
MGLUT1AS	GCAGAAGGGCAACAGGATA		
MGLUT3UP	GTTGAAATGCTGATCCTGGG	NM_011401	337 pb
MGLUT3AS	CACTCTCATCCTTCATCTCC		
MGLUT4UP	ATCTCTTCCTTTCTCATTGG	NM_009204	310 pb
MGLUT4AS	CCAGCATAGACTCCAAGCC		
HGLUT8U	ATCTCCGAAATCGCCTACCC	NM_0194881	507 pb
MsG8exon7-As	ATTATGCCACAGTGACC		
INS U	TGTGGATGCGCTTCTGCC	NM_019129	282pb
INS AS	TGCAGCACTGATCCACAATGC		
GAPDH-S	CATCACCATCTTCCAGGAGC	NM_017008 (ratón) BC083080 (rata)	485pb
GAPDH-AS	CACGGAAGGCCATGCCAG		

Para estimar la cantidad relativa amplificada del ARNm de GLUT8 e Insulina se realizó un control interno para comparar dentro de la misma muestra la expresión de un gen cuya expresión está altamente conservada y que se conoce que se expresa en todas las células. Por ello en cada muestra se analizó la expresión del gen GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa). Los cebadores diseñados para amplificar el ADNc de la GAPDH (tabla III.2) de ratón y rata fueron los mismos ya que la secuencia del gen es idéntica en la zona de unión de éstos.

Se utilizó la enzima la Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) con la mezcla de reacción indicada a continuación, que permitió la amplificación de los diferentes GLUTs y de la insulina (en función de los cebadores seleccionados en cada caso) a partir de una cantidad inicial de 40 a 80 ng de ADNc.

Tampón de reacción 10X	2,50 µl
Cl ₂ Mg 50 Mm	0,75 µl
dNTP's 10 mM	0,50 µl
Oligo sentido 10 µM	0,50 µl
Oligo antisentido 10 µM	0,50 µl
Taq Polimerasa (Platinum) 1U/µl	0,25 µl
Agua bidestilada estéril	19,00µl
ADNc	1,00 µl
Volumen final	25,00 µl

Las condiciones habituales de amplificación de transportadores de glucosa (GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8) consistieron en varios ciclos de temperatura que se indican en el siguiente esquema:

Primer ciclo inicial de desnaturalización	35 ciclos de amplificación	Último ciclo de elongación
3-5 min. a 94°C	30 seg. a 94°C (desnaturalización) 30 seg. a 55-58°C (anillamiento) 1 min. a 72°C (elongación)	7 min. a 72°C

La temperatura de anillamiento varió entre 55°C a 58°C para aumentar de esta manera la especificidad de la unión de los cebadores al ADNc.

Por otra parte, las condiciones en el estudio de la amplificación de la insulina en testículo son idénticas a las anteriores, excepto la temperatura de anillamiento que fue de 68°C.

Una vez amplificado de esta manera el fragmento de ADN deseado, se sometieron las muestras (10 µl) a una migración electroforética en gel de agarosa al 1% para separar los fragmentos en función de su peso molecular. Las bandas de ADN se visualizan bajo luz ultravioleta gracias al bromuro de etidio. Para comprobar el peso

molecular de los fragmentos de ADN, junto con las muestras se migró un marcador de pesos moleculares (Marcador de ADN 1Kb, MBI Fermentas).

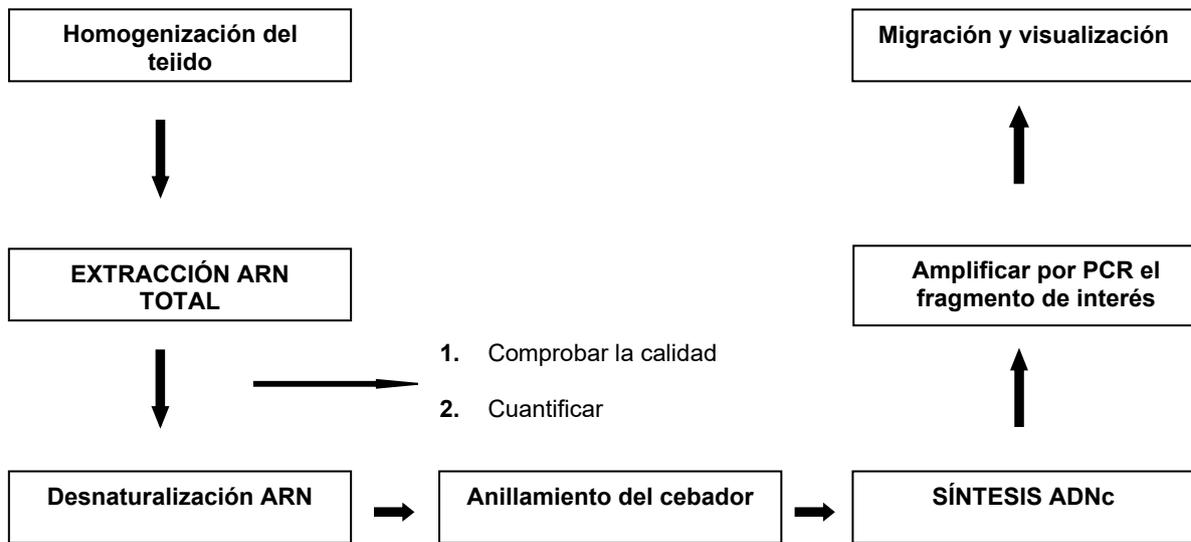


Figura III.3: Esquema de la técnica de RT-PCR

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticas entre grupos usando el programa PROC GLM de SAS ® System para Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EEUU). El nivel mínimo de significación se consideró de al menos $p < 0,05$ para todos los parámetros.

El análisis de la cuantificación de los western blots correspondientes a la expresión de los transportadores de glucosa tras la axotomía se realizó utilizando el método de la t de Student comparando los resultados obtenidos en cada día tras la lesión con su correspondiente control.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN TESTÍCULO DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS. REGULACIÓN EN DIABETES.

1.1. Expresión de GLUT8 en la espermatogénesis de ratón

1.1.1. Control de la especificidad del anticuerpo anti GLUT8-COOH

En los estudios realizados para la detección de la proteína GLUT8 se utilizó un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína. Este anticuerpo fue diseñado por nuestro grupo y producido por la empresa Q-Biogene (Francia). Para comprobar su validez se realizó un control de especificidad siguiendo el protocolo de western bot del apartado de material y métodos.

El anticuerpo detectó una banda de aproximadamente 42 kDa en testículo de ratón adulto (figura IV.1.1). El tamaño de la proteína observado coincidía con el publicado por otro grupo que utilizó un anticuerpo que reconoce la misma secuencia de aminoácidos (Doege et al., 2001). También se observó (figura IV.1.1), una segunda banda de aproximadamente unos 75 kDa. Una banda similar también ha sido detectada en lisado de reticulocitos y células HEK293T (Ibberson et al., 2000), en células transfectadas COS-7 (Doege et al., 2000; Schurmann et al., 2002) y en hígado y riñón de ratón (Gorovits et al., 2003; Schiffer et al., 2005). Puesto que los transportadores de glucosa tienden a agregarse incluso en condiciones desnaturalizantes, esta banda podría representar un homodímero de GLUT8, ya que su intensidad en relación a la banda inferior depende en parte de las condiciones de lisis, en particular de la adición de agentes reductores (Ibberson et al., 2000).

Cuando el anticuerpo se incubó previamente con el péptido GLUT8 inmunizante con una concentración 50 veces superior a la del anticuerpo, ambas señales específicas (42 y 75 kDa) desaparecían (figura IV.1.1), indicando que el anticuerpo anti-GLUT8 detectaba específicamente al transportador de glucosa GLUT8.

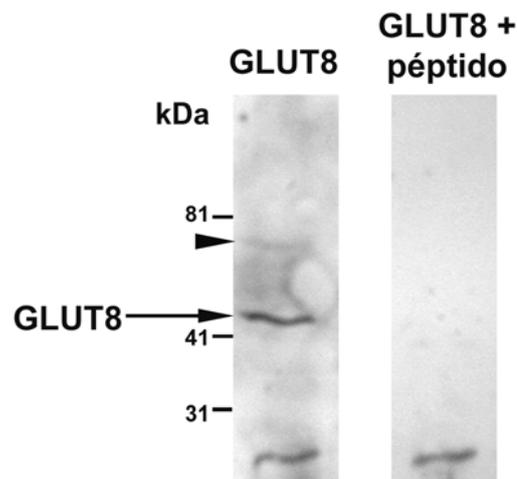


Figura IV.1.1: Inmunodetección de la proteína GLUT8 utilizando el anticuerpo anti-GLUT8-COOH mediante WB en testículo de ratón adulto. Se aprecia una banda de aproximadamente 42 kDa en la membrana incubada con el anticuerpo que desaparece en la membrana incubada con el anticuerpo preincubado previamente con el péptido a una concentración 50 veces mayor. También se observa una segunda banda específica de aproximadamente 75 kDa.

1.1.2. Expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot

Tras verificar la especificidad del anticuerpo anti-GLUT8 se pasó a analizar la presencia de GLUT8 mediante la técnica de western blot en testículos de ratón de distintas edades con el fin de averiguar cuándo se inicia su expresión. Puesto que la banda de 75 kDa fue siempre proporcional a la banda de 42 kDa, analizamos la expresión de la proteína GLUT8 correspondiente a la forma monomérica de 42 kDa. Para ello se realizaron homogenizados de los testículos de ratón de las siguientes edades: 14 días (en los que las células más diferenciadas que se encuentran son los espermatoцитos primarios), 24 días (donde hay células hasta la fase de espermátida redondeada) y de 7- 8 semanas (considerados maduros sexualmente puesto que en ellos ya se encuentran espermatozoides maduros). A partir del homogenizado se purificó la fracción correspondiente a las proteínas de membrana tal y como se detalla en el apartado de material y métodos. Después de determinar la concentración de proteínas en las muestras se estudió la expresión proteica de GLUT8 por la técnica de western blot. Los resultados obtenidos (figura IV.1.2) muestran una banda de 42 kDa en testículos de ratones de 24 días y en adultos, presentando en estos últimos una

mayor intensidad. Sin embargo en los de ratones de 14 días no se detectó ninguna expresión de la proteína GLUT8. Como se puede observar en la parte inferior de la figura, la expresión de actina, utilizada como control interno, fue similar para las tres muestras analizadas. Estos resultados muestran que la proteína empieza a expresarse entre los 14 y 24 días y sugieren que ese inicio de expresión podría tener lugar en las transformaciones que ocurren entre los estadios de espermatocito primario, secundario y la aparición de las primeras espermátidas.

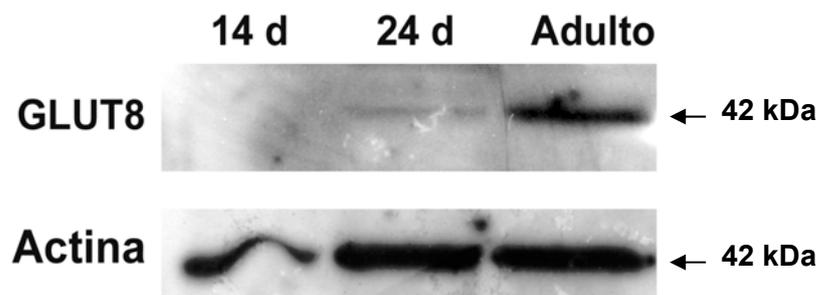


Figura IV.1.2: Análisis mediante western blot de la proteína GLUT8 en testículo de ratón de 14 días (14d), 24 días (24d) y adulto. Se aprecia la presencia de GLUT8 únicamente en testículo de ratón de 24 días y adulto. En la imagen inferior, detección de actina en los mismos tejidos, como control interno de la reacción.

1.1.3. Localización de la proteína GLUT8 mediante inmunohistoquímica

Con el fin de conocer que tipos celulares expresan el transportador de glucosa GLUT8 en el interior del testículo y, en lo posible, las estructuras concretas en las que se encuentra, se realizaron estudios inmunohistoquímicos utilizando el mismo anticuerpo, sobre secciones de testículos, de diferentes edades, previamente fijados e incluidos en parafina.

Como era de esperar, en testículos de 14 días, en los que, entre las células germinales, solamente son apreciables espermatogonias y espermatocitos pero no células más diferenciadas como espermátidas o espermatozoides, no se observó expresión de GLUT8 en ninguna célula testicular (figura IV.1.3).

Sin embargo, cuando se estudió la expresión en testículos de ratones de 24 días ya se detectó la presencia de inmunoreactividad (IR) frente a GLUT8. A esta edad, además de las células germinales presentes en testículos de animales de 14

días, ya se habían diferenciado las primeras espermátidas redondeadas en la parte más interna de los túbulos. Cuando se realizó la incubación con el anticuerpo anti-GLUT8 se observó que la IR aparecía en las células más internas de los túbulos seminíferos, es decir, en las espermátidas, que en esta edad se encuentran en las etapas iniciales de su desarrollo y que se identifican como células redondeadas de pequeño tamaño (figura IV.1.3). Al analizar más en detalle los sitios de expresión se comprobó que la IR estaba concentrada fuertemente en una zona perinuclear de aspecto bien puntiforme o bien en forma de media luna. Por la forma y localización, la zona que expresaba GLUT8 se correspondía con el sistema acrosómico en formación. Cuando en lugar de con el anticuerpo anti-GLUT8 las secciones se incubaban con suero obtenido de conejo previamente a su inmunización (suero preinmune), no se apreciaba IR en esas zonas, corroborando la especificidad de la reacción (figura IV.1.3).

En los testículos de ratones de 7-8 semanas de edad, están presentes todos los tipos celulares; es decir, espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas, lo que indica que ya se ha alcanzado la madurez sexual. Al estudiar la expresión de GLUT8 en estos órganos se observó un fuerte marcaje en todos los túbulos seminíferos, aunque la intensidad de la expresión y su localización variaban entre los diferentes túbulos. De nuevo, cuando los cortes histológicos fueron incubados con suero preinmune de conejo no se observó inmunoreactividad (figura IV.1.4). Al analizar las células que expresaban GLUT8 comprobamos altos niveles de expresión nuevamente en las espermátidas, células en las que aparecía GLUT8-IR con intensidad muy alta, aunque siempre localizada en un área muy circunscrita. En las espermátidas redondeadas recién formadas, la expresión de GLUT8 estaba restringida a un pequeño gránulo situado junto a la membrana nuclear, que coincidía en su forma y situación con el gránulo acrosómico recientemente formado, también denominado en fase de Golgi (figura IV.1.5). Con el progreso de la espermiogénesis la forma de la región que expresaba GLUT8 se veía modificada de acuerdo con la forma cambiante del sistema acrosómico en formación. De esta manera, además del gránulo puntiforme que se ha descrito anteriormente, también aparecía GLUT8-IR localizada en la vesícula acrosómica de las espermátidas redondeadas cuando la vesícula se aplasta sobre la membrana nuclear para adoptar la forma típica de casquete (fase de capucha o cubierta) que rodea aproximadamente la mitad del núcleo (figura IV.1.5). Cuando las espermátidas se alargan cambiando la forma de lo que será su cabeza, el acrosoma se alarga y se adapta a la forma también cambiante del núcleo. En las espermátidas alargadas se observó que la expresión de GLUT8 seguía restringida a la membrana

del sistema acrosómico, que en estos momentos tiene forma alargada (fase de acrosoma) (figura IV.1.5).

Una vez estudiada la expresión de GLUT8 en el testículo y haber comprobado su expresión en el sistema acrosómico de las espermátidas se estudió si el transportador continuaba presente en el acrosoma de los espermatozoides. Para ello se aplicaron las mismas técnicas de inmunohistoquímica a espermatozoides obtenidos del epidídimo. Los resultados mostraron que GLUT8 continuaba presente en el acrosoma de los espermatozoides obtenidos del epidídimo (figura IV.1.6).

La forma, situación y modificaciones que experimentaba la señal obtenida para GLUT8 a lo largo de la espermiogénesis parecían indicar que la estructura donde se localizaba GLUT8 era el sistema acrosómico en formación. Para corroborarlo, se realizaron tinciones de PAS, que detectan glucoproteínas y que en testículo y espermatozoides tiñen el acrosoma (Russell et al., 1990). Como se puede observar en la figura IV.1.4, los cortes de testículo adulto teñidos con PAS muestran una imagen similar a la obtenida cuando se realizó la detección de GLUT8. Además, al observar las muestras a mayores aumentos se pudo apreciar específicamente las formas del sistema acrosómico en formación en las espermátidas. También se realizó una tinción de PAS sobre espermatozoides aislados de epidídimo y se observó igualmente una imagen similar a la obtenida en la de GLUT8-IR (figura IV.1.6). Todos estos resultados juntos indican que la estructura en la que se localiza el transportador GLUT8 es el acrosoma.

Los resultados de las células que expresan GLUT8 en testículo de ratón en función de la edad del animal pueden verse en la tabla siguiente.

Tabla IV.1.1: Expresión de GLUT8 en los diferentes tipos celulares de los túbulos seminíferos correspondientes a animales de diferentes edades con indicación de la intensidad de la expresión: - (ausencia de expresión), ++ (intensidad moderada), +++ (intensidad fuerte).

EDAD DEL RATÓN			
Tipos de células testiculares	14 días	24 días	adulto
Espermatogonias	-	-	-
Espermatocitos	-	-	-
Espermatocitos I		-	-
Espermátidas redondeadas		++	+++
Espermátidas alargadas			+++
Espermatozoides			+++

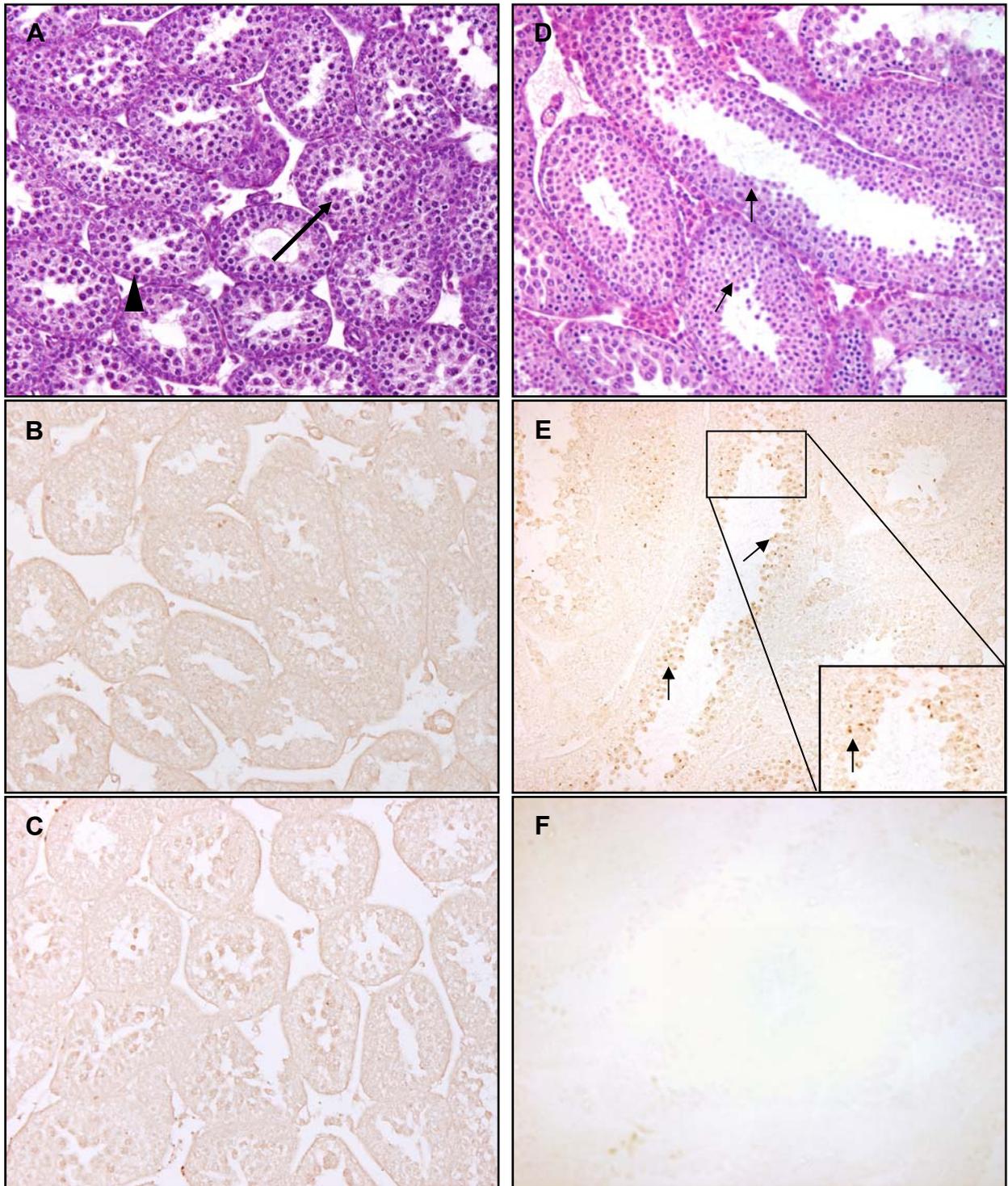


Figura IV.1.3: Inmunodetección de GLUT8 en túbulos seminíferos de ratón de 14 (A, B y C) y 24 días (D, E y F) de edad.

A y D- Secciones teñidas con hematoxilina – eosina. En los animales de 14 días de edad (A) se observan únicamente espermatogonias (punta de flecha) y espermatocitos primarios (flecha grande), mientras que en los ratones de 24 días de edad (D) se aprecian también espermatocitos secundarios y espermátidas redondeadas (flecha pequeña).

B y E- Secciones incubadas con el anticuerpo anti-GLUT8. En ratones de 14 días de edad no se observa marcaje (B), mientras que en ratones de 24 días de edad (E) se detecta inmunoreactividad en la zona central de algunos túbulos. Se observa marcaje específico en una zona que se corresponde con el acrosoma de las espermátidas redondeadas (flecha pequeña). **C y F-** Secciones incubadas con suero obtenido de conejo antes de su inmunización con GLUT8 (suero preinmune). Desaparece el marcaje específico en el acrosoma de las espermátidas (F).

Magnificación: 200X.

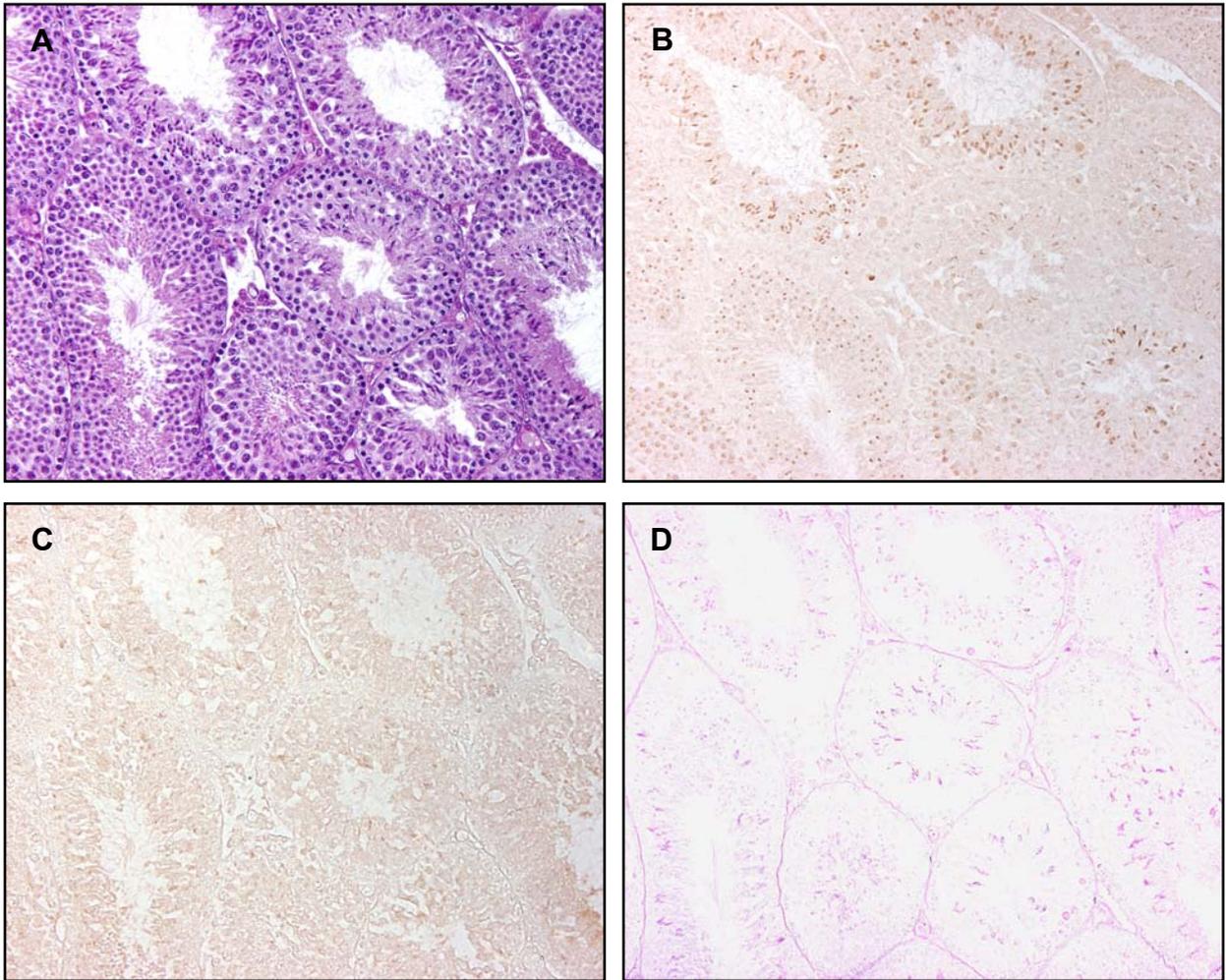


Figura IV.1.4: Secciones de testículos de ratón adulto en las que se observan varios túbulos seminíferos.

A- Sección teñida con hematoxilina - eosina.

B- Sección incubada con el anticuerpo anti-GLUT8. Se puede apreciar que aparece marcaje en todos los túbulos aunque con distinta distribución.

C- Sección consecutiva a la anterior incubada con suero preinmune en lugar de con el anticuerpo. Se observa cómo la señal específica desaparece.

D- Sección sucesiva a la anterior teñida con PAS. Se observa como se marca el sistema acrosómico de forma similar a las muestras incubadas con el anticuerpo anti-GLUT8.

Magnificación: 200X.

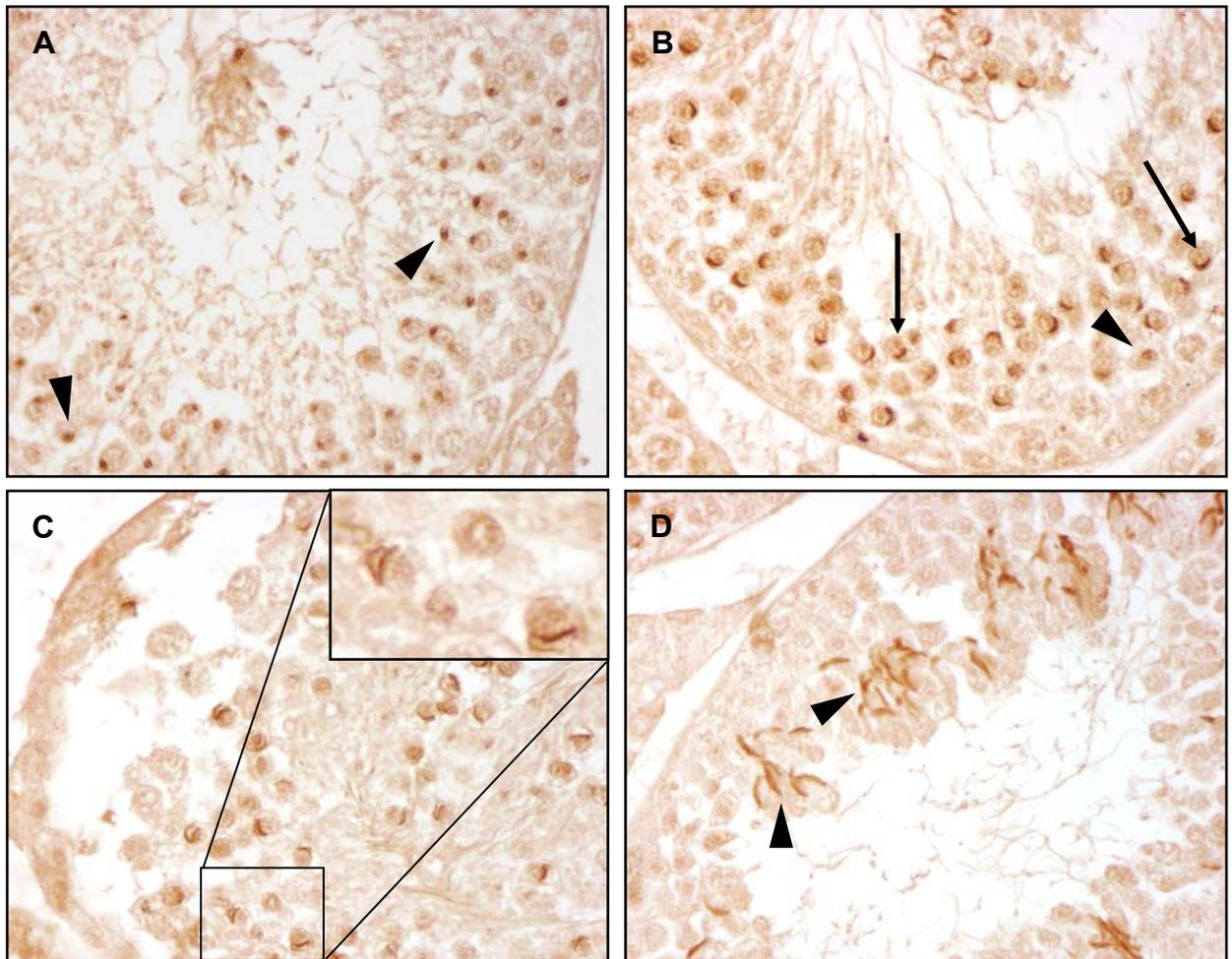


Figura IV.1.5: Localización inmunohistoquímica de GLUT8 en testículo de ratón adulto. Se observa inmunoreactividad en el acrosoma de las espermátidas en todas sus fases.

A- Detalle de un túbulo seminífero en el que se observa un marcaje puntiforme correspondiente al gránulo pro-acrosómico de las espermátidas redondeadas en fase de Golgi (punta de flecha).

B- Túbulo seminífero en el que coexisten células con marcaje puntiforme, correspondiente a espermátidas con el acrosoma en fase de Golgi (punta de flecha), con otras con marcaje en forma de media luna, propio de espermátidas cuyo acrosoma está en fase de capucha (flecha).

C- Sección de un túbulo seminífero en la cual se observa inmunoreactividad en la membrana del acrosoma en fase de capucha.

D- Inmunodetección de GLUT8 en espermátidas alargadas, en las que se aprecia marcaje en el acrosoma (punta de flecha) que en estas células tiene una forma alargada (fase de acrosoma).

Magnificación: 600X.

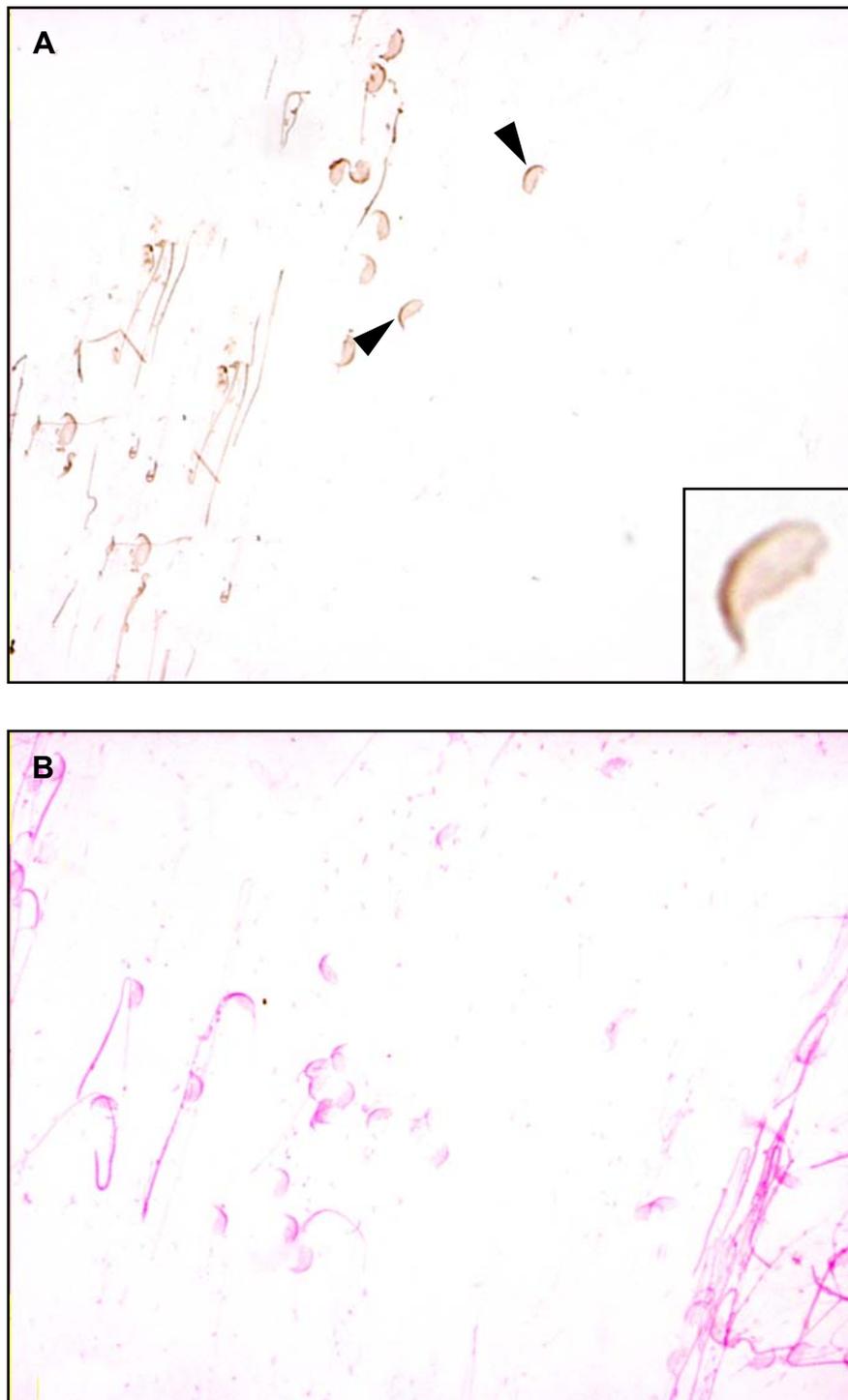


Figura IV.1.6: Espermatozoides obtenidos a partir de epidídimo de ratón.
A- Inmunodetección de GLUT8 en espermatozoides. Se puede apreciar inmunoreactividad en el acrosoma (punta de flecha).
B- Tinción de PAS para detectar glucoproteínas del acrosoma. Obsérvese la forma similar de las estructuras teñidas con la GLUT8-IR de la imagen anterior.
Magnificación: 600X

1.1.4. Expresión del ARNm de GLUT8

La presencia o ausencia de ARNm de GLUT8 en testículos de ratón de diferentes edades se confirmó mediante la técnica de RT-PCR. Con los cebadores utilizados (que amplifican una secuencia localizada entre los exones IV y VII), el producto obtenido tras las reacciones de RT-PCR debería aparecer como una banda de 507 pares de bases. Una banda de ese tamaño se observó en las muestras de testículo obtenidas de ratones de 24 días y en los adultos, pero no así en los ratones de 14 días (figura IV.1.7). Como se puede observar en la siguiente figura, la no amplificación de GLUT8 en las muestras de ratones de 14 días no es debido a un problema en el aislamiento del ARNm o de la síntesis del correspondiente ADNc, puesto que la amplificación de la GAPDH fue homogénea en todas las muestras analizadas. Por lo tanto, el estudio de expresión del gen de GLUT8 corrobora los resultados previamente obtenidos en los experimentos de expresión de la proteína.

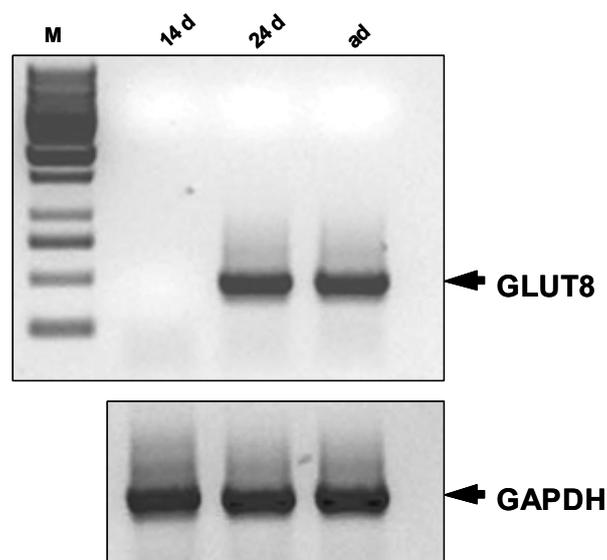


Figura IV.1.7: Amplificación de GLUT8 a partir de ADNc de testículo de ratón de 14 días (14d), 24 días (24d) y adulto (ad). Se observa que el ARNm se expresa en testículo de ratones de 24 días y en adulto, pero no en el de 14 días. En la figura inferior, amplificación de la GAPDH, en testículo como control interno de la reacción. M: marcador de pesos moleculares.

1.1.5. Expresión de los transportadores GLUT3 y GLUT4

Estudio de la expresión de la proteína GLUT3

Para poder comprender mejor la expresión y posible función de GLUT8 en las células germinales del macho, se realizaron estudios para detectar la expresión de GLUT3, un transportador del que se conoce su expresión en testículo (Burant and Davidson, 1994). Los resultados de western blot mostraron una banda ancha y difusa de unos 50 kDa en testículos de ratones adultos correspondiente al transportador GLUT3, similar a la mostrada por Burant y Davidson (figura IV.1.8). Estos resultados confirmaban que el transportador de difusión facilitada estaba presente en testículo.

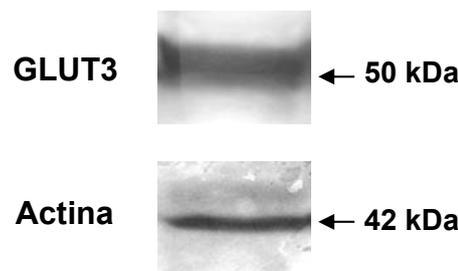


Figura IV.1.8: Estudio de expresión de la proteína GLUT3 en testículo de ratón adulto en western blot. Se observa una banda ancha y difusa de aproximadamente 50 kDa correspondiente al transportador de glucosa GLUT3. En la imagen inferior, detección de la actina, utilizada como control.

Tras observar que GLUT3 se expresaba en testículo de ratón adulto se pasó a estudiar la localización concreta de la proteína en el interior de los túbulos seminíferos de ratones de diferentes edades. Para ello cortes histológicos de testículo de ratones de 14 días y 24 días de edad, así de como ratones adultos fueron incubados con el anticuerpo anti-GLUT3 durante toda la noche.

En las muestras de testículo de ratón de 14 días de edad se observó una intensa IR frente GLUT3 en la mayor parte de los túbulos seminíferos, quedando algunos, probablemente aquéllos que contenían espermatozoides primarios en fases iniciales, sin marcaje aparente. La IR aparecía, además, distribuida de manera

diferente según los túbulos: mientras que los que contenían espermatoцитos en fases iniciales del desarrollo mostraban un marcaje ligero, en aquéllos en los que la espermatogénesis había avanzado y sus espermatoцитos estaban en fases más maduras, la intensidad del marcaje era mayor. La IR se localizaba principalmente en la membrana celular, si bien el citoplasma de las células marcadas mostraba también una, entre ligera y moderada, IR. Sin embargo no apareció marcaje ni en las espermatogonias, ni en el tejido intersticial (figura IV.1.9).

En los testículos de ratones de 24 días de edad la inmunoreactividad estaba presente en todos los túbulos seminíferos, marcando la membrana plasmática de los espermatoцитos y de las espermátidas redondeadas (figura IV.1.9). El citoplasma, al igual que en los testículos de animales de 14 días, mostraba también GLUT3-IR de menor intensidad que la membrana celular.

Finalmente, en testículos de ratones adultos, de 7-8 semanas de edad, se apreció GLUT3-IR en todos los túbulos seminíferos del testículo de ratón, con la localización de un intenso marcaje en la membrana plasmática de los espermatoцитos y de las espermátidas, y de forma más suave y difusa en su citoplasma (figura IV.1.10). Por el contrario, no se detectó GLUT3-IR ni en las espermatogonias ni en las células intersticiales.

En los espermatozoides obtenidos del epidídimo de ratón, GLUT3-IR era evidente en la membrana de la pieza intermedia y de la cola, mientras que la cabeza no aparecía marcada (figura IV.1.10).

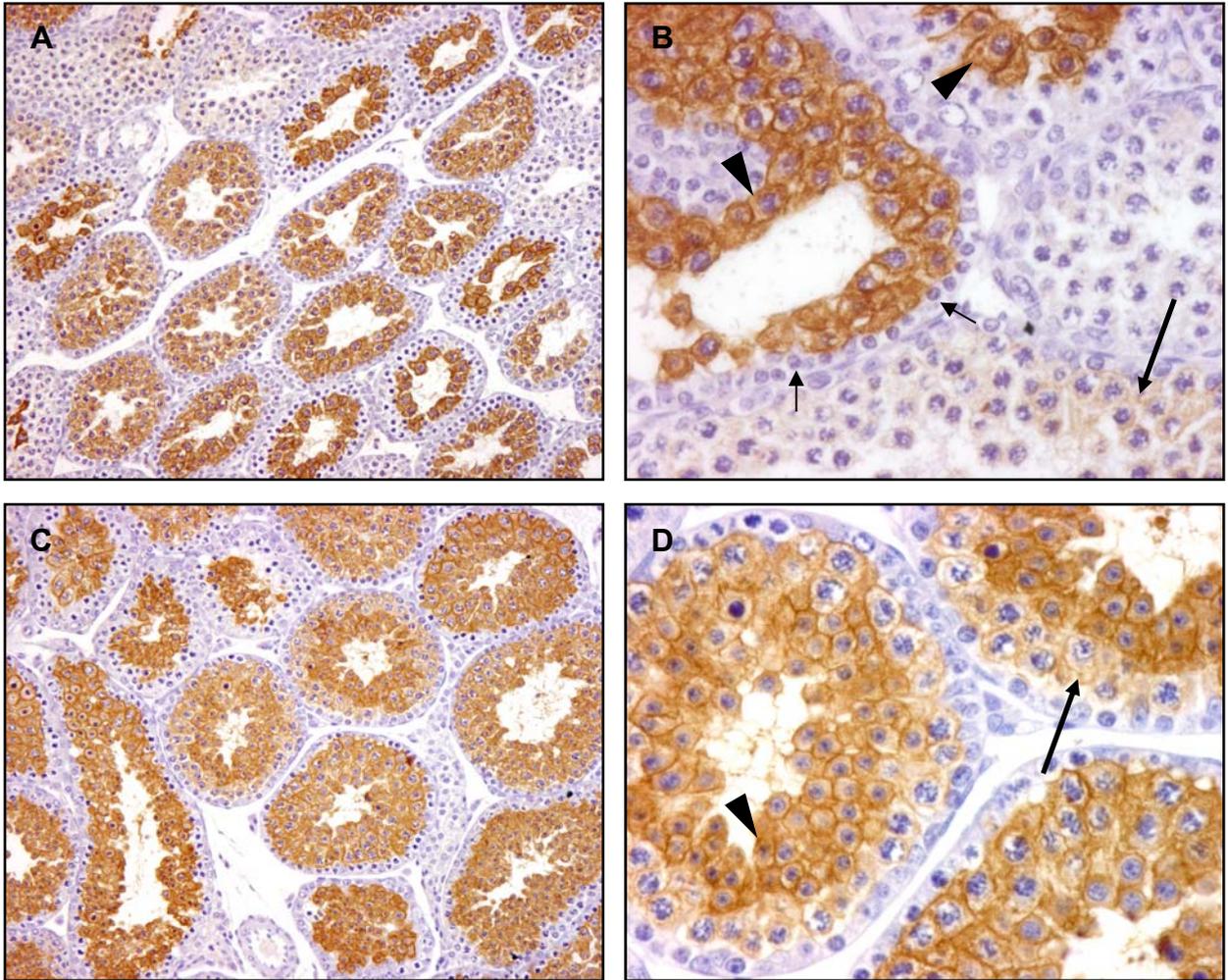


Figura IV.1.9: Secciones de túbulos seminíferos de ratones de 14 (A y B) y 24 días (C y D) de edad incubadas con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñidas con hematoxilina.

A- Sección de ratón de 14 días de edad incubada con el anticuerpo anti-GLUT3. Se observa IR en algunos túbulos. Magnificación: 100X.

B- Se aprecia IR cerca de la luz del túbulos, más intensa en los espermatocitos más maduros (punta de flecha) y más débil y difusa en los espermatocitos menos maduros (flecha grande). Por el contrario, no se observa marcaje en las espermatogonias (flecha pequeña). La GLUT3-IR se localiza de forma más intensa en la membrana plasmática y más difusa en el citoplasma de los espermatocitos. Magnificación: 600X.

C- Sección de ratón de 24 días de edad en los que se aprecia marcaje frente a GLUT3 en todos los túbulos, sin embargo no se detecta marcaje en el espacio intersticial. Magnificación: 100X.

D- Se observa marcaje en los espermatocitos y en las espermátidas redondeadas (punta de flecha). Al igual que en las secciones de testículo de 14 días de edad los espermatocitos más inmaduros presentan una IR más débil (flecha). La IR se localiza de forma más intensa en la membrana plasmática y más difusa en el citoplasma de los espermatocitos y de las espermátidas redondeadas. Magnificación: 600X.

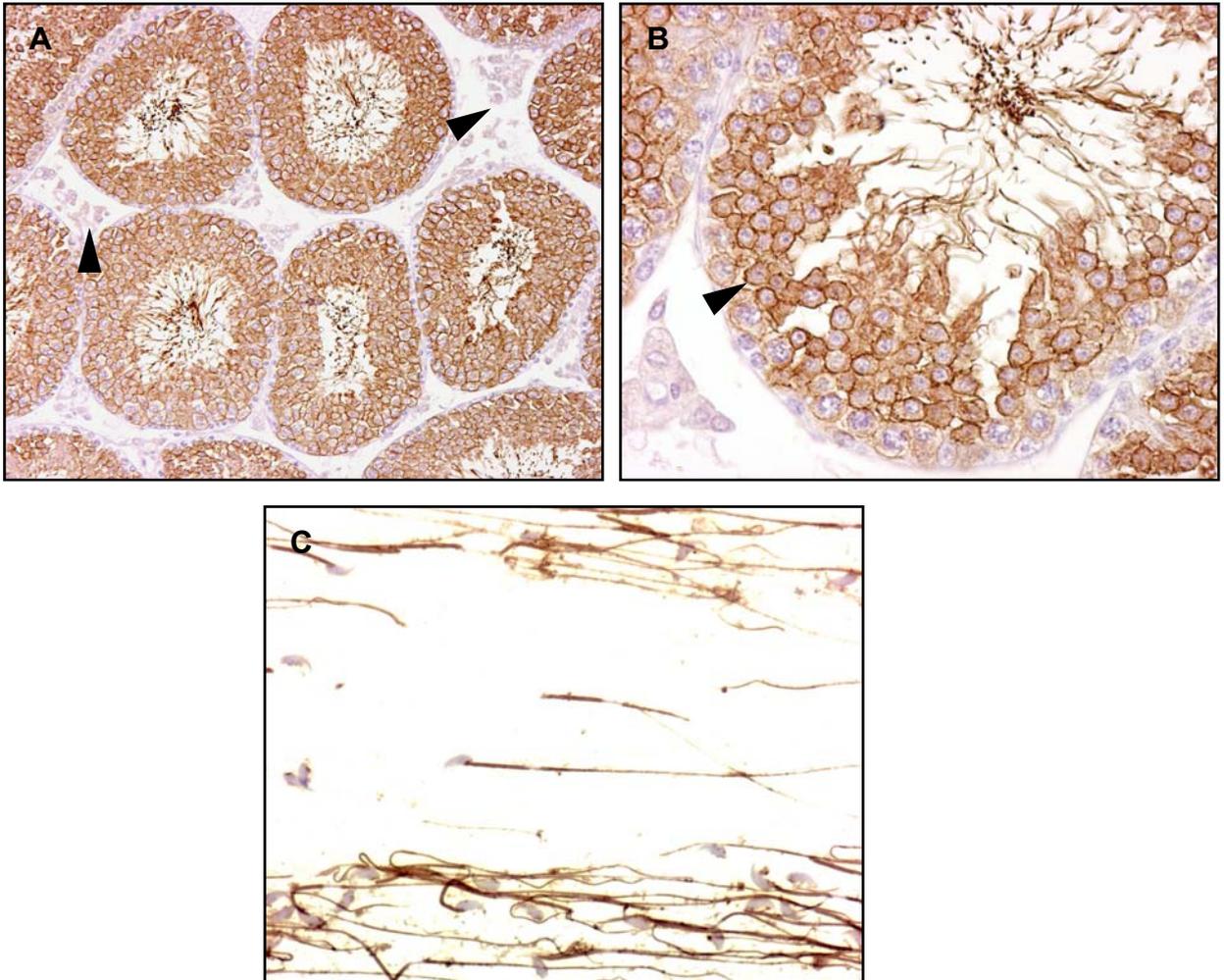


Figura IV.1.10: Inmunodetección de GLUT3 en testículo de ratón adulto (A y B) y en espermatozoides obtenidos del epidídimo (C).

A- Sección de túbulos seminíferos incubados con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñidos con hematoxilina. Se puede apreciar marcaje en todos los túbulos seminíferos, por el contrario, no se detecta inmunoreactividad en el espacio intersticial (punta de flecha). Magnificación 200X.

B- Se aprecia un marcaje intenso en la membrana plasmática de los espermatocitos y espermátidas (punta de flecha) y un marcaje más difuso y débil en el citoplasma de estas células. Por otra parte no se observa marcaje ni en las espermatogonias ni en el espacio intersticial. Magnificación 600X.

C- Espermatozoides obtenidos a partir de epidídimo de ratón incubados con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñidos con hematoxilina. Se observa GLUT3-IR en la en la membrana de la pieza intermedia y en el flagelo. Magnificación: 600X

Estudio de la expresión de la proteína GLUT4

A diferencia de GLUT3, la mayoría de trabajos publicados consideran que GLUT4 no se expresa en el testículo (Burant and Davidson, 1994; Kokk et al., 2004), por lo que el estudio de su expresión se utilizó como un control adicional negativo. En los experimentos para estudiar la presencia de GLUT4 en testículo se utilizaron muestras de corazón como control positivo para el anticuerpo anti-GLUT4, ya que en este órgano dicho transportador se expresa abundantemente. Cuando se realizaron experimentos de western blot, la proteína GLUT4 fue detectada claramente en muestras de tejido cardíaco, mientras que ninguna detección fue visible a partir de muestras de testículo (figura IV.11).

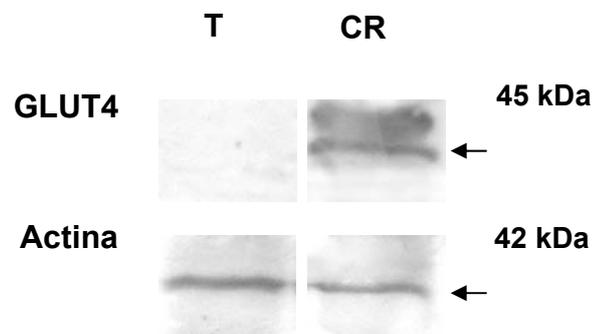


Figura IV.1.11: Análisis mediante western blot del transportador GLUT4 en testículo (T) y corazón (CR) de ratón adulto. GLUT4 fue detectado únicamente en músculo cardíaco, y no en testículo. En la imagen inferior, detección de la actina en los mismos tejidos, como control interno de la reacción.

Los resultados obtenidos por western blot fueron corroborados por inmunohistoquímica. Para ello se incubaron durante toda la noche muestras de testículo de ratón adulto con el anticuerpo anti-GLUT4 obteniendo como resultado la ausencia de expresión en el testículo, mientras que en músculo cardíaco la presencia de GLUT4-IR era clara (figura IV.1.12).

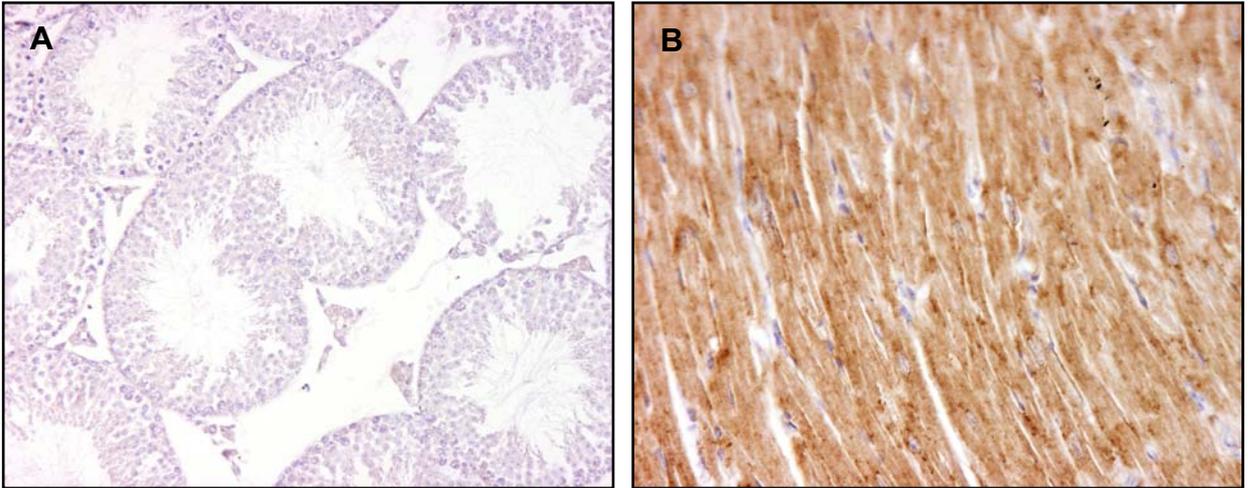


Figura IV.1.12: Localización inmunohistoquímica de GLUT4 en testículo y músculo cardiaco de ratón adulto.

A- Sección de túbulos seminíferos de ratón adulto incubada con el anticuerpo anti-GLUT4 y teñido con hematoxilina. No se observa inmunoreactividad ni en las células germinales ni en el espacio intersticial. Magnificación: 200X

B- Tejido cardiaco de ratón adulto, en el cual se aprecia una clara inmunoreactividad frente a GLUT4. Magnificación: 400X

1.2. Estudio de la expresión proteica de GLUT8 en testículo de rata.

Nuestros resultados precedentes demostraban claramente la presencia de GLUT8 en el sistema acrosómico de las espermátidas y espermatozoides de ratón. No obstante, algunos estudios (Chen et al., 2003; Ibberson et al., 2002) habían descrito la localización del transportador en la rata de forma diferente a la observada por nosotros y otros autores (Schurmann et al., 2002) en el ratón y humanos. Las diferencias entre unos trabajos y otros podrían deberse a que la expresión difería en función de la especie o bien a cuestiones técnicas de la metodología empleada.

Para comprobar si la expresión de GLUT8 era similar entre estas dos especies, se decidió estudiar la expresión de GLUT8 en testículo de rata comparándola con la observada ya en ratón, utilizando la misma metodología y anticuerpo. En este estudio se empleó, por lo tanto, el anticuerpo anti-GLUT8 utilizado en ratón. Este anticuerpo, como se ha indicado previamente, fue producido en conejo, utilizando como inmunógeno la secuencia de los últimos 11 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína GLUT8 de ratón. En esta región la proteína GLUT8 en la rata únicamente varía en uno de estos once aminoácidos (I por V), por lo que parecía razonable que pudiera ser útil también para detectar el transportador de esta especie.

1.2.1. Expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot

Se realizó un homogenizado de las proteínas de membrana de testículo de rata adulta y después de determinar la concentración de proteínas en las muestras se estudió la expresión proteica de GLUT8 por la técnica de western blot en comparación con muestras de homogenados de testículo de ratón adulto. Los resultados obtenidos mostraron una banda del mismo tamaño e intensidad que la observada en ratón (figura IV.1.13), de aproximadamente 42 kDa. Por lo tanto, el anticuerpo anti-GLUT8 también detectaba la proteína GLUT8 en testículo de rata adulta.

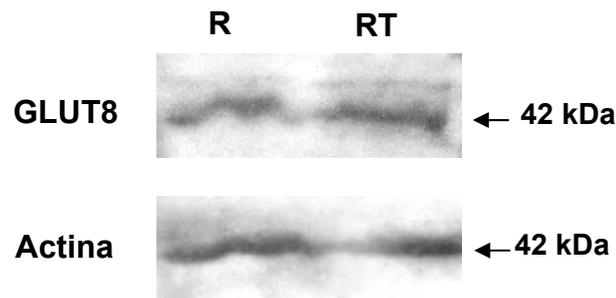


Figura IV.1.13: Estudio de la expresión de la proteína GLUT8 en testículo de rata mediante western blot. Se observa una banda de 42 kDa en testículo de ratón (R) y de rata (RT). En la parte inferior de la figura se aprecia la banda de actina, empleada como control interno.

1.2.2. Localización de la proteína GLUT8 mediante inmunohistoquímica

A continuación se estudió si el transportador GLUT8 se localizaba, en la rata, en los mismos tipos celulares y en las mismas estructuras que en ratón.

De manera similar a lo observado en ratón, al incubar las secciones de los testículos de rata adulta con el anticuerpo anti-GLUT8 se detectó un fuerte marcaje, aunque heterogéneo, en todos los túbulos seminíferos. Este marcaje no se observaba al incubar los cortes histológicos con suero preinmune de conejo en lugar de con el anticuerpo primario (figura IV.1.14). Al analizar las células que expresaban el transportador se observó una intensa GLUT8-IR nuevamente en las espermátidas, siempre localizada en una estructura que coincidía con el sistema acrosómico en formación, de manera que se podían diferenciar las tres fases que anteriormente también se habían observado en el ratón adulto. En la primera fase, la fase de Golgi, la expresión de GLUT8 se localizaba en el gránulo acrosómico de las espermátidas redondeadas (figura IV.1.14). En la fase de capucha (la segunda fase), GLUT8 se localizaba en la vesícula acrosómica de las espermátidas redondeadas, que presentaba la forma típica de casquete que rodea aproximadamente la mitad del núcleo (figura IV.1.14). Y por último, se observaba GLUT8-IR en las espermátidas alargadas (fase de acrosoma), en las cuales el acrosoma se alarga para adaptarse a la forma también cambiante del núcleo (figura IV.1.14).

A diferencia del ratón, en las células de Leydig de la rata se observó un ligero marcaje de GLUT8 que era distinguible del ruido de fondo obtenido en las preparaciones, pero que en cualquier caso, dicho marcaje era muy inferior a las

que se apreciaba en el sistema acrosómico de las espermátidas.

En los espermatozoides obtenidos del epidídimo de rata GLUT8 continuaba presente en el acrosoma, en este caso adaptándose a la forma típica de gancho que tiene en esta especie (figura IV.1.14).

Estos resultados indican que, al igual que en humanos (Schurmann et al., 2002) y ratón, y salvo la ligera expresión apreciable en las células de Leydig, la expresión de la proteína GLUT8 en la rata está también fundamentalmente restringida al sistema acrosómico, lo que sugiere que su presencia en el sistema acrosómico es un hecho general, independiente de la especie.

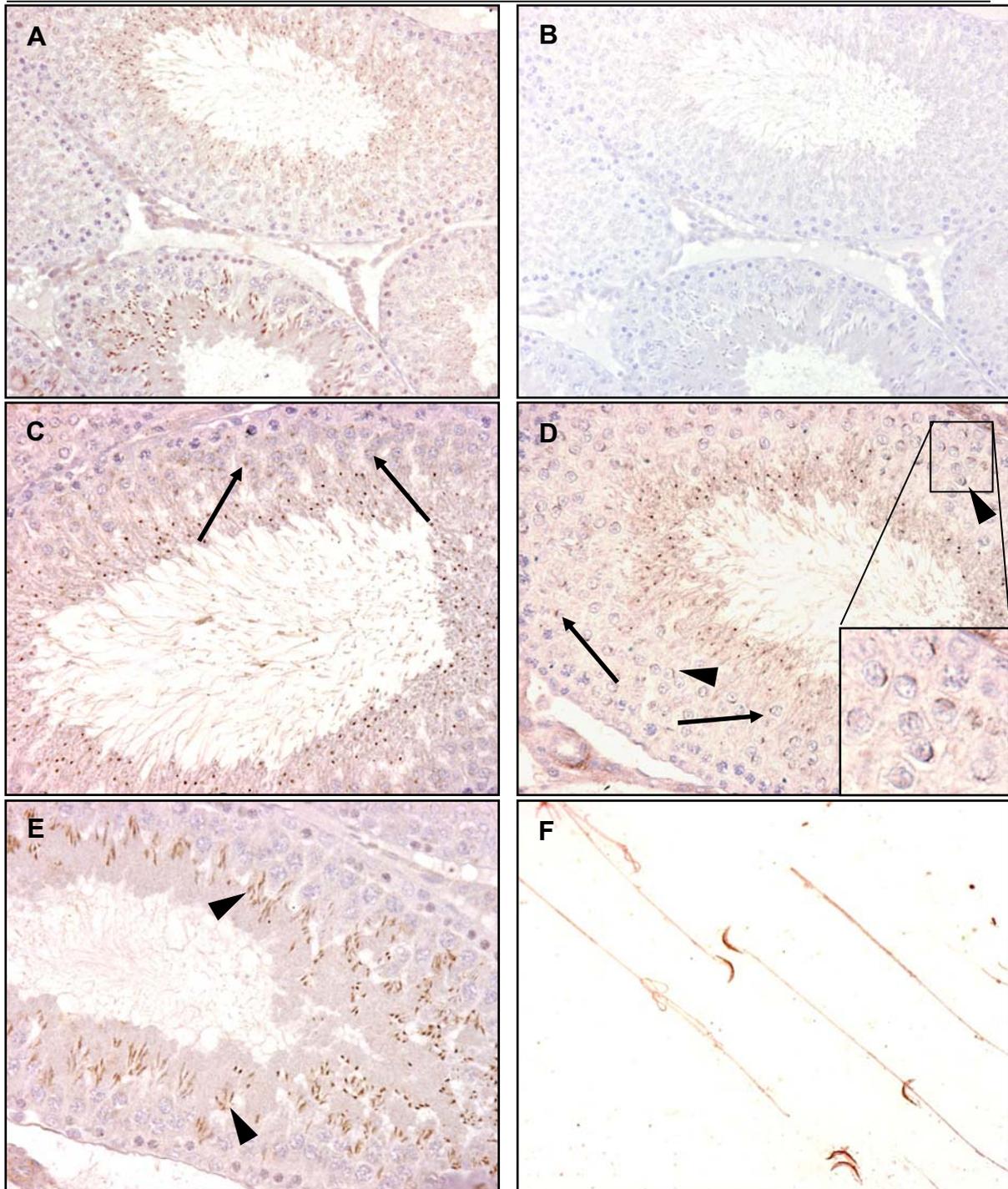


Figura IV.1.14: Inmunodetección de GLUT8 en túbulos seminíferos de rata adulta teñidos con hematoxilina.

A- Muestra incubada con el anticuerpo anti-GLUT8. Se aprecia IR en todos los túbulos seminíferos aunque con distinta distribución. Magnificación: 200X.

B- Sección consecutiva a la anterior incubada con suero preinmune en lugar de con el anticuerpo. Se observa como la señal específica desaparece. Magnificación: 200X.

C- Túbulo seminífero en el que se observa un marcaje puntiforme correspondiente al gránulo pro-acrosómico de las espermátidas redondeadas en fase de Golgi (flecha). Magnificación: 400X.

D- Túbulo seminífero en los que coexisten células con marcaje puntiforme (flecha), con otras con marcaje en forma de media luna, propio de espermátidas en fase de capucha (punta de flecha). Magnificación: 400X.

E- Sección en la que se aprecia marcaje en el acrosoma con forma alargada, de las espermátidas en fase de acrosoma (punta de flecha). Magnificación: 400X.

F- Espermatozoides de rata adulta en los cuales se aprecia GLUT8 en el acrosoma en forma de gancho. Magnificación: 600X.

1.2.3. Expresión de los transportadores GLUT3 y GLUT4

Estudio de la expresión de la proteína GLUT3

Seguidamente se estudió la expresión de GLUT3 mediante western blot en testículo de rata adulta. El anticuerpo detectó una banda ancha y difusa de unos 50 kDa en testículos de rata (figura IV.1.15), indicando que el transportador de glucosa de difusión facilitada GLUT3 también se expresa en testículo de rata adulta, similar a lo observado en ratón.

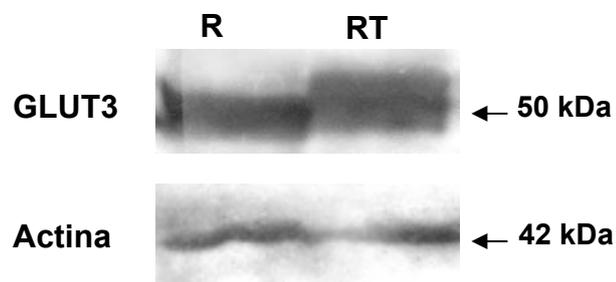


Figura IV.1.15: Análisis mediante WB de la proteína GLUT3 en testículo de rata adulta (RT). En el que se aprecia una banda ancha y difusa con un tamaño ligeramente mayor al observado en ratón (R). En la imagen inferior, detección de la actina en los mismos tejidos, como control interno de la reacción.

Los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos mostraron una fuerte GLUT3-IR en todos los túbulos seminíferos del testículo de rata. Concretamente, GLUT3 se expresó intensamente en la membrana plasmática y de forma leve y difusa en el citoplasma de los espermatoцитos y de las espermátidas, tanto redondeadas como alargadas (figura IV.1.16). Por el contrario, no se apreció marcaje frente a GLUT3 ni en las espermatogonias ni en las células intersticiales (figura IV.1.16). Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en los experimentos realizados con ratón adulto. En los espermatozoides obtenidos del epidídimo se detectó un intenso inmunomarcaje en la membrana de la pieza intermedia y de la cola, de forma similar a lo observado previamente en ratón (figura IV.1.16).

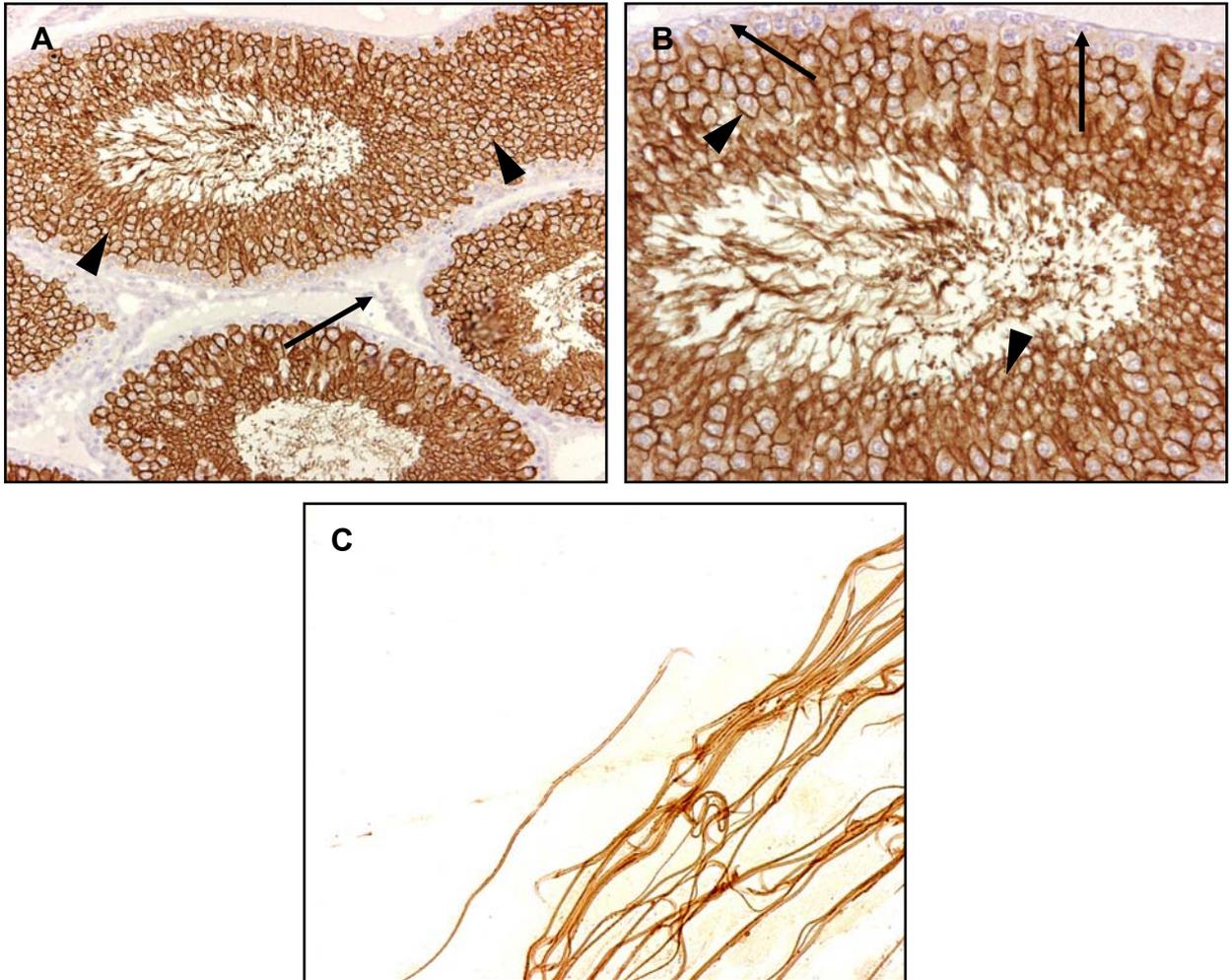


Figura IV.1.16: Localización inmunohistoquímica del transportador GLUT3 en testículo de rata adulta y en espermatozoides.

A- Muestra incubada con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñida con hematoxilina. Se observa un marcaje intenso en todos los túbulos seminíferos (punta de flecha), pero no en el espacio intersticial (flecha). Magnificación 200X.

B- Sección de un túbulo seminífero en el que se aprecia IR intensa en la membrana plasmática de los espermatocitos y de las espermátidas (punta de flecha). También se detecta un marcaje más débil y difuso en el citoplasma de las células anteriores y en los espermatocitos más inmaduros. Por otra parte, no se detecta marcaje en las espermatogonias (flecha). Magnificación 400X.

C. Espermatozoides de rata incubados con el anticuerpo anti-GLUT3. Se observa un marcaje intenso en la pieza intermedia y en el flagelo. Magnificación 600X

Estudio de la expresión de la proteína GLUT4

Al igual que en el ratón, no se detectó expresión de GLUT4 ni por western blot ni por inmunohistoquímica (figura IV.1.17) en el testículo de rata adulta. Se empleó como control positivo de la reacción de GLUT4, al igual que en el estudio anterior, tejido cardíaco, donde la expresión de este transportador es muy elevada

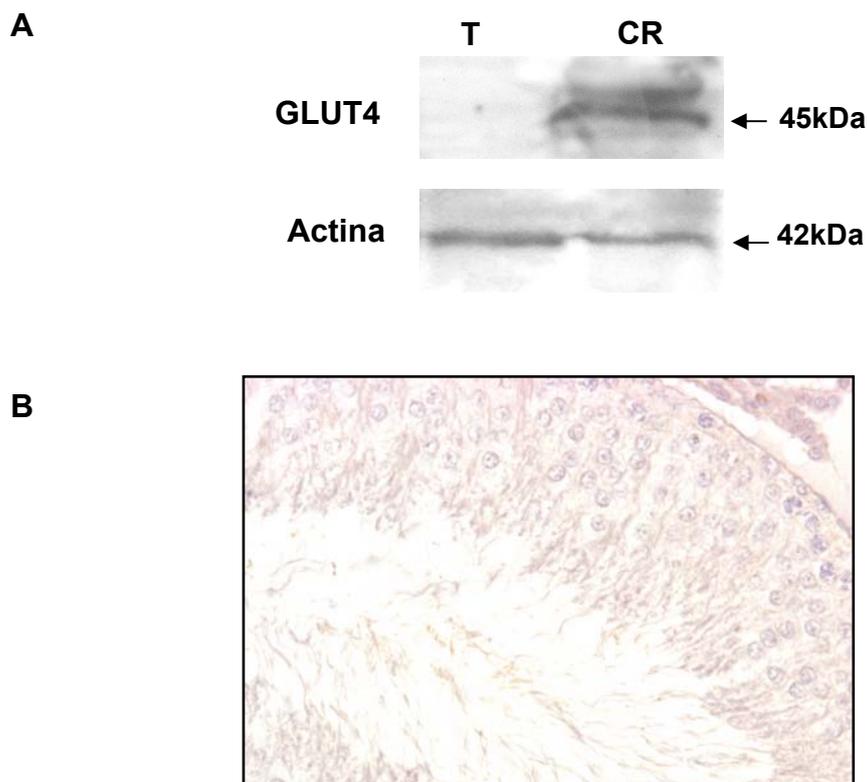


Figura IV.1.17: Estudio de la expresión de GLUT4 en testículo de rata adulta.

A- Análisis mediante WB de la proteína GLUT4 en testículo de rata adulta. No se observa expresión de GLUT4 en testículo (T), por el contrario si que se detecta en músculo cardíaco (CR) empleado como control positivo. En la imagen inferior, detección de la actina en los mismos tejidos.

B- Detección inmunohistoquímica de GLUT4. No se aprecia marcaje ni en el túbulo seminífero ni en el espacio intersticial. Magnificación: 400X.

1.3. Expresión de los transportadores de glucosa en el estado de diabetes.

1.3.1. Modelo experimental

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que GLUT8 era uno de los principales transportadores del testículo. Como se ha indicado en el apartado de la Introducción, en algunos sistemas este transportador está regulado por los niveles de insulina y/o de glucosa en la sangre (Gorovits et al., 2003; Piroli et al., 2002) especialmente, cuando, como en el caso del testículo, GLUT4, el principal transportador insulino-dependiente, no se expresa (Carayannopoulos et al., 2000; Pinto et al., 2002).

Por todo ello, y partiendo del hecho de la enorme importancia que representa GLUT8 dentro de las células germinales testiculares, quisimos investigar la regulación de GLUT8 en un proceso patológico como la diabetes, que provoca alteraciones en los testículos y que cursa con grandes modificaciones en los niveles de insulina y glucosa. El estudio se completó con el análisis de GLUT3, un transportador que se ha descrito que no varía sus niveles en testículos en estados diabéticos (Burant and Davidson, 1994), aunque recientemente se ha puesto en cuestión este hecho (Ballester et al., 2004).

Para llevar a cabo estos estudios utilizamos ratas macho adultas, dado que la expresión de GLUT8 era similar en rata y ratón, y puesto que la rata es una especie donde los efectos de estados diabéticos estaban mucho más estandarizados que en el caso del ratón.

Para estudiar el efecto de la diabetes en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT8 y GLUT3 en los túbulos seminíferos y en los espermatozoides, se dividieron las ratas macho adultas en tres grupos. Al primer y segundo grupo (n=6 y n=7 respectivamente) se les indujo un estado de diabetes mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina. El segundo grupo se trató con insulina para remitir los efectos de la diabetes, mientras que el primero permaneció todo el experimento sin tratamiento. Por último, el tercer grupo se utilizó como control (n=6).

Durante el mes que duró el experimento se analizó diariamente el peso y el estado de glucemia de las ratas, y por último, tras el sacrificio también se estudió el

peso de los testículos. Además, en el grupo de las ratas diabéticas se observaron otros caracteres secundarios propios de un estado diabético como son la poliuria y la polifagia.

El análisis de los niveles de glucemia de los animales tratados con estreptozotocina, a las 72 horas del tratamiento, mostró un claro aumento de los niveles de glucosa en sangre en los animales diabéticos sobre los niveles fisiológicos normales, confirmando que las ratas a las que se había inyectado estreptozotocina presentaban un estado de diabetes tipo 1. A partir de este momento, en el que se confirmó la diabetes de los animales, de entre los animales diabéticos se seleccionaron los que constituyeron el grupo de animales tratados con insulina, en el que se inició un tratamiento con insulina como se ha descrito en el apartado de material y métodos. Este tratamiento, que se repitió diariamente, provocó una disminución de los niveles de glucosa, aunque seguían siendo mayores que los de los animales control. Los niveles de glucosa se analizaron cada día por la tarde durante el periodo que duró el experimento (tabla IV.1.2).

Tabla IV.1.2: Niveles de glucemia en mg/dl (media \pm desviación estándar) el tercer día tras el tratamiento con stz y en momento del sacrificio. ¹ La glucemia de las ratas diabéticas el día del sacrificio superaba el umbral de detección del medidor.

ANIMALES	GLUCEMIA EL 3º DÍA	GLUCEMIA EN EL SACRIFICIO
Ratas control	96,36 \pm 7,76	82,83 \pm 5,56
Ratas diabéticas	324,31 \pm 32,87	> 646,15 ¹
Ratas diabéticas tratadas con insulina	364,07 \pm 83,95	261,65 \pm 85,1

El peso corporal de las ratas diabéticas experimentó un descenso periódico en comparación con los animales control, que aumentaban de peso de forma paulatina, de manera que el día del sacrificio el peso de los animales diabéticos era un 35% menor que el de las ratas control. El tratamiento de los animales diabéticos con insulina revertía los efectos de la diabetes de forma que estos animales aumentaban de peso de forma similar a los controles (tabla IV.1.3). También se observó un empeoramiento progresivo de la condición corporal de los animales diabéticos.

1.3.2. Alteraciones testiculares en las ratas diabéticas

Como era de esperar, la inducción de la diabetes produjo una reducción del peso de los testículos en comparación con el de los otros dos grupos (tabla IV.1.3). Entre el grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina y el grupo control no se apreciaron diferencias.

Tabla IV.1.3: Peso corporal, peso de los testículos y diámetro de los túbulos seminíferos (media \pm desviación estándar) en el momento del sacrificio. * Las diferencias del peso corporal y del peso de los testículos fueron significativas ($p > 0.05$) en los animales diabéticos respecto a los animales control y a los diabéticos tratados con insulina.

ANIMALES	PESO CORPORAL	PESO TESTÍCULO	DIÁMETRO TÚBULOS SEMINÍFERO
Ratas control	336,38gr. \pm 11,7	2,48gr \pm 0,15	256,1 μm \pm 5,76
Ratas diabéticas	219,78gr. \pm 13,95 *	1,83gr. \pm 0,14 *	136,26 μm \pm 6,94
Ratas diabéticas tratadas con insulina	327,1gr. \pm 17,09	2,6gr. \pm 0,19	258,09 μm \pm 5,03

El estudio morfométrico de los túbulos seminíferos mostró que el diámetro medio de los túbulos de las ratas diabéticas se reducía hasta casi la mitad del tamaño de los otros dos grupos estudiados (tabla IV.1.3). Sin embargo, y salvo la reducción en el tamaño de los túbulos, no se apreciaron diferencias morfológicas importantes en los tipos celulares que constituyen los túbulos seminíferos de los diferentes grupos ni en las células intersticiales. No obstante, no se realizaron recuentos totales de células ni de tipos celulares específicos, lo que no excluye la existencia de posibles variaciones en estos aspectos.

1.3.3. Estudio de la expresión de la proteína GLUT8 en ratas diabéticas

A partir de las muestras obtenidas se estudió la expresión del transportador GLUT8 en los animales diabéticos, diabéticos tratados con insulina y control mediante western blot e inmunohistoquímica.

Estudio de expresión de GLUT8 mediante western blot

El análisis de la expresión del transportador GLUT8 mediante la técnica de western blot mostró bandas de similar intensidad en los tres grupos, indicando que los niveles totales de GLUT8 en testículo no varían en estados diabéticos ni como respuesta a la administración de insulina tras la inducción de la diabetes (figura IV.1.18). Esto fue corroborado cuando se cuantificó la expresión de GLUT8 y se comparó entre los tres grupos de animales, tras su estandarización respecto a la expresión de la actina en todas estas muestras (figura IV.1.18).

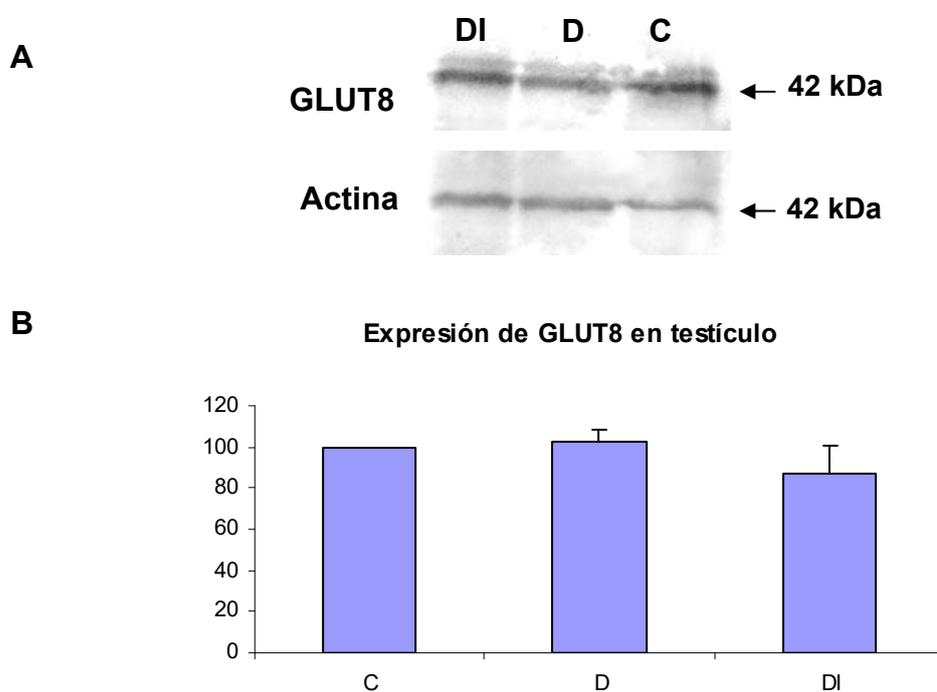


Figura IV.1.18: Estudio de la expresión de GLUT8 en testículo.

A- Western blot comparando la expresión de GLUT8 en testículo de ratas control (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (DI). La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT8 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT8 entre los tres grupos estudiados.

Estudio de la localización de GLUT8 mediante inmunohistoquímica

Aunque no se detectaron variaciones significativas en la expresión de GLUT8 entre los tres grupos del experimento, quisimos estudiar la localización del transportador en las ratas diabéticas no tratadas y tratadas con insulina para analizar si se modifican los tipos celulares que expresaban el transportador o se producían alteraciones en la localización subcelular del mismo.

En las ratas diabéticas se detectó GLUT8-IR en el sistema acrosómico, en su fase de granulo, de capucha y de acrosoma, de forma similar a lo observado en las ratas control. Es decir, no se observaron cambios en la localización del transportador de glucosa en el estado de diabetes (figura IV.1.19). Tampoco se apreciaron cambios en el patrón de expresión en los testículos de las ratas diabéticas tratadas con insulina (figura IV.1.19).

Por último, el estudio de localización de la proteína GLUT8 en los espermatozoides de las ratas diabéticas tratadas, con insulina subcutánea y no tratadas, mostró GLUT8-IR en el acrosoma en forma de gancho, con la misma distribución e intensidad similar a la observada en espermatozoides de ratas no diabéticas (figura IV.1.19).

1.3.4. Estudio de expresión de GLUT3 en ratas diabéticas

El estudio de la presencia de la proteína GLUT3 en testículo por técnicas de western blot mostró que, aunque aparentemente había un ligero descenso en las ratas diabéticas y en las diabéticas tratadas con insulina este descenso no era estadísticamente significativo (figura IV.1.20).

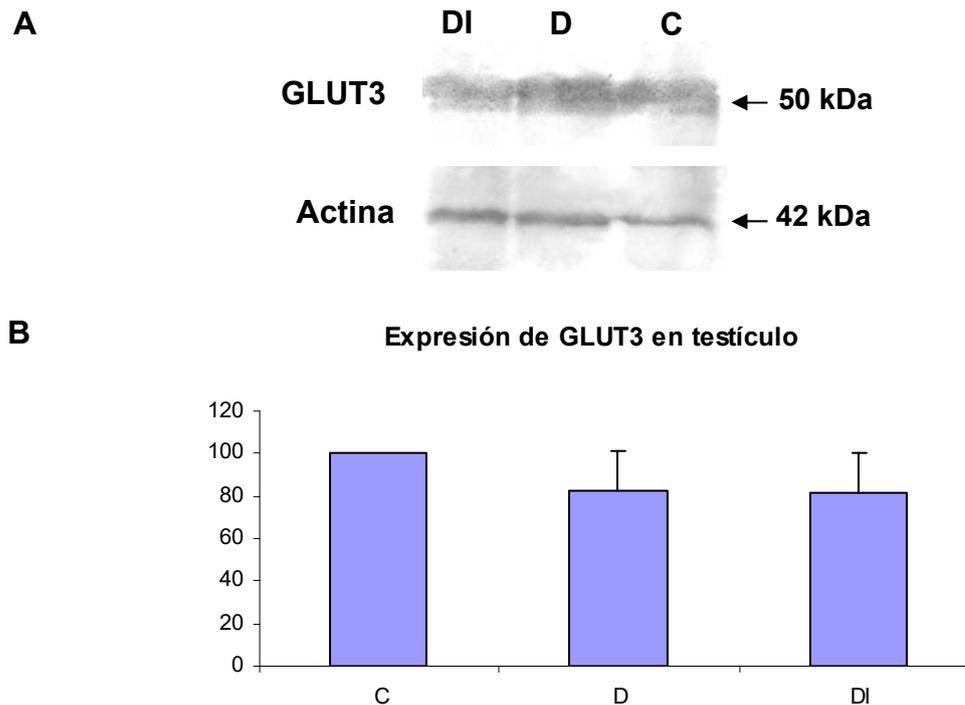


Figura IV.1.20: Estudio de la expresión de GLUT3 en testículo.

A- Western blot comparando la expresión de GLUT3 en testículo de ratas control (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (DI). La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT3 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT3 entre los tres grupos estudiados.

Para analizar posibles cambios en la localización de la proteína en estos grupos se incubaron cortes histológicos con el anticuerpo anti-GLUT3. Como se puede apreciar en la figura IV.1.21, GLUT3-IR se localizaba en la membrana plasmática de los espermatozoides y de las espermátidas redondeadas y alargadas, de manera similar a la observada en las ratas control. De la misma manera, en los espermatozoides de ratas diabéticas y de ratas diabéticas tratadas con insulina se continuó observando una intensa GLUT3-IR en la membrana plasmática de la pieza intermedia y en el flagelo, sin variaciones aparentes con respecto a las células procedentes de animales control (figura IV.1.21).

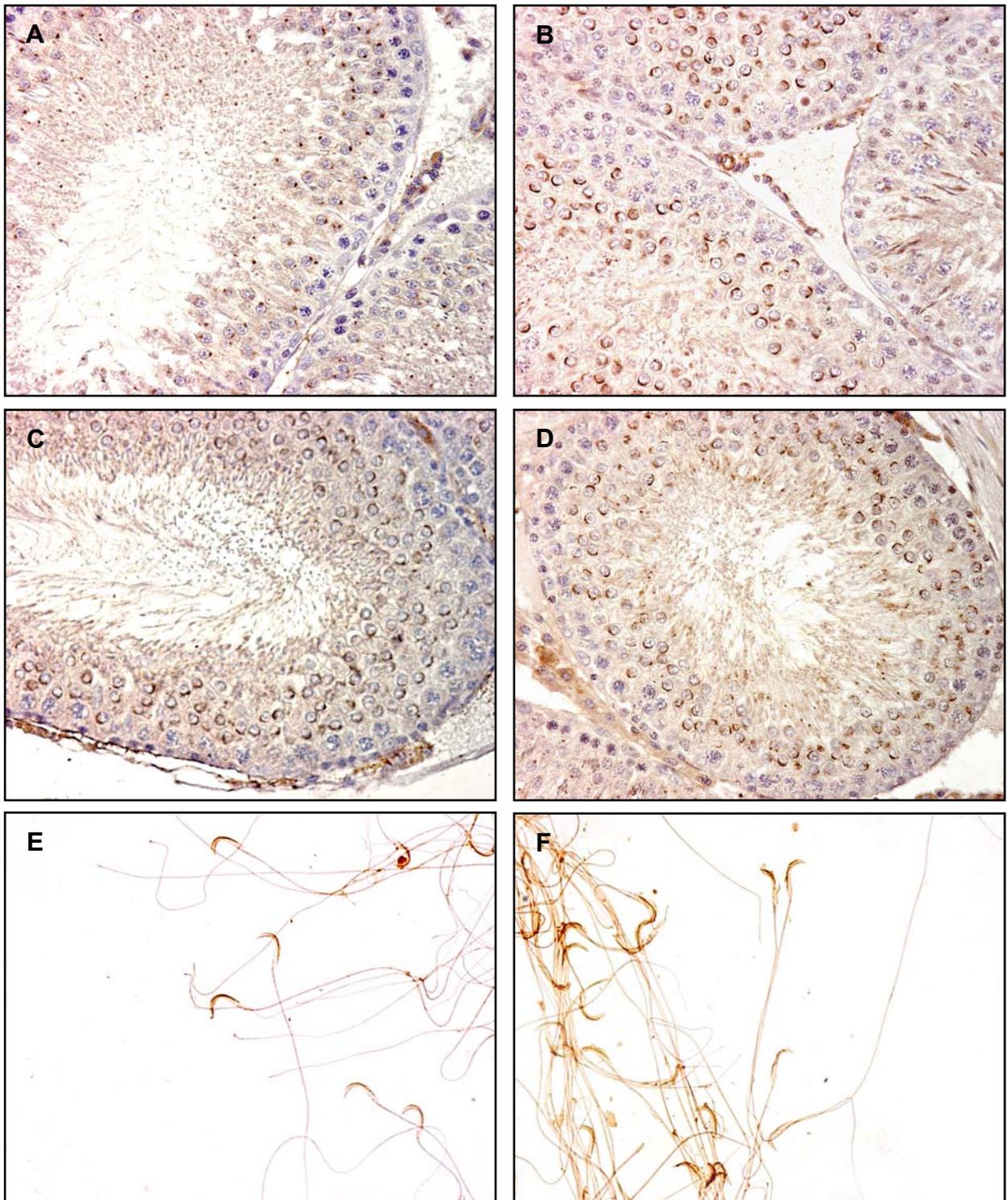


Figura IV.1.19: Inmunodetección de GLUT8 en secciones de túbulos seminíferos y en espermatozoides de rata diabética no tratada y rata diabética tratada con insulina.

A y B- Sección de testículo de rata diabética incubado con el anticuerpo anti-GLUT8 y teñido con hematoxilina. Se aprecia un marcaje similar al observado en los túbulos seminíferos de rata control. Magnificación: 400X

C y D- Sección de testículo de rata diabética tratada con insulina incubado con el anticuerpo anti-GLUT8 y teñido con hematoxilina. También presenta un marcaje similar a la muestra control. Magnificación: 400X

E- Espermatozoides de ratas diabéticas. Se observa marcaje en el acrosoma, al igual que ocurría en los espermatozoides de ratas control. Magnificación: 600X

F- Espermatozoides de ratas diabéticas tratadas con insulina, también muestran una IR similar a los espermatozoides de ratas control. Magnificación: 600X

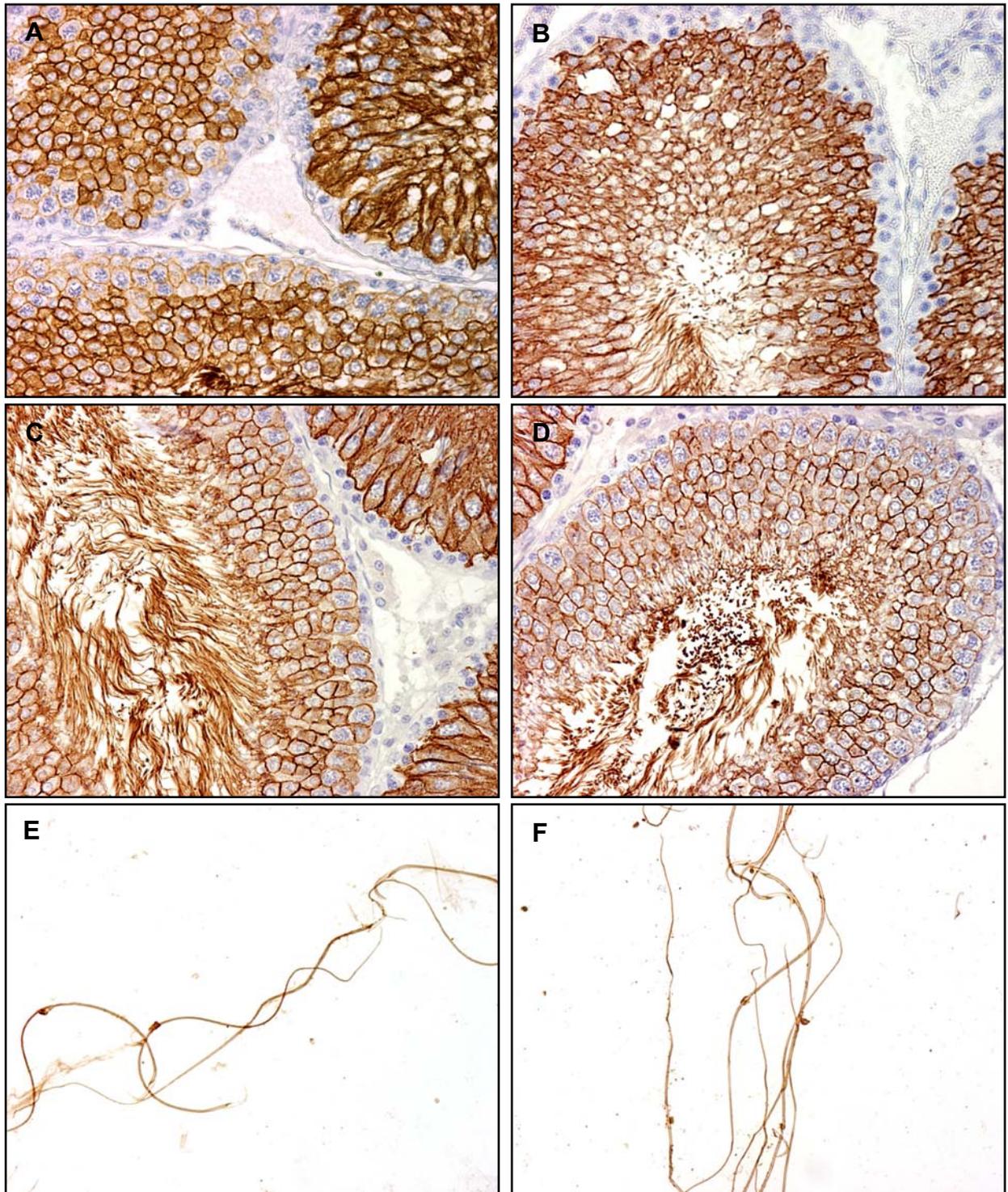


Figura IV.1.21: Inmunohistoquímica de GLUT3 en túbulos seminíferos y espermatozoides de rata diabética y rata diabética tratada con insulina.

A y B- Sección de túbulos seminíferos de rata diabética incubada con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñida con hematoxilina. Se aprecia un marcaje similar al observado previamente en rata control. Magnificación: 400X

C y D- Muestra de testículo de rata diabética tratada con insulina incubada con el anticuerpo anti-GLUT3 y teñida con hematoxilina. No se observan diferencias respecto a la rata control, Magnificación: 400X

E- Espermatozoides de rata diabética incubados con el anticuerpo anti-GLUT3. Se detecta un marcaje intenso a lo largo de la pieza intermedia y del flagelo de forma similar al observado en rata control. Magnificación: 600X

F- Espermatozoides de ratas diabéticas tratadas con insulina incubados con el anticuerpo anti-GLUT3. Muestran una inmunoreactividad similar a la imagen anterior. Magnificación: 600X.

1.3.5. Expresión de insulina en testículo de rata adulta

La ausencia de variación en la expresión de dos de los principales transportadores de glucosa (especialmente GLUT8, que en otros sistemas está bajo la regulación de la insulina y la glucosa), en testículo de rata tras inducir un estado de diabetes, sugería que en este órgano dichos transportadores no estaban bajo el control de la hormona y que la glucemia no influía de manera determinante en su expresión. No obstante recientemente se ha descrito la producción de insulina por los propios espermatozoides (Aquila et al., 2005). Pareció por lo tanto interesante estudiar si en la rata, de manera similar a lo descrito en humano, había una producción de insulina por parte de los espermatozoides y/o en los testículos que pudiera compensar de alguna manera los efectos de la insulinopenia sistémica en estas células. Para estudiar esta posibilidad se analizó si la hormona se expresaba en espermatozoides y testículos de los tres grupos de animales.

Estudio de la expresión de insulina mediante western blot

En primer lugar se estudió, mediante western blot, si la insulina se expresaba en los testículos de los tres grupos experimentales de ratas. Se empleó como control positivo tejido pancreático de rata. La incubación con el anticuerpo anti-insulina dio como resultado la visualización de una banda del mismo tamaño (36 kDa) que la detectada en páncreas, tanto en los testículos de ratas control como en diabéticas tratadas y no tratadas con insulina. Al realizar la cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas en las membranas, se comprobó que, tanto en los testículos de las ratas diabéticas como en los de las diabéticas tratadas con insulina, había una reducción significativa de los niveles de insulina, que se reducían hasta aproximadamente la mitad de los niveles obtenidos en los testículos de las ratas control (figura IV.1.22).

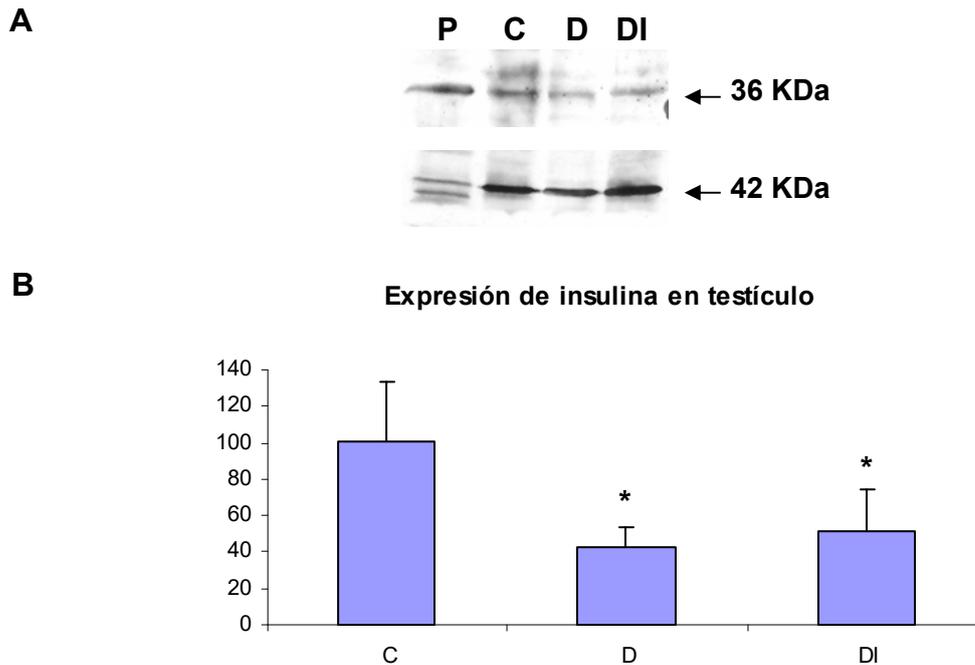


Figura IV.1.22: Estudio de la expresión de la insulina en testículo de rata.

A- Western blot comparando la expresión de insulina en testículo de ratas control (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (DI). La detección de la actina se empleó como control interno. . Como control de la expresión de insulina se utilizó tejido pancreático (P).

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de la insulina (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). * Existe una reducción significativa ($P < 0,05$) en los niveles de insulina en los testículos de las ratas diabéticas y de las diabéticas tratadas.

Estudio de la localización de la insulina mediante inmunohistoquímica

Tras comprobar por western blot la presencia de insulina en testículo, se intentó localizar por inmunohistoquímica las células concretas que la producían. Como se puede apreciar en las siguientes figuras se detectó inmunoreactividad frente a la insulina en la zona central de todos los túbulos seminíferos de las ratas control, aunque de forma diversa. Un análisis detallado de la IR permitió identificar que en los túbulos en los estadios del I al VI, y en los estadios IX al XIV el marcaje era difuso y localizado en el citoplasma de sus espermátidas alargadas (figura IV.1.24). Por otra parte, los túbulos que se encontraban en los estadios VII y VIII, en los cuales el citoplasma de las espermátidas alargadas se concentra en el cuerpo residual justo antes de que las espermátidas sean liberadas a la luz como espermatozoides, la inmunoreactividad aparecía concentrada intensamente adoptando un aspecto granular al lado de las espermátidas alargadas (figura IV.1.24).

Teniendo en cuenta la fase de desarrollo de las espermátidas, se puede concluir que la detección de la insulina en el citoplasma de las espermátidas se iniciaba aproximadamente en fase 9 (coincidente con el estadio IX del ciclo espermático), momento en que la célula empieza a alargarse, apreciándose en esos momentos como un ligero marcaje por todo el citoplasma. De esta manera se apreciaba en el citoplasma de la mayor parte de las espermátidas alargadas (fases 9 a 18, correspondiente a los estadios del ciclo IX a XIV y I a VI), hasta que en las últimas fases del desarrollo de las espermátidas (fase 19, estadio VII y VIII del ciclo) el marcaje se condensaba fuertemente en el cuerpo residual. Toda esta secuenciación de hechos sobre la expresión de insulina en el citoplasma de espermátidas y cuerpos residuales se encuentra esquematizado en la figura IV.1.23, donde coloreado en rojo se muestra la expresión de la insulina.

A pesar de que al analizar por western blot los niveles de insulina en testículo se había apreciado una disminución en las ratas diabéticas, tratadas o no con insulina, al comparar su distribución inmunohistoquímica no se observaron variaciones en la localización de la misma en los túbulos de los animales diabéticos y diabéticos tratados, en comparación con la observada en las ratas control (figura IV.1.25).

Finalmente se analizó la posible presencia de insulina en los espermatozoides. Sorprendentemente y, a diferencia de lo que se ha publicado par la especie humana (Aquila et al., 2005), no se apreció inmunomarcaje en ninguna parte de los espermatozoides procedentes de ratas control ni en los espermatozoides de ratas diabéticas o de ratas diabéticas tratadas con insulina.

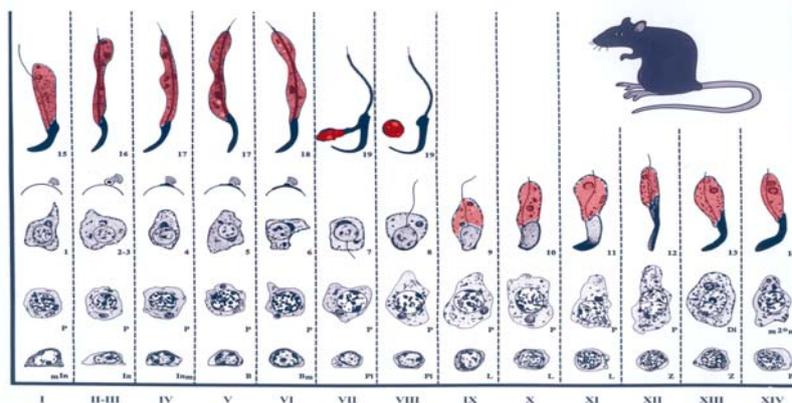


Figura IV.1.23: Representación de la expresión de la insulina (marcada con el color rojo) en los diferentes estadios del ciclo espermático de la rata

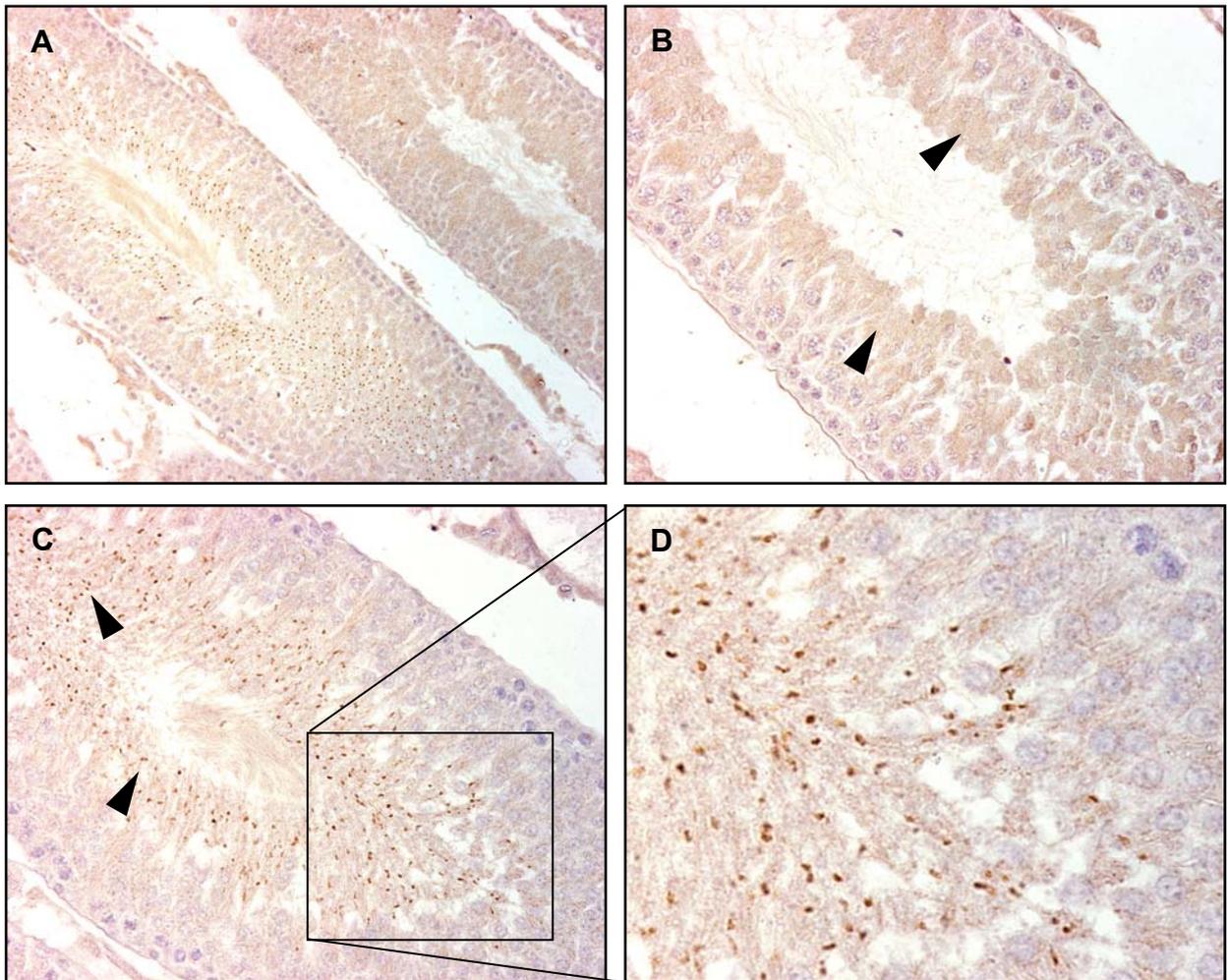


Figura IV.1.24: Inmunodetección de la insulina en túbulos seminíferos de rata adulta teñidos con hematoxilina.

A- Sección incubada con el anticuerpo anti-insulina. Se observa marcaje en todos los túbulos seminíferos, aunque de forma diferente. Magnificación: 200X.

B- Se aprecia un marcaje difuso en el centro túbulo seminífero, correspondiente al citoplasma de las espermátidas alargadas (punta de flecha) en los estadios del IX al XIV. Magnificación: 400X.

C- Se observa IR en el centro del túbulo seminífero en forma de granulo, se corresponde con el cuerpo residual (punta de flecha) en el estadio VII y VIII. Magnificación: 400X.

D- Fragmento del túbulo seminífero de la imagen anterior en el que se aprecia IR frente a la insulina en el cuerpo residual de las espermátidas alargadas.

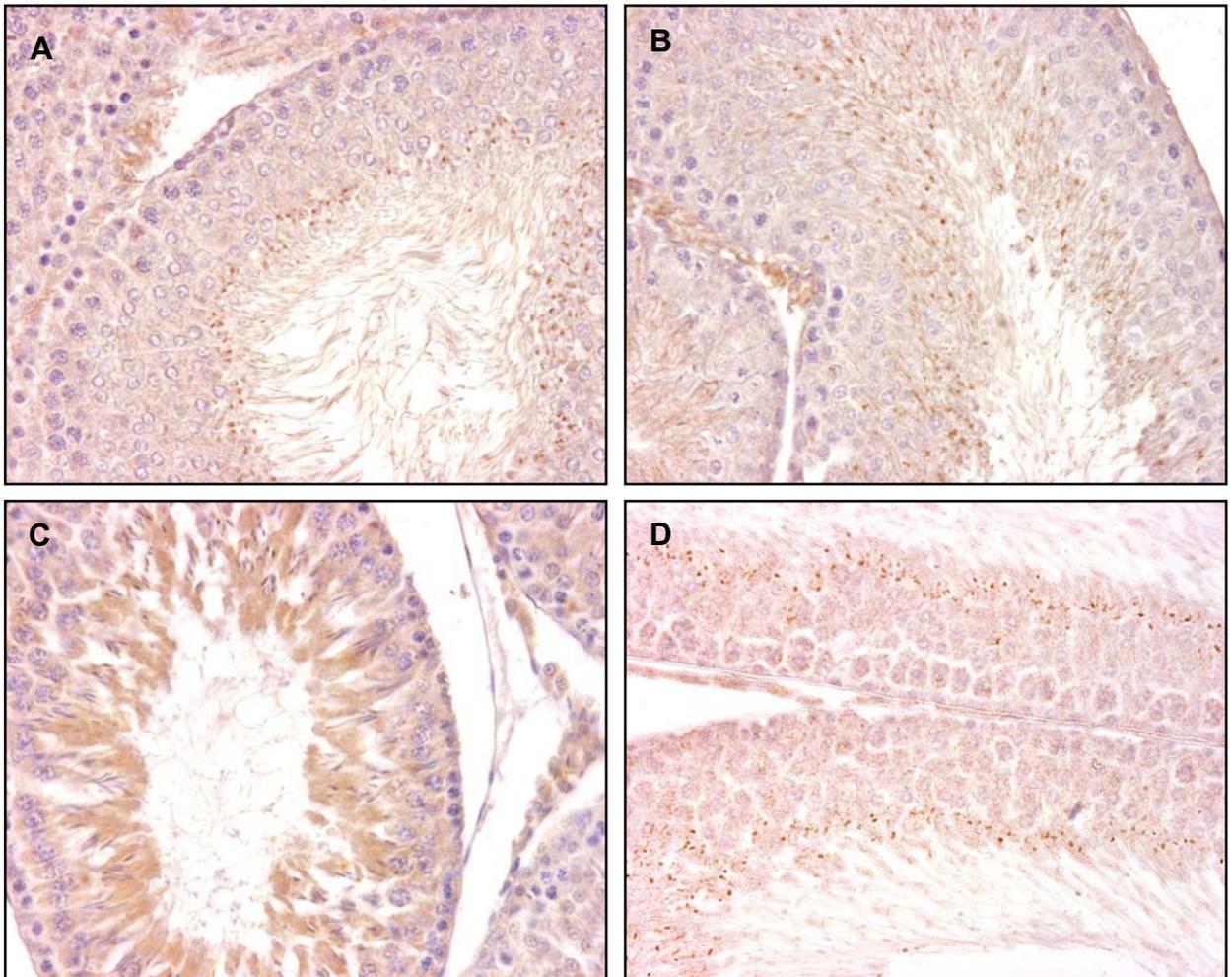


Figura IV.1.25: Inmunodetección de la insulina en testículos de ratas diabéticas y de ratas diabéticas tratadas con insulina teñidos con hematoxilina.

A y B- Túbulos seminíferos de rata diabética en los que se aprecia una IR similar a la observada en rata control.

C y D- Secciones de túbulo seminífero de rata diabética tratada con insulina en los que se observa un marcaje similar al observado en rata control.

Magnificación: 400X.

Expresión del ARNm de la insulina en testículo

Finalmente, para comprobar si la insulina detectada era producida por el propio testículo o bien era captada de fuentes externas, se estudió mediante la técnica de RT-PCR y utilizando cebadores específicos, la presencia de ARNm de insulina en testículo de rata adulta (control, diabética y diabética-insulina). Los resultados mostraron la presencia de una banda de 282 pb en los tres grupos experimentales objeto de nuestro estudio, cuyo tamaño se correspondía con el esperado para el fragmento amplificado de insulina. Una banda del mismo tamaño también apareció en páncreas de rata adulta, empleado como control positivo (figura IV.1.26). Estos resultados confirman que la insulina se produce en testículo, tanto en un estado fisiológico como en un estado de diabetes de manera independiente a los niveles de insulina y de glucosa en sangre.

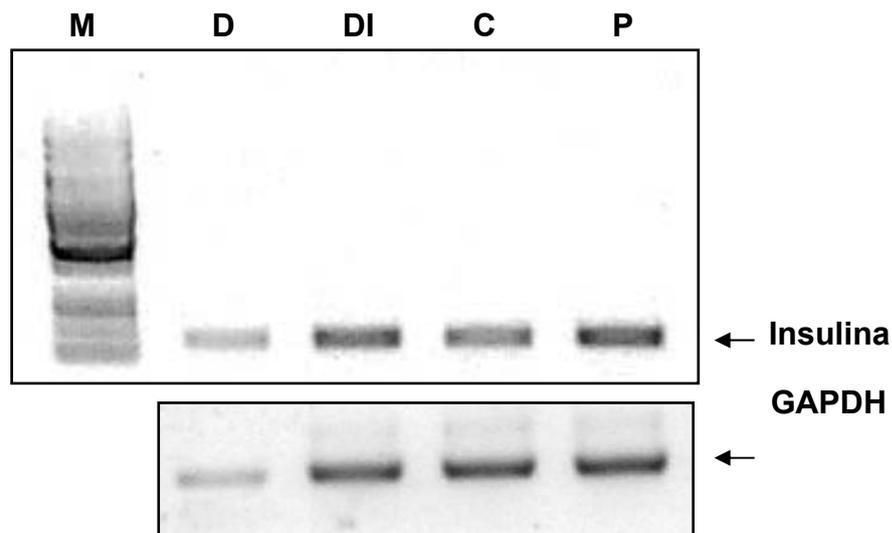


Figura IV.1.26: Amplificación de la insulina a partir de ADNc de testículo de rata diabética tratada con insulina (DI), de diabética no tratada (D) y de control (C). Se observa que el gen se expresa en todos en los tres grupos anteriores y en páncreas (P) empleado como control positivo. En la figura inferior, amplificación del ADNc de la GAPDH, como control interno de la reacción. M: marcador de pesos moleculares.

2. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN EL NÚCLEO DEL FACIAL TRAS LA AXOTOMÍA.

2.1. Estudio de la expresión de los transportadores de membrana en el tronco del encéfalo de ratón adulto

2.1.1. Expresión del ARNm de los transportadores de membrana en el tronco del encéfalo

En primer lugar, se estudió la presencia de ARNm de *glut1*, *glut3*, *glut4* y *glut8* en el tronco del encéfalo de ratón adulto mediante la técnica de RT-PCR.

Los cebadores utilizados amplificaron fragmentos de 309 pb, 337 pb, 310 pb y 507 pb, correspondiendo cada uno de ellos a *glut1*, *glut3*, *glut4* y *glut8*, respectivamente (figura V.2.1). Tras confirmar la expresión de los cuatro genes en el tronco del encéfalo de ratón se pasó a estudiar la presencia de las proteínas y sus posibles variaciones tras la axotomía en ratones adultos y neonatos sacrificados a tiempos diferentes tras la lesión.



Figura IV.2.1: Amplificación de los genes *glut1*, *glut3*, *glut4* y *glut8* partir de ADNc del tronco del encéfalo de ratón adulto. Se observa que los cuatro genes se expresan en este tejido.

2.1.2. Estudio de los transportadores en el tronco del encéfalo mediante western blot

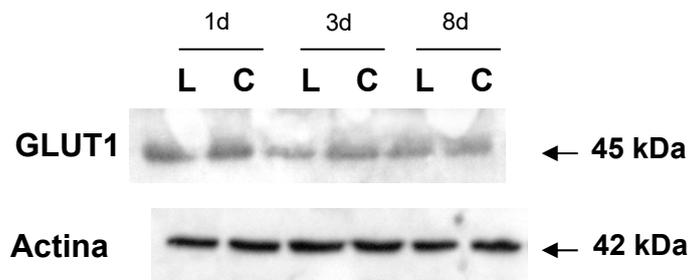
Se analizó la presencia de las proteínas de los transportadores GLUT mediante la técnica de western blot en el tronco de encéfalo de ratón adulto con el fin de averiguar si las proteínas se expresaban y, en caso de que así fuera, si se producían variaciones de expresión en respuesta a la lesión. Para ello, se realizó una sección completa del nervio facial tras su salida por el agujero estilomastoideo. Los animales se sacrificaron a las 24 horas, 3 días y 8 días tras la lesión y, tras separar el tronco del

encéfalo de cada ratón en sus mitades izquierda (lesionada) y derecha (control), se realizó un homogenizado del tronco del encéfalo, se purificó la fracción correspondiente a las proteínas de membrana y se estudió la expresión proteica de GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos.

Expresión de GLUT1

Se observó una banda de 45kDa en cada una de las muestras, correspondiente al transportador GLUT1. Los niveles de expresión del transportador no variaron entre el lado lesionado y el control en ninguno de los días de sacrificio tras la operación (figura IV.2.2).

A



Expresión de GLUT1 tras la axotomía del nervio facial en adultos

B

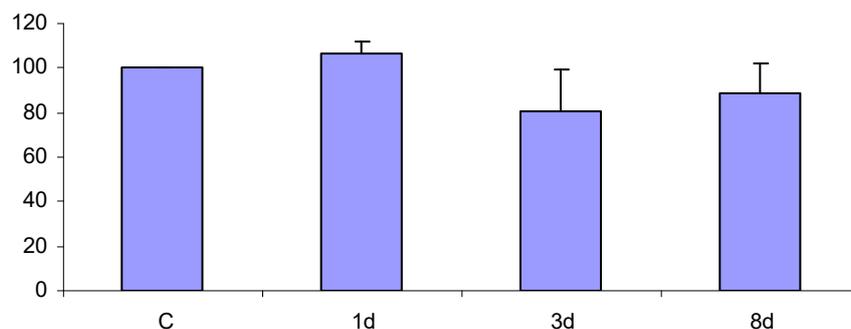


Figura IV.2.2: Estudio de la expresión de GLUT1 en el tronco del encéfalo de ratones adultos tras la axotomía del nervio facial.

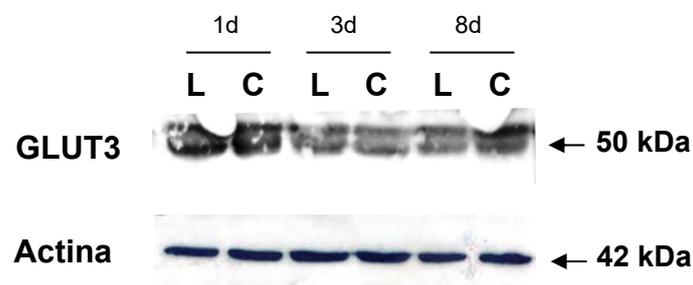
A- Western blot representativo de la expresión de GLUT1 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT1 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT1 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT3

Los resultados de western blot mostraron una banda ancha de aproximadamente 50 kDa en cada una de las muestras del tronco del encéfalo de ratones adultos correspondiente al transportador GLUT3 (figura IV.2.3). Aunque aparentemente la cuantificación de los blots mostraba un ligero descenso de los niveles de GLUT3 a los 8 días tras la lesión, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

A



B

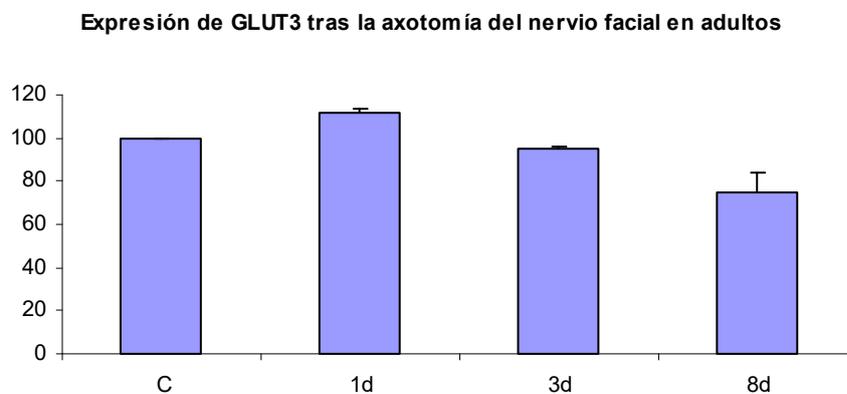


Figura IV.2.3: Estudio de la expresión de GLUT3 en el tronco del encéfalo de ratones adultos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT3 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT3 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT3 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT4

Con el anticuerpo anti-GLUT4 se detectó una banda de aproximadamente 45 kDa en cada uno de los tejidos estudiados (figura IV.2.4). Al igual que para GLUT1 y GLUT3 no se observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína entre el lado lesionado y el control en ninguno de los tres tiempos postlesionales estudiados.

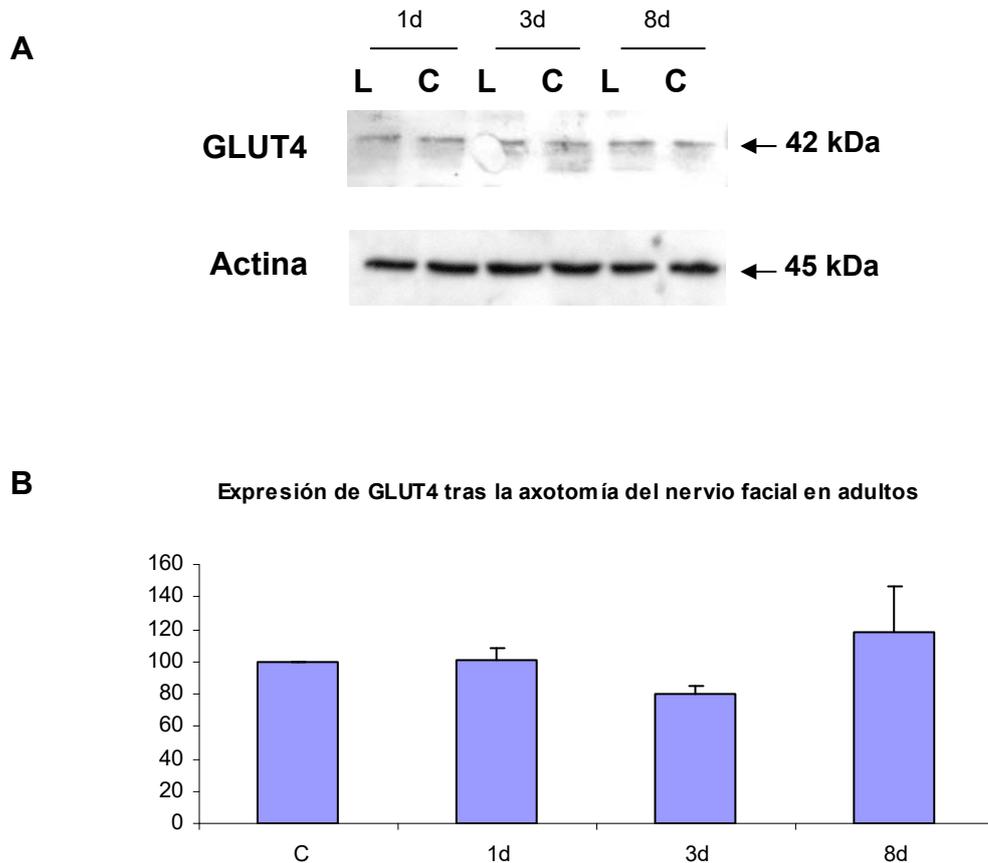


Figura IV.2.4: Estudio de la expresión de GLUT4 en el tronco del encéfalo de ratones adultos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT4 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT4 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT4 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT8

Por último, se estudió la expresión de la proteína GLUT8, observándose una banda de 42 kDa en cada una de los homogenizados de tronco del encéfalo. Los resultados no mostraron diferencias significativas de expresión de la proteína entre el lado lesionado y el control en ninguno de los casos (figura IV.2.5).

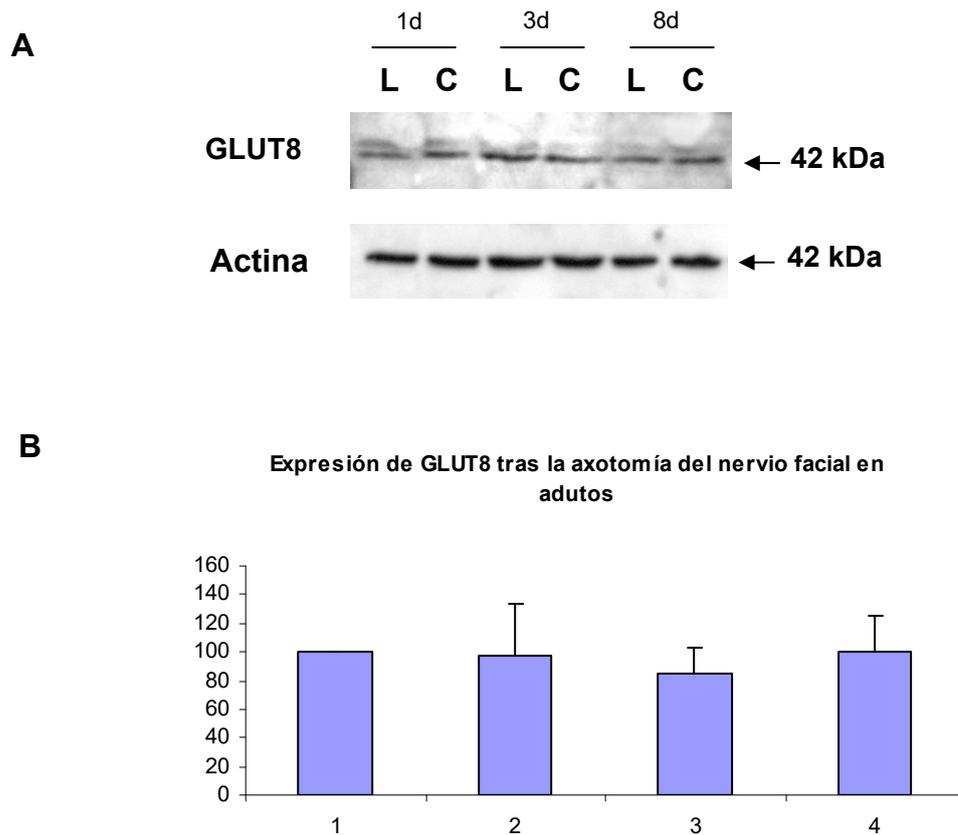


Figura IV.2.5: Estudio de la expresión de GLUT8 en el tronco del encéfalo de ratones adultos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT8 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT8 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT8 entre los grupos estudiados.

2.1.3. Estudio de los transportadores en el núcleo del facial mediante inmunohistoquímica

Los análisis de western blot no mostraban variaciones significativas en los niveles de expresión de los transportadores estudiados en respuesta a la lesión. No obstante, para realizar esos estudios fue necesario contar con un volumen de tejido suficiente, que excedía las dimensiones del núcleo del nervio facial, para poder obtener de esta manera suficiente cantidad de proteína. Este hecho podría enmascarar posibles variaciones en la expresión de los transportadores en la zona afectada por la axotomía, debido a un “efecto de dilución” producido al tener que utilizar más tejido del afectado por la lesión.

Para conocer los tipos celulares que expresaban los transportadores y si había variaciones en la localización en las neuronas lesionadas, se pasó a realizar un estudio inmunohistoquímico de los transportadores de glucosa en el núcleo del facial en los diferentes tiempos postlesionales antes indicados (1 día, 3 días y 8 días). Se añadió posteriormente un cuarto grupo de animales, que se sacrificaron a los 30 días de la axotomía, tiempo en que se ha producido una recuperación funcional del nervio dañado.

Tras poner a punto las técnicas inmunohistoquímicas, se comprobó que para ninguno de los transportadores analizados había diferencias apreciables en la inmunoreactividad detectada en los núcleos faciales del lado derecho (lados control) en los diferentes tiempos postlesionales, ni en comparación con los del núcleo facial correspondiente a animales sin lesionar, indicando que la lesión del nervio facial izquierdo no altera los niveles de expresión de los transportadores en el núcleo facial contralateral.

En primer lugar, se localizó el núcleo del facial en cada uno de los grupos mediante la tinción de cresil violeta. En las muestras del tronco del encéfalo de ratones sacrificados a las 24 horas tras la lesión no se detectaron diferencias entre el lado control y el lesionado (figura IV.2.6). Sin embargo, en los cortes pertenecientes al tercer día tras la operación se observaba como las motoneuronas del núcleo facial izquierdo presentaban una morfología diferente, con un aspecto alargado y de forma irregular (figura IV.2.6). Tales diferencias se siguieron manteniendo en el núcleo del facial izquierdo de ratones sacrificados el octavo día tras la operación (figura IV.2.6). En los animales sacrificados 1 mes tras la lesión, las motoneuronas del núcleo del

facial habían recuperado su aspecto normal, coincidiendo con una recuperación funcional, apreciable por el movimiento de las vibrisas del lado izquierdo (figura IV.2.6).

Inmunohistoquímica frente a GLUT1

La expresión de GLUT1 se localizó en el endotelio vascular, tanto en el cerebelo (figura IV.2.7) como en el tronco del encéfalo. En el núcleo del facial se detectó igualmente marcaje en el endotelio vascular. Al analizar el efecto de la axotomía del nervio en la presencia de este transportador no se observaron variaciones ni de niveles de expresión ni de localización en ninguno de los tiempos postlesionales analizados (figura IV.2.8 y figura IV.2.9).

Inmunohistoquímica frente a GLUT3

Las secciones del encéfalo estudiadas nos permitieron analizar la expresión del transportador en el tronco del encéfalo y en el cerebelo y en ambas áreas se observó una intensa GLUT3-IR en el neuropilo. En el cerebelo se detectó un marcaje heterogéneo en la capa granular y un marcaje intenso y homogéneo en la capa molecular. Por el contrario, no se observó inmunoreactividad en el cuerpo de las células de Purkinje (figura IV.2.7).

En el tronco del encéfalo se observó igualmente marcaje por todo el neuropilo sin apreciarse localización concreta en núcleos determinados. No se apreció expresión en el plexo coroideo. En concreto, en el núcleo del facial se apreció GLUT3-IR en el neuropilo, pero no en el soma de las motoneuronas. Al estudiar el efecto de la lesión del nervio en la expresión de este transportador no se observaron diferencias ni de niveles de expresión ni de localización en ninguno de los tiempos postlesionales analizados (figura IV.2.10 y figura IV.2.11).

Inmunohistoquímica frente a GLUT4

La expresión de GLUT4 se localizó fundamentalmente en el cuerpo de las neuronas, aunque también en las prolongaciones había expresión del transportador. En el cerebelo, el citoplasma de las células de Purkinje mostraba altos niveles de expresión, pero también se detectó GLUT4-IR en algunas células de la capa granular y

la capa molecular aparecía marcada con menos intensidad y de forma difusa (figura IV.2.12).

En el tronco del encéfalo se observó un marcaje intenso en el cuerpo de las neuronas. El marcaje, aparentemente muestra un aspecto granular, sugiriendo que el transportador se podría almacenar en vesículas. También se detectó IR en el plexo coroideo.

En el núcleo del facial se observaba un marcaje intenso de aspecto granular en el citoplasma de, aparentemente, todas las motoneuronas. La lesión del nervio, sin embargo no produjo alteraciones en los niveles de expresión ni en la localización del mismo, que pudieran ser apreciables por las técnicas utilizadas, en ninguno de los tiempos postlesionales analizados (figura IV.2.13 y figura IV.2.14).

Inmunohistoquímica frente a GLUT8

El inmunomarcaje frente a GLUT8 en el tronco del encéfalo y cerebelo recordaba en gran medida al descrito para GLUT4 aunque con menor intensidad.

Se detectó GLUT8-IR en el citoplasma de las células de Purkinje y en algunas células de la capa granular del cerebelo, así como, de manera leve, en la capa molecular (figura IV.2.12).

En el núcleo del facial se apreció marcaje frente a GLUT8 en el citoplasma de las motoneuronas, con intensidad menor a la de GLUT4. Sin embargo, a diferencia de lo observado con el anticuerpo anti-GLUT4, sí se apreciaron variaciones en los niveles de expresión en respuesta a la axotomía. Mientras que a las 24 horas tras la lesión los niveles apreciados en el lado lesionado eran similares a los del control, a los 3 días tras la lesión se detectó un aumento del marcaje en el citoplasma de las neuronas lesionadas frente a las del lado control, incremento que continuaba a los 8 días y que a los 30 desaparecía, volviendo a los niveles normales, indistinguibles de los del lado contralateral (figura IV.2.15 y figura IV.2.16).

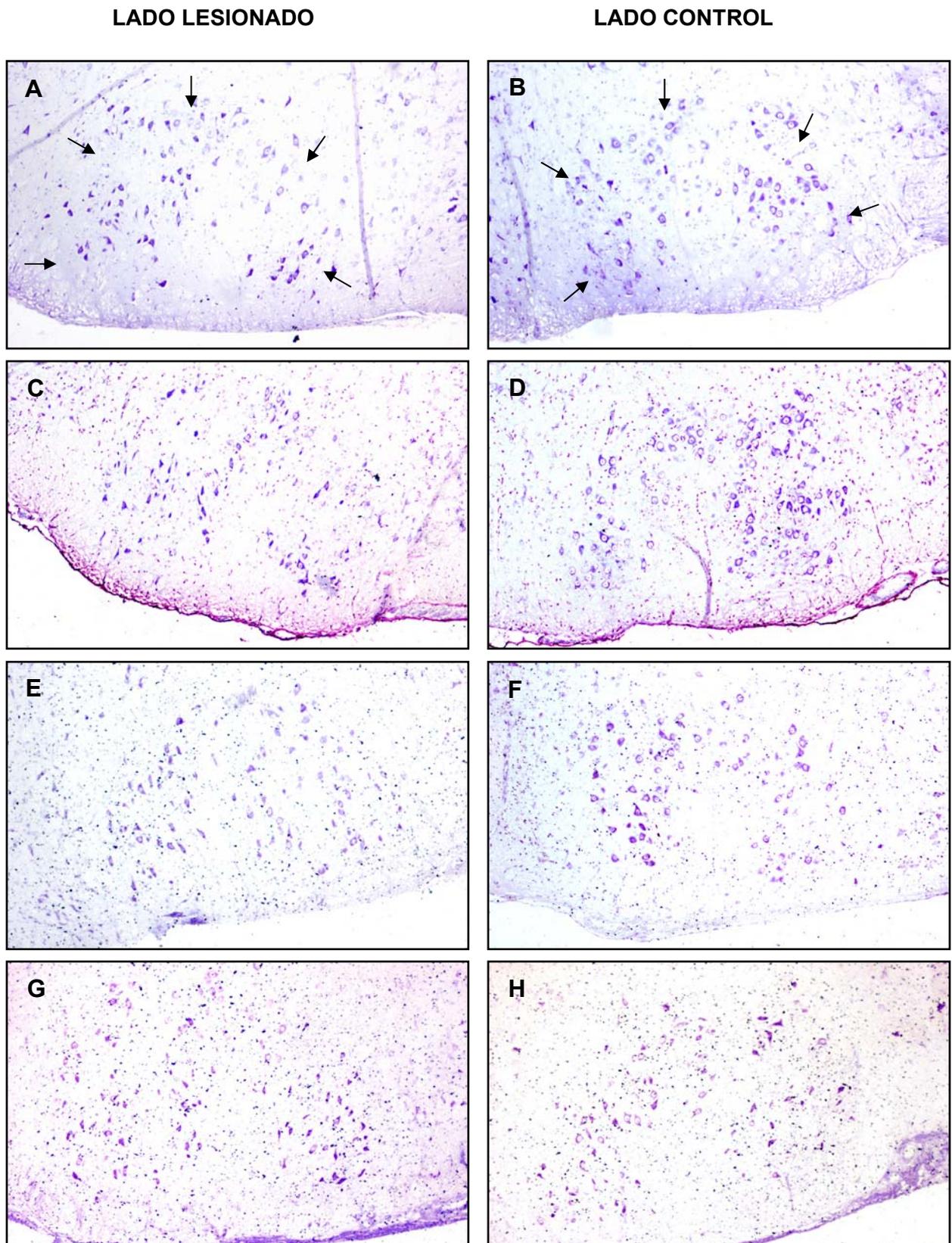


Figura IV.2.6.: Secciones del núcleo del facial (señalado mediante flechas en las primeras imágenes) del lado lesionado (A, C, E y G) y del lado control (B, D, F y H) de animales adultos sacrificados a las 24 horas (A y B), a los 3 días (C y D), a los 8 días (E y F) y al mes (G y H) tras la axotomía, teñidas con cresil violeta.

Magnificación: 100X

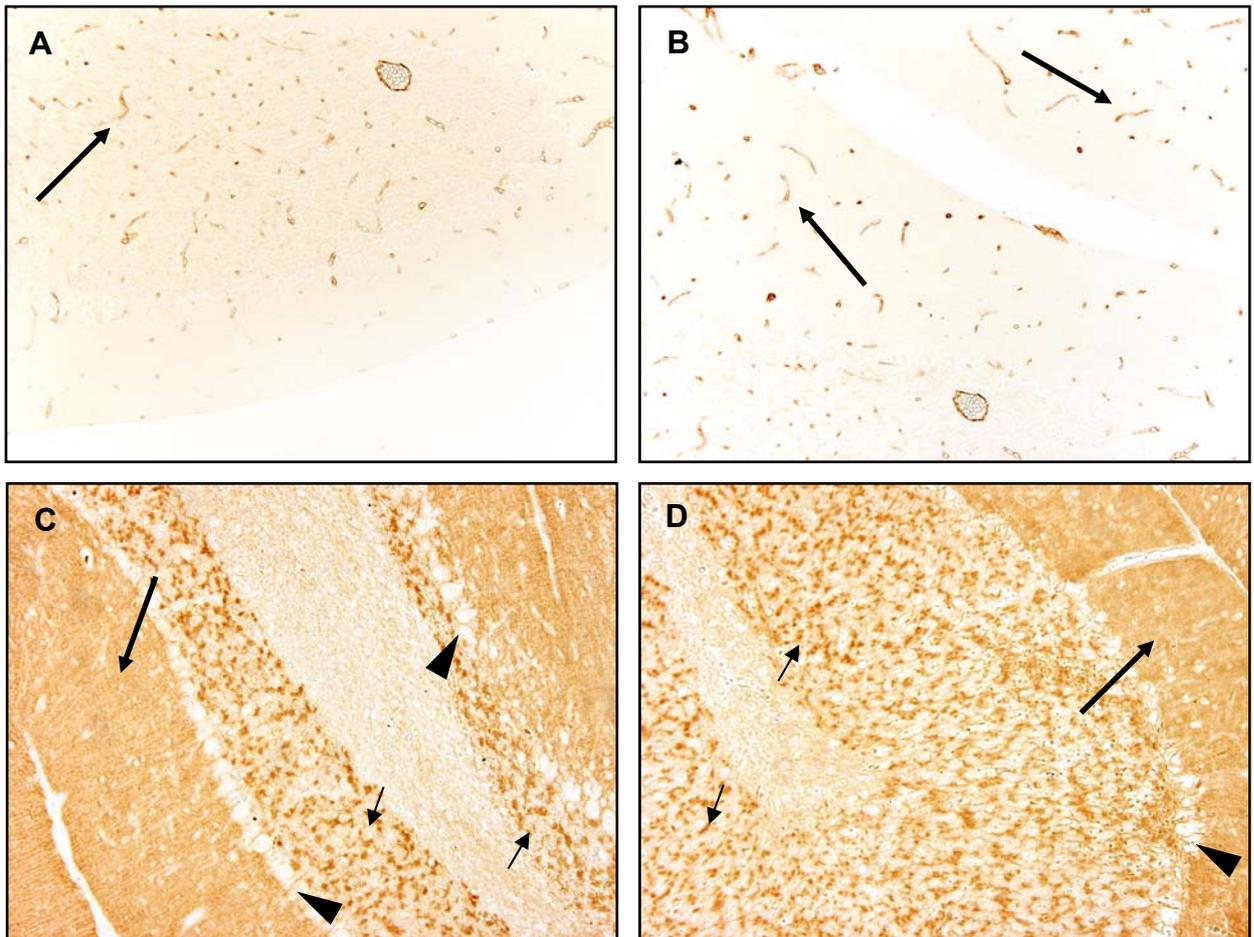


Figura IV.2.7: Secciones de cerebelo de ratón adulto incubadas con el anticuerpo anti-GLUT1 (A y B) y anti-GLUT3 (C y D).

A y B- Se aprecia marcaje frente a GLUT1 en el endotelio vascular del cerebelo (flecha).

C y D- En los cortes incubados con el anticuerpo anti-GLUT3 se observa IR de forma intensa y homogénea en la capa molecular (flecha grande) y de forma heterogénea en la capa granular (flecha pequeña); sin embargo no se detecta marcaje en el cuerpo de las células de Purkinje (punta de flecha).
Magnificación: 200X.

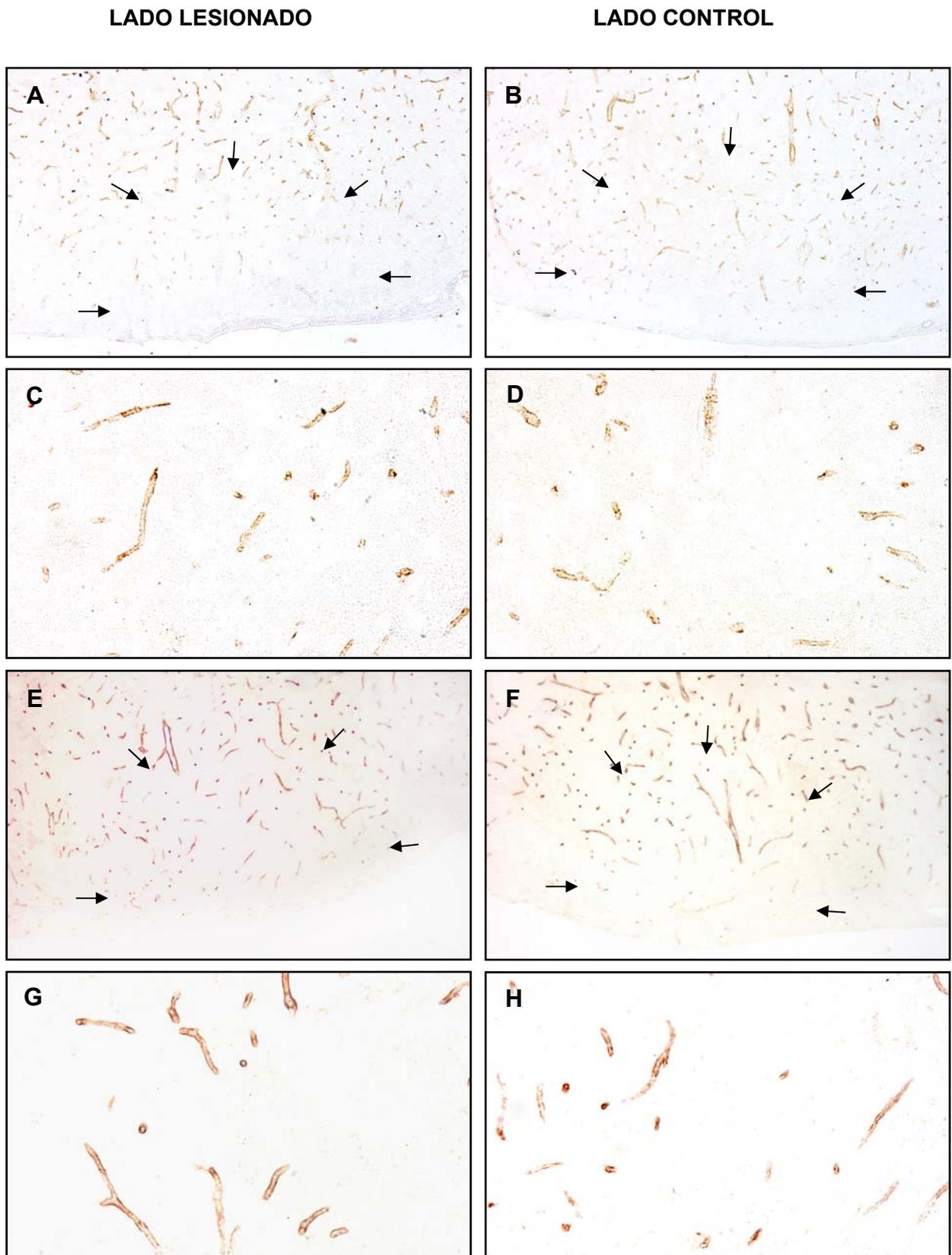


Figura IV.2.8: Inmunodetección de GLUT1 en el núcleo del facial (señalado mediante flechas) de ratones adultos sacrificados a las 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la operación.

A, C, E y G- lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

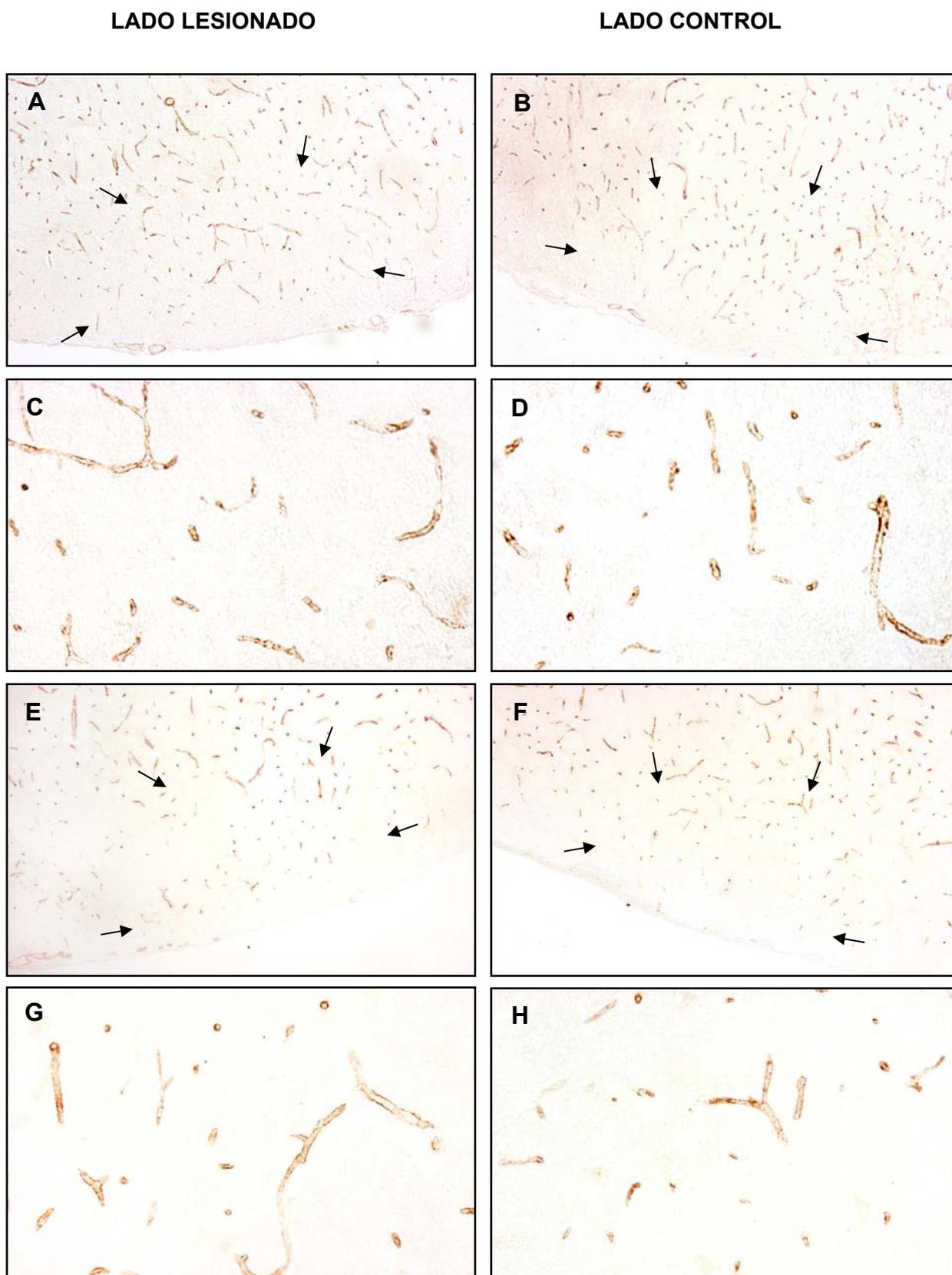


Figura IV.2.9: Inmunodetección de GLUT1 en el núcleo del facial (señalado mediante flechas) de ratones sacrificados a los 8 días (A, B, C y D) y al mes (E, F, G y H) tras la axotomía. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

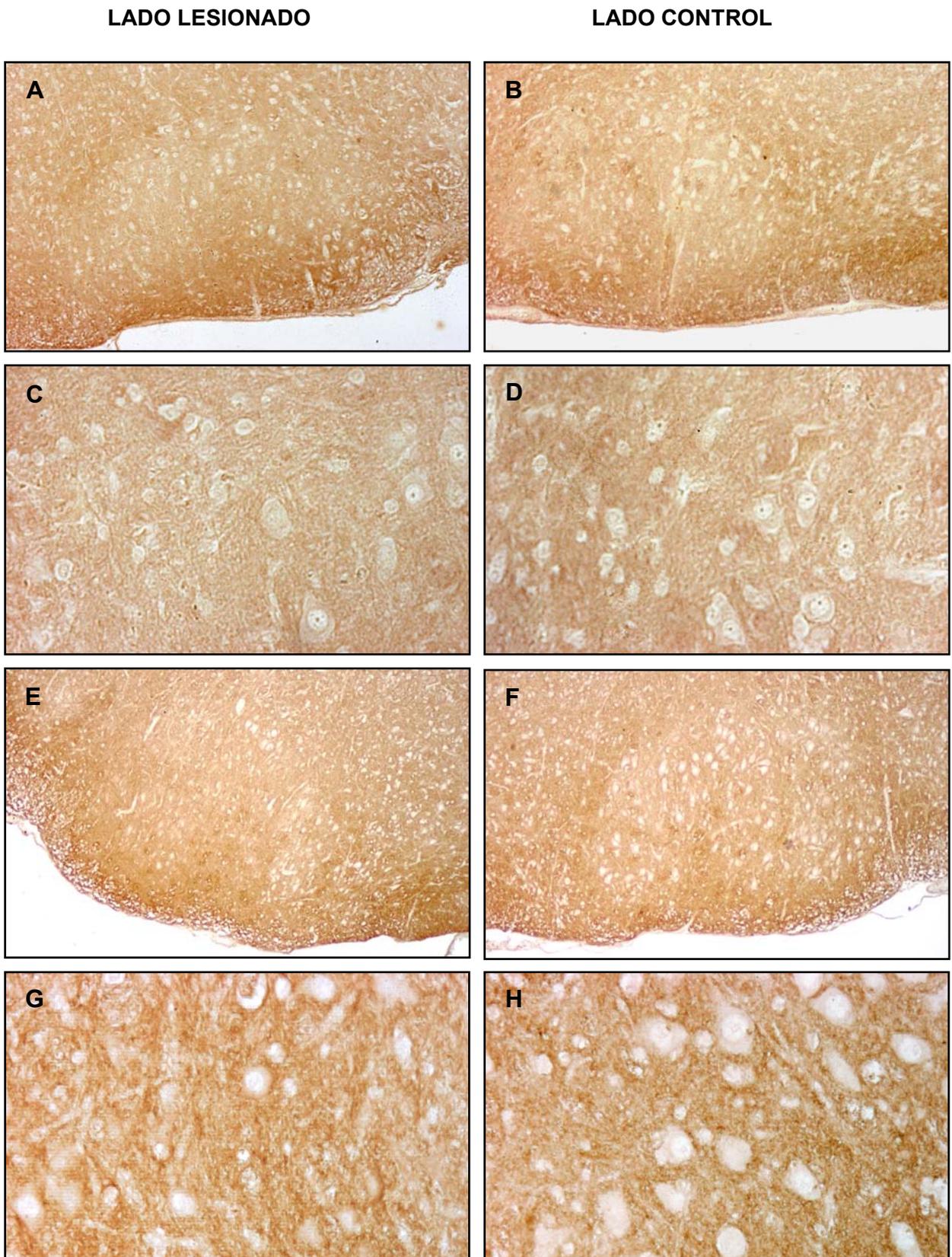


Figura IV.2.10: Inmunodetección de GLUT3 en el núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la axotomía.

A, C, E y G- lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

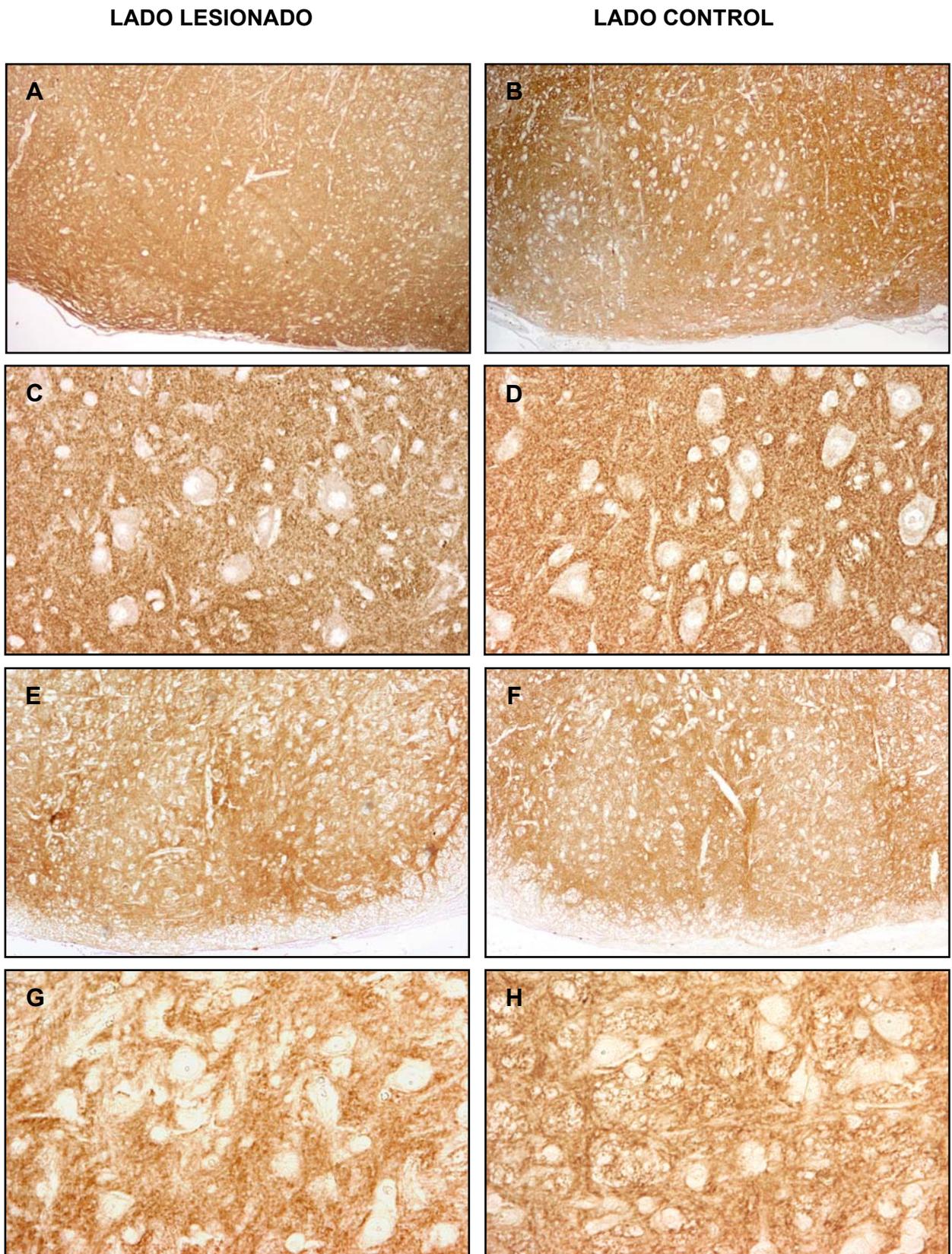


Figura IV.2.11: Inmunodetección de GLUT3 en secciones del núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 8 días (A, B, C y D) y 1 mes (E, F, G y H) tras la axotomía. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

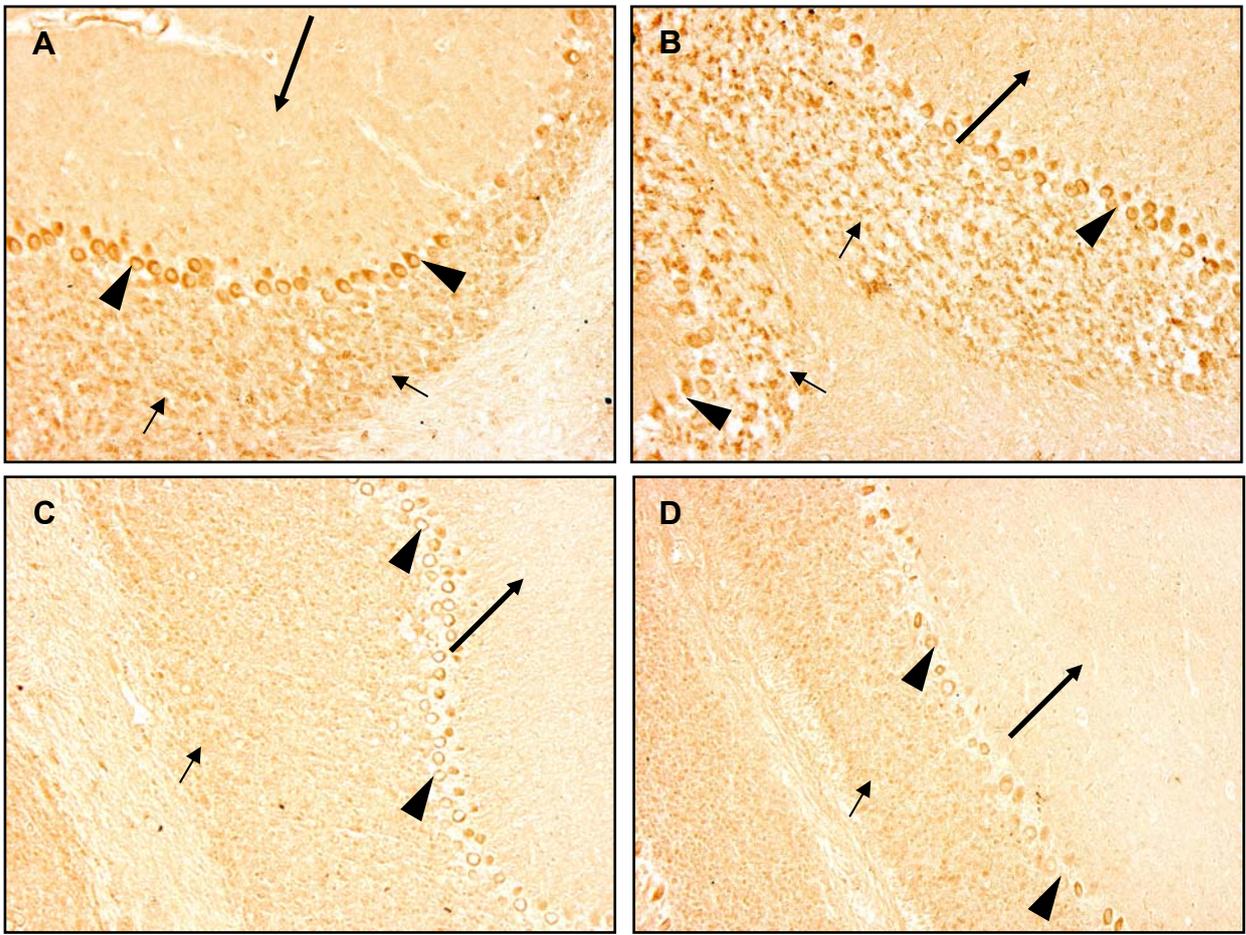


Figura IV.2.13: Inmunodetección de GLUT4 (A y B) y GLUT8 (C y D) en cortes de cerebelo de ratón adulto.

A y B- Secciones incubadas con el anticuerpo anti-GLUT4 en las cuales se observa un marcaje intenso en el cuerpo de las células de Purkinje (punta de flecha) y de forma heterogénea en la capa granular (flecha pequeña). También se observa un marcaje más débil y difuso en la capa molecular (flecha grande).

C y D- Se aprecia GLUT8-IR en el citoplasma de las células de Purkinje (punta de flecha), de forma heterogénea en la capa granular (flecha pequeña) y de manera más débil y difusa en la capa molecular (flecha grande).

Magnificación: 200X.

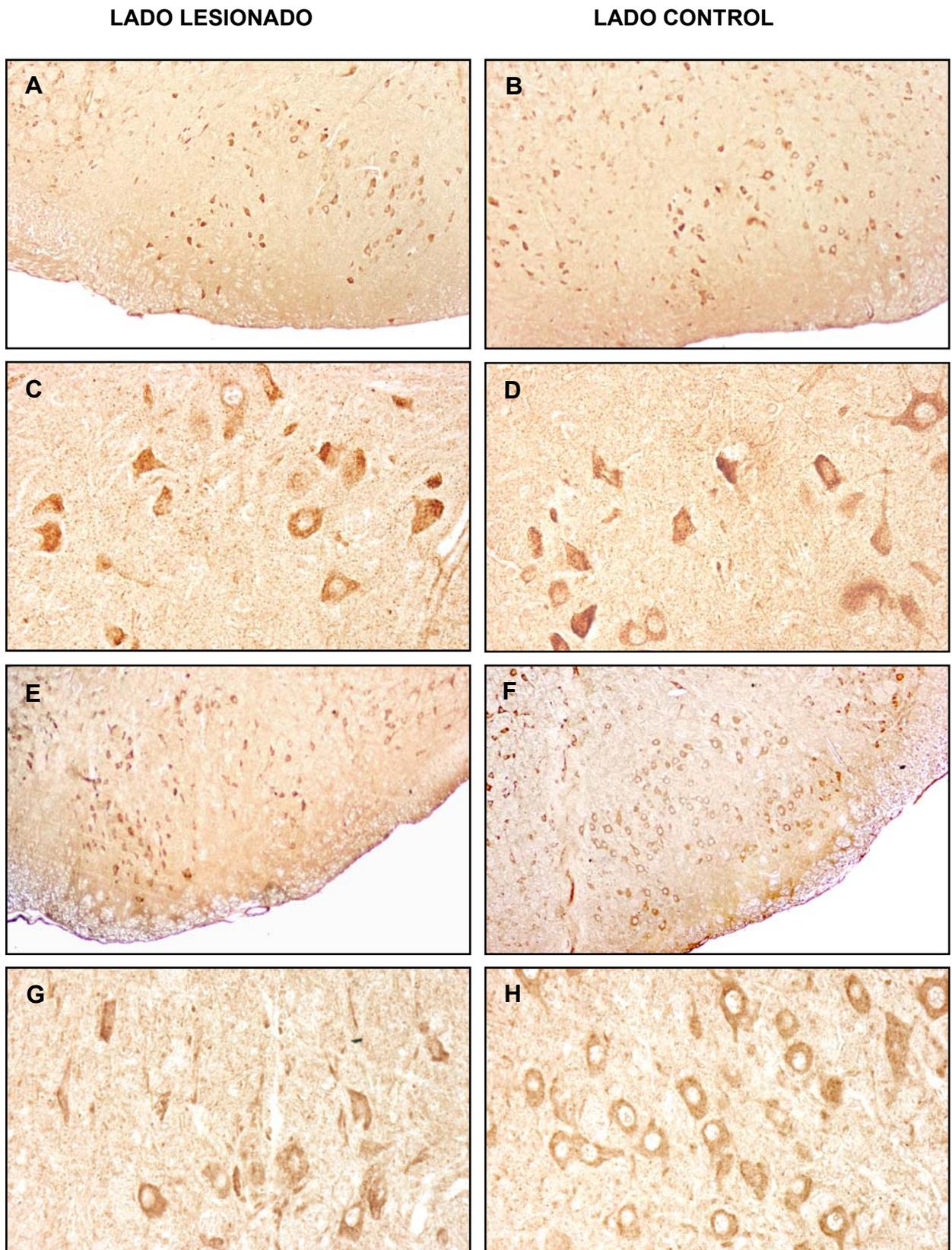


Figura IV.2.13: Inmunodetección de GLUT4 en secciones del núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) post-lesión. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

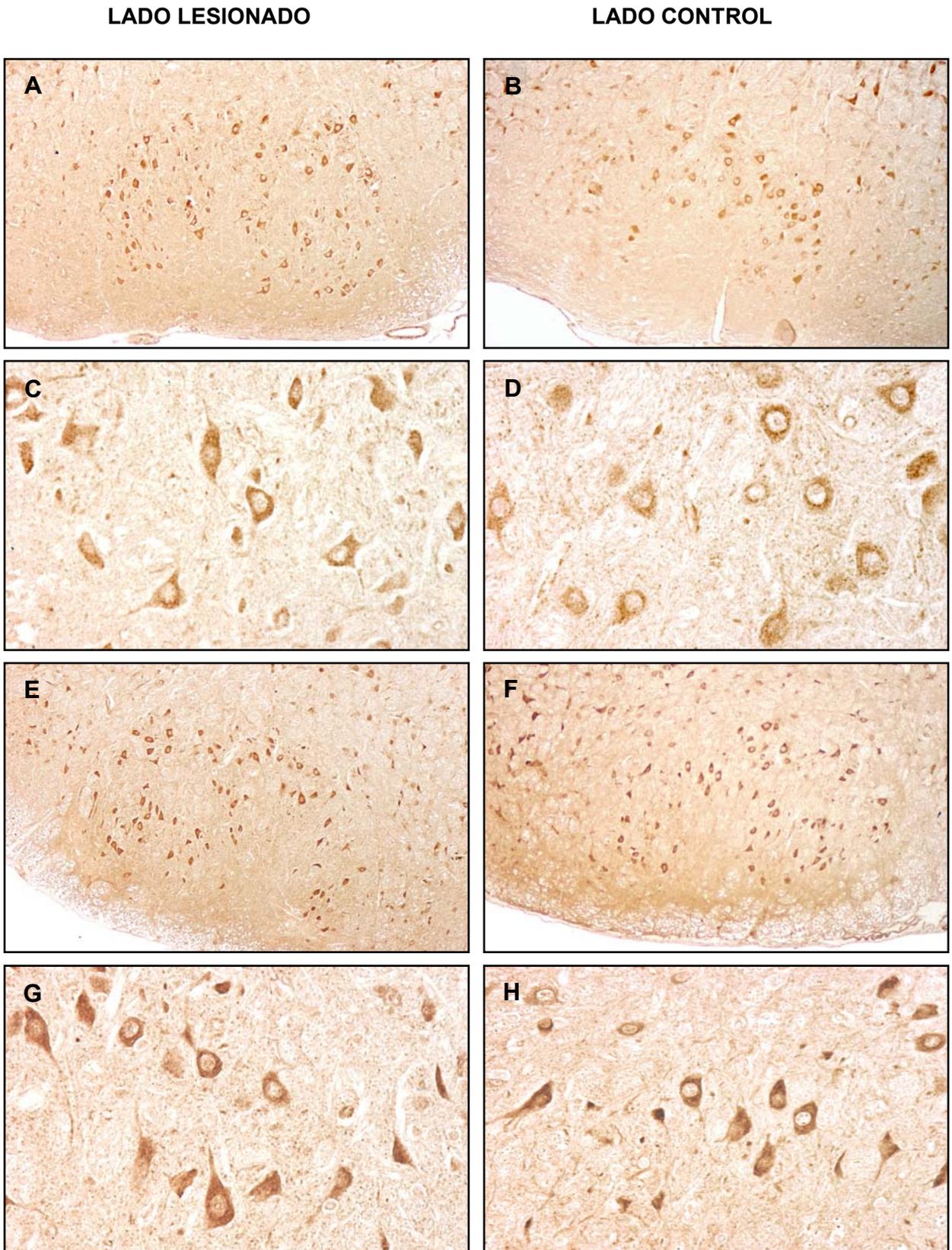


Figura IV.2.14: Inmunodetección de GLUT4 en secciones del núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 8 días (A, B, C y D) y 1 mes (E, F, G y H) tras la axotomía. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

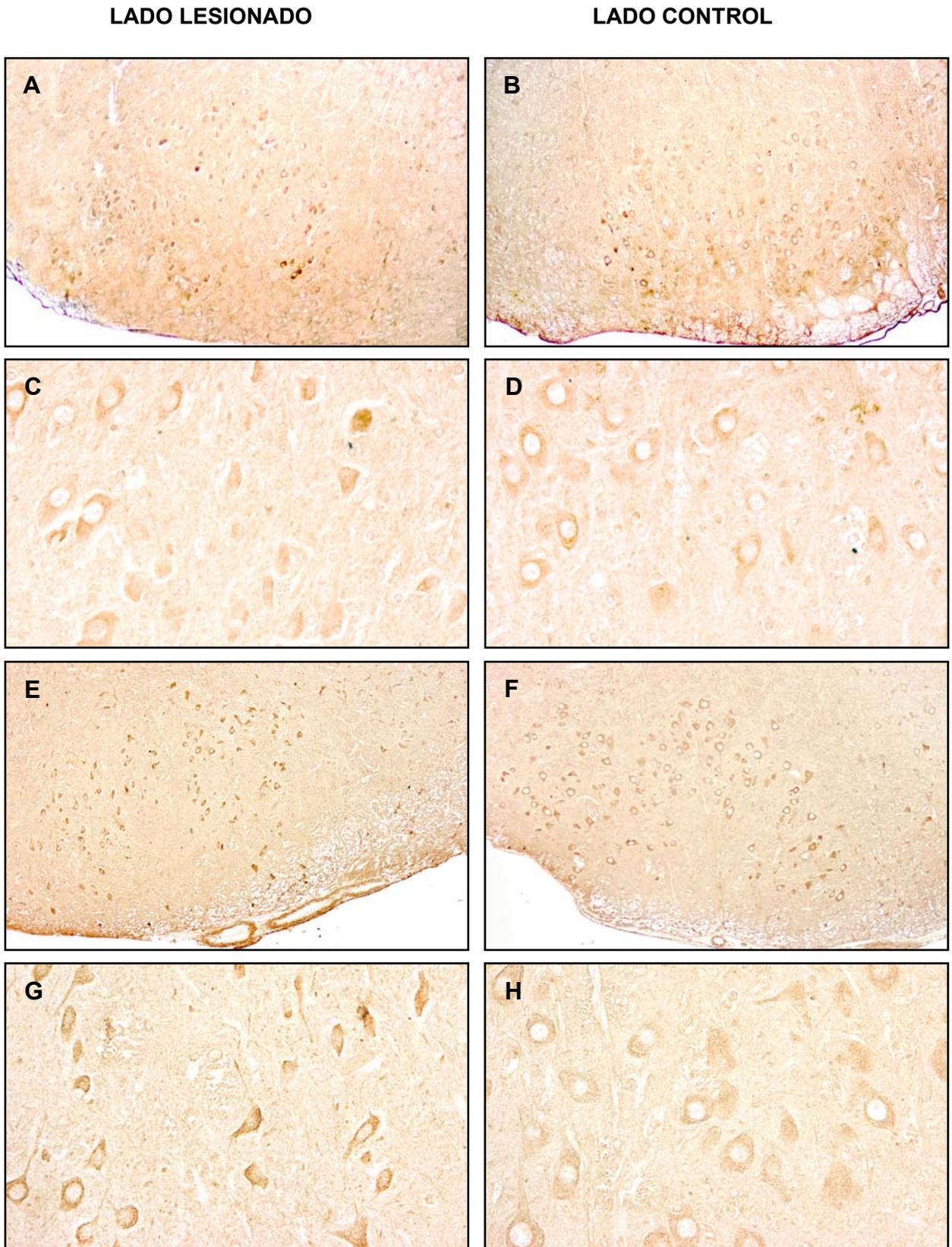


Figura IV.2.15: Cortes del núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la axotomía incubados con el anticuerpo anti-GLUT8. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. Un aumento de GLUT8- IR es apreciable a los 3 días tras la lesión (E, G). Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

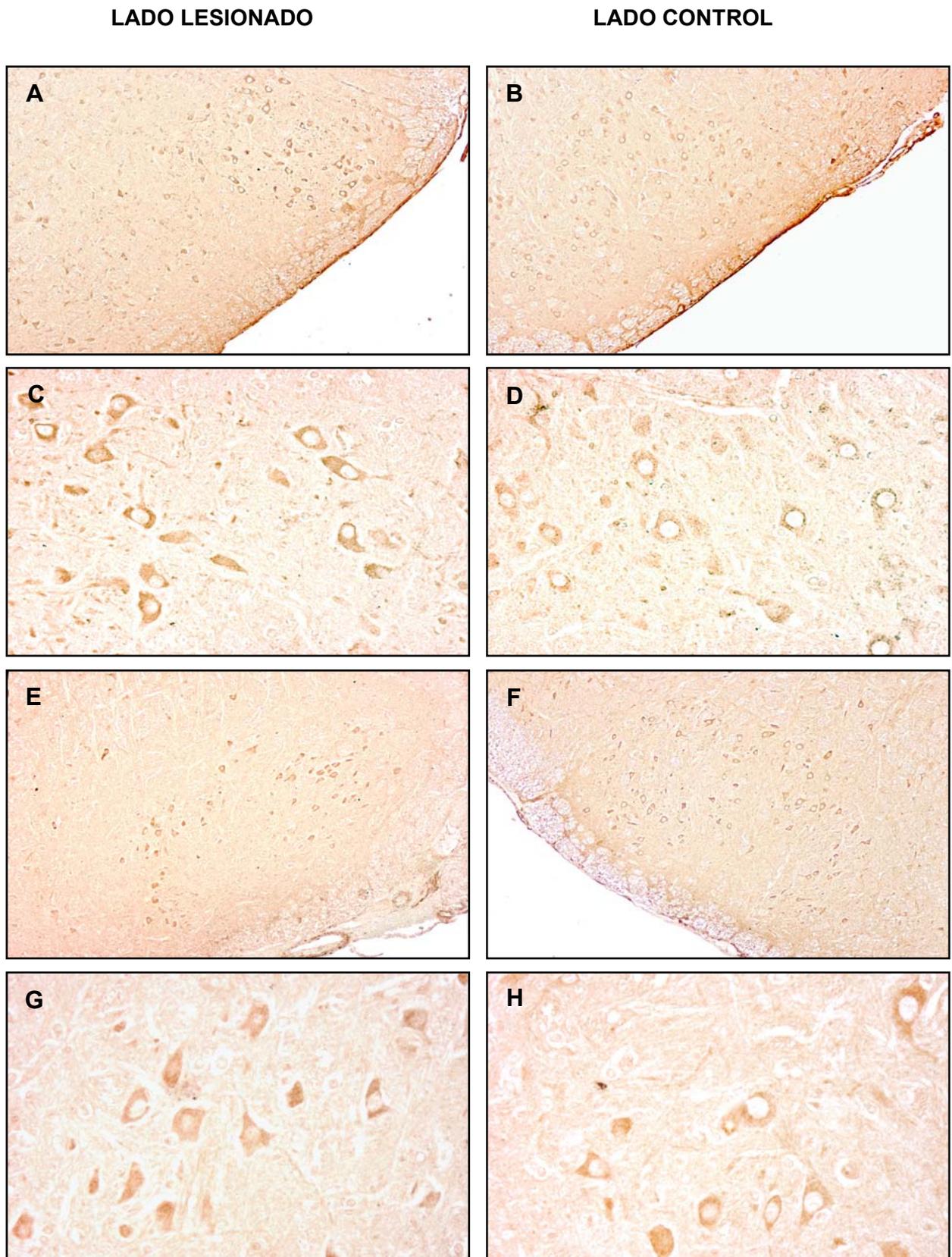


Figura IV.2.16: Inmunohistoquímica de GLUT8 en secciones del núcleo del facial de ratones adultos sacrificados 8 días (A, B, C y D) y 1 mes (E, F, G y H) tras la lesión.

A, C, E y G- lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. El incremento del marcaje frente a GLUT8 apreciado a los 3 días tras la lesión continúa observándose a los 8 días (A, C). Al mes tras la axotomía los niveles de GLUT8 son similares al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

2.2. Estudio de la expresión de los transportadores en neonatos

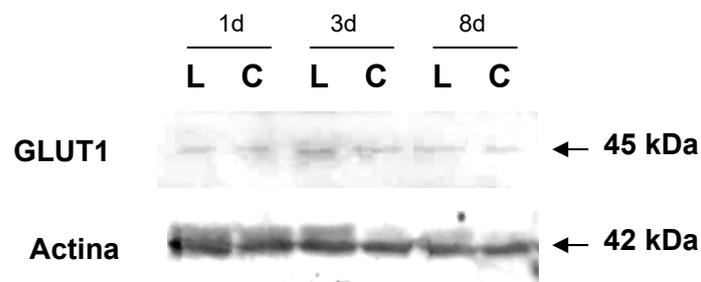
2.2.1. Estudio de los transportadores en el tronco del encéfalo mediante western blot

A continuación, se estudió la expresión de los transportadores en ratones recién nacidos tras la axotomía del nervio facial. Los ratones se operaron a los 3 días de edad y se sacrificaron a las 24 horas, a los 3 y a los 8 días tras la lesión.

Expresión de GLUT1

Los resultados obtenidos muestran una banda de aproximadamente 45 kDa en todos los homogenizados de tronco del encéfalo. No se observaron variaciones en la intensidad de la banda entre el lado lesionado y el control en ninguno de los tres grupos estudiados (figura IV.2.17).

A



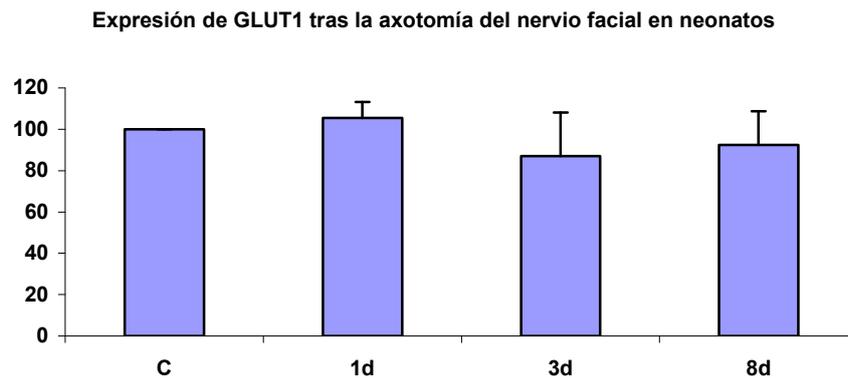
B

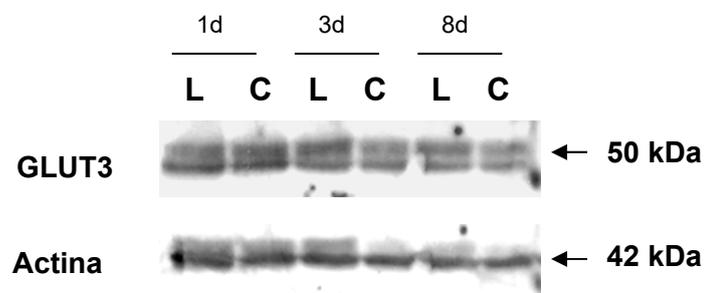
Figura IV.2.17: Estudio de la expresión de GLUT1 en el tronco del encéfalo de ratones neonatos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT1 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT1 (unidades arbitrarias en respecto al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT1 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT3

Los resultados obtenidos muestran una banda de aproximadamente 50 kDa en todas las muestras de tronco del encéfalo. No se observaron variaciones en la intensidad de la banda entre el lado lesionado y el control en ninguno de los tres grupos estudiados (figura IV.2.18).

A

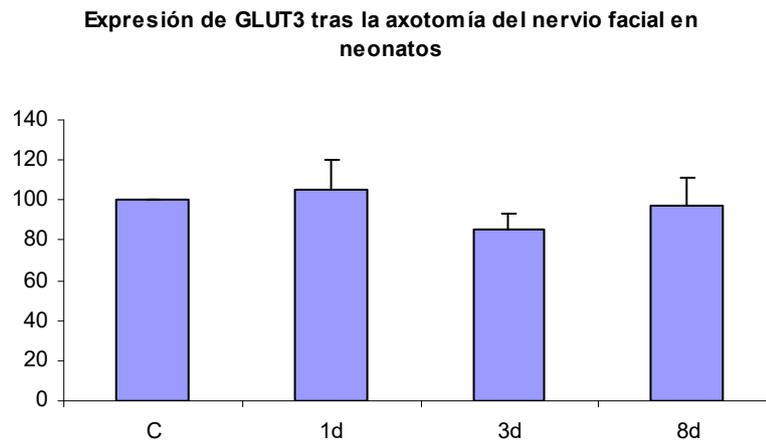
B

Figura IV.2.18: Estudio de la expresión de GLUT3 en el tronco del encéfalo de ratones neonatos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT3 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT3 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT3 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT4

Como se puede apreciar en la siguiente figura, el anticuerpo anti-GLUT4 reconocía una banda de 45 kDa en cada una de las calles de la membrana de nitrocelulosa. Entre los grupos estudiados no se detectaron variaciones significativas (figura IV.2.19).

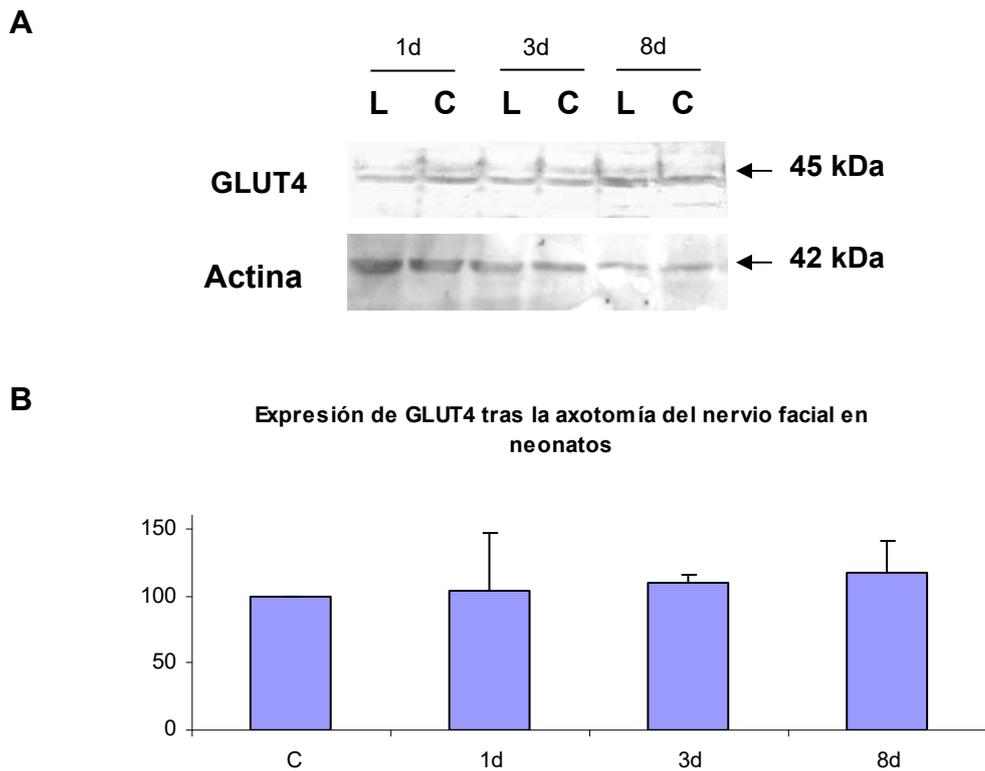


Figura IV.2.19: Estudio de la expresión de GLUT4 en el tronco del encéfalo de ratones neonatos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT4 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT4 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT4 entre los grupos estudiados.

Expresión de GLUT8

Finalmente, se estudió la presencia de la proteína GLUT8 en el tronco del encéfalo de ratones neonatos y su posible variación de expresión tras realizar una axotomía completa del núcleo del facial. Los resultados obtenidos mostraron una banda de aproximadamente 42 KDa en todas las muestras, sin observarse variaciones aparentes de intensidad entre ellos (figura IV.2.20).

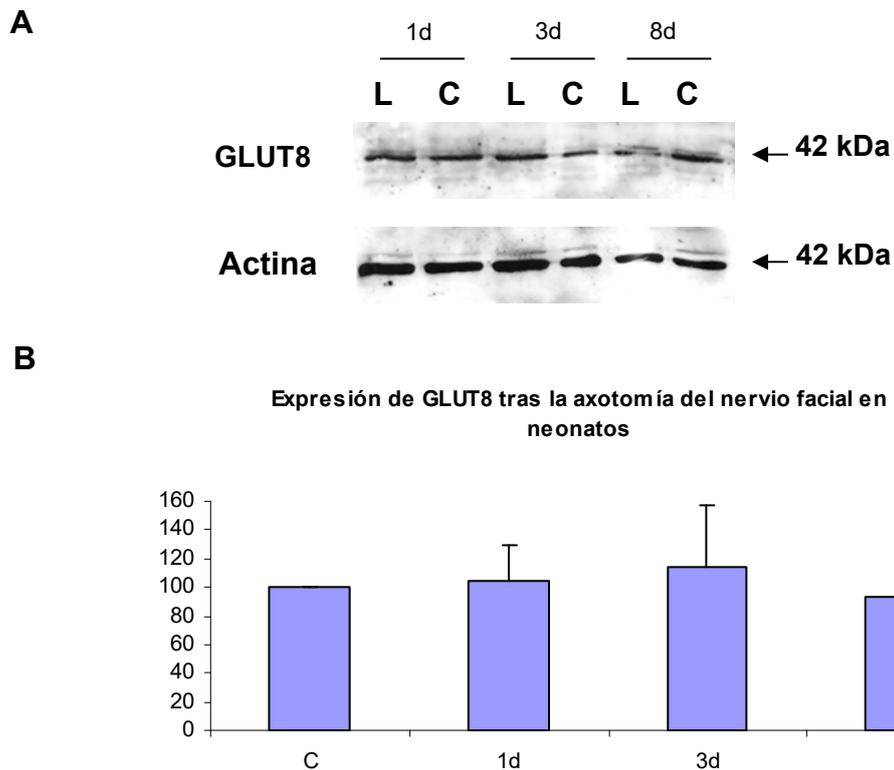


Figura IV.2.20: Estudio de la expresión de GLUT8 en el tronco del encéfalo de ratones neonatos tras la axotomía del nervio facial.

A- Western blot representativo de la expresión de GLUT8 entre el lado control (C) y el lado lesionado (L) en animales sacrificados 1 día (1d), 3 días (3d) y 8 días (8d) tras la lesión. La detección de la actina se empleó como control interno.

B- El histograma representa la cuantificación densitométrica de GLUT8 (unidades arbitrarias en relación al control + desviación estándar). No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de GLUT8 entre los grupos estudiados.

2.2.2. Localización de los transportadores de membrana mediante inmunohistoquímica

Para conocer qué tipos celulares expresaban los transportadores de glucosa y sus posibles variaciones entre el lado lesionado y el control, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en el tronco del encéfalo de ratones neonatos axotomizados.

Como se había realizado en los animales adultos, se localizó el núcleo del facial en ambos lados del tronco del encéfalo mediante la tinción de cresil violeta. Se observó en el lado lesionado una reducción aparente en el número de motoneuronas a partir del tercer día tras la operación, reducción que era mayor al octavo día tras la

axotomía, tiempo en el que en el lado izquierdo prácticamente no se observaban motoneuronas debido a la elevada muerte celular (figura IV.2.21).

Inmunohistoquímica frente a GLUT1

Al incubar las muestras con el anticuerpo anti-GLUT1 se detectó inmunoreactividad en el endotelio vascular del cerebelo (figura IV.2.22) y del tronco del encéfalo, similar a lo descrito previamente en adulto.

Respecto al núcleo del facial no se apreciaron diferencias entre el lado lesionado y el control en ninguno de los tres grupos estudiados (figura IV.2.23 y figura IV.2.24).

Inmunohistoquímica frente a GLUT3

La IR frente a GLUT3 en el encéfalo de los animales neonatos se localizaba en el neuropilo, de forma similar a lo observado en el ratón adulto, aunque algunas diferencias fueron apreciables debido al diverso grado de desarrollo del cerebelo. En este órgano se apreciaba cómo la GLUT3-IR dibujaba el desarrollo de la capa molecular, de manera que, a diferencia de lo que ocurría en el adulto, la parte más externa del cerebelo, correspondiente en estas fases a la capa granular externa, no estaba marcada. A medida que esta capa disminuía de espesor por la migración de sus células al interior del cerebelo para formar la capa granular interna, y aumentaba el tamaño de la capa molecular, aumentaba la extensión de la zona que expresaba GLUT3 (figura IV.2.22).

En el núcleo del facial la distribución de la GLUT3-IR en el neuropilo de las motoneuronas, era similar al adulto, y tampoco se observaron diferencias en la expresión del transportador en ninguno de los tres tiempos postlesionales estudiados (figura IV.2.25 y figura IV.2.26).

Inmunohistoquímica frente a GLUT4

Al incubar los cortes con el anticuerpo anti-GLUT4 se apreció un marcaje similar al observado en animales adultos, aunque con intensidad menor. La única

diferencia al igual que en el estudio anterior se apreció en el cerebelo, en el cual se detectó una intensa inmunoreactividad en algunas células de la capa granular, tanto interna como externa, y un marcaje más débil y difuso en la capa molecular y en las células de Purkinje (figura IV.2.27).

De manera similar al adulto, las motoneuronas faciales expresaban GLUT4 en el soma, aunque con menor intensidad. Las motoneuronas faciales que se identificaban en el lado lesionado continuaban expresando GLUT4 sin variación aparente en la intensidad con respecto al lado control en ninguno de los tiempos postlesionales estudiados (figura IV.2.28 y figura IV.2.29).

Inmunohistoquímica frente a GLUT8

También GLUT8 se localizaba en el animal recién nacido de forma similar a lo descrito en el adulto, tanto en cerebelo (figura IV.2.27) como en el tronco del encéfalo. Se apreció marcaje frente a GLUT8 en los mismos tipos celulares que en ratón adulto. Sin embargo, a diferencia de lo apreciado tras la lesión del nervio facial en ratones adultos, la axotomía del nervio en recién nacidos no provocaba variación en los niveles de GLUT8-IR en el lado control y el lesionado en ninguno de los tres tiempos postlesionales analizados (figura IV.30 y IV.2.31). De manera similar a GLUT4, GLUT8 se expresaba en las motoneuronas faciales que se observaban en el lado lesionado. Los niveles que se apreciaban en estas células eran similares a los del lado control.

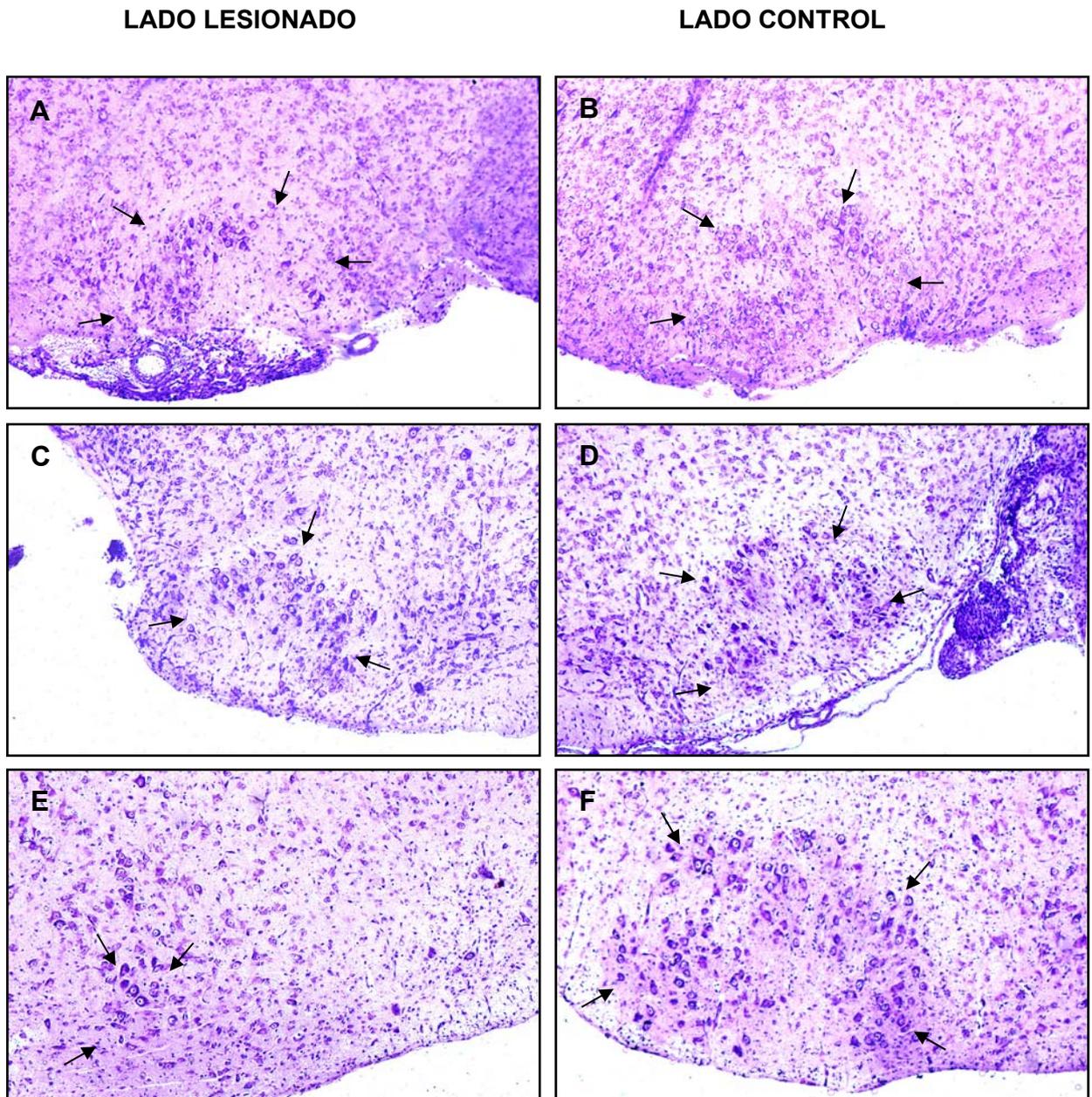


Figura IV.2.21.: Secciones del núcleo del facial (señalado mediante flechas) del lado lesionado (A, C y D) y del lado control (B, D y F) de ratones neonatos sacrificados a las 24 horas (A y B), a los 3 días (C y D) y a los 8 días (E y F) tras la axotomía, teñidas con cresil violeta. Obsérvese la reducción en el número de motoneuronas el día 8 tras la lesión.
Magnificación: 100X

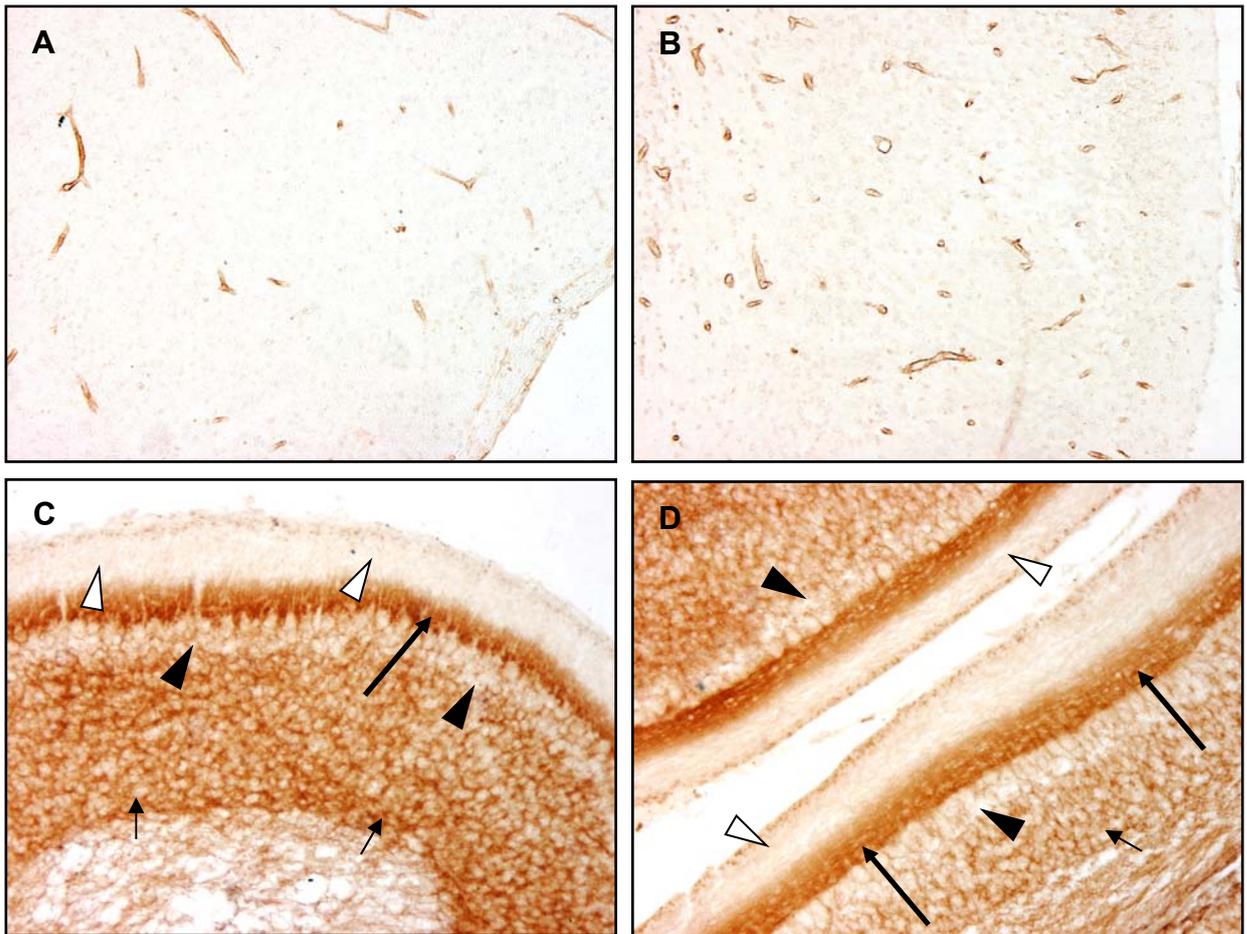


Figura IV.2.22: Secciones de cerebelo de ratón neonato incubadas con los anticuerpos anti-GLUT1 (A y B) y anti-GLUT3 (C y D).

A y B- Se aprecia marcaje frente a GLUT1 en el endotelio vascular del cerebelo, similar al observado en animales adultos.

C y D- En los cortes incubados con el anticuerpo anti-GLUT3 se observa un marcaje homogéneo e intenso en la capa molecular en formación (flecha grande) y en la capa granular interna de forma heterogénea (flecha pequeña). Por el contrario, no se aprecia IR ni en el soma de las células de Purkinje (punta de flecha negra) ni en la capa granular externa (punta de flecha blanca).

Magnificación: 200X.

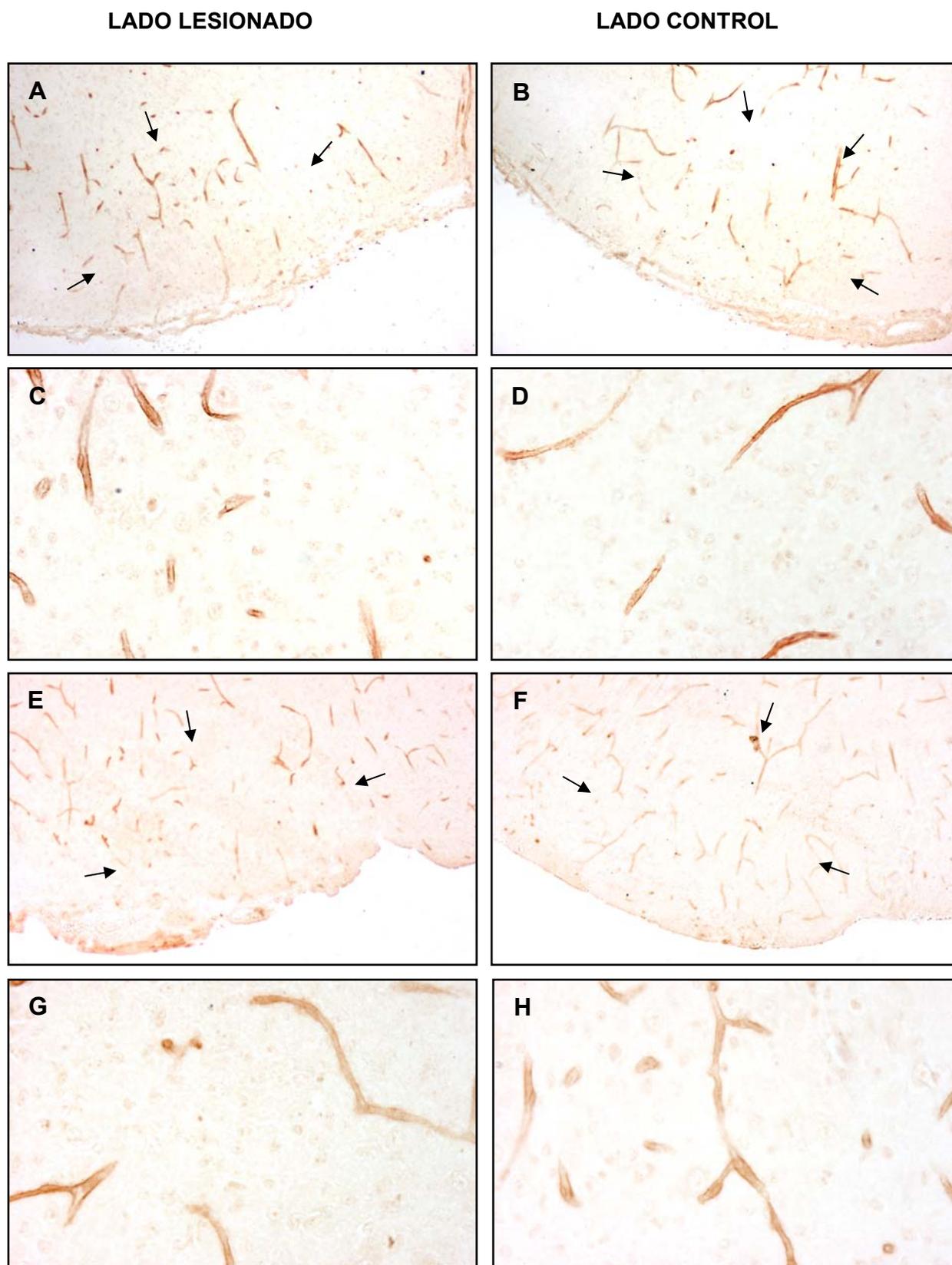


Figura IV.2.23: Inmunodetección de GLUT1 en el núcleo del facial (señalado mediante flechas) de ratones neonatos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la operación. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

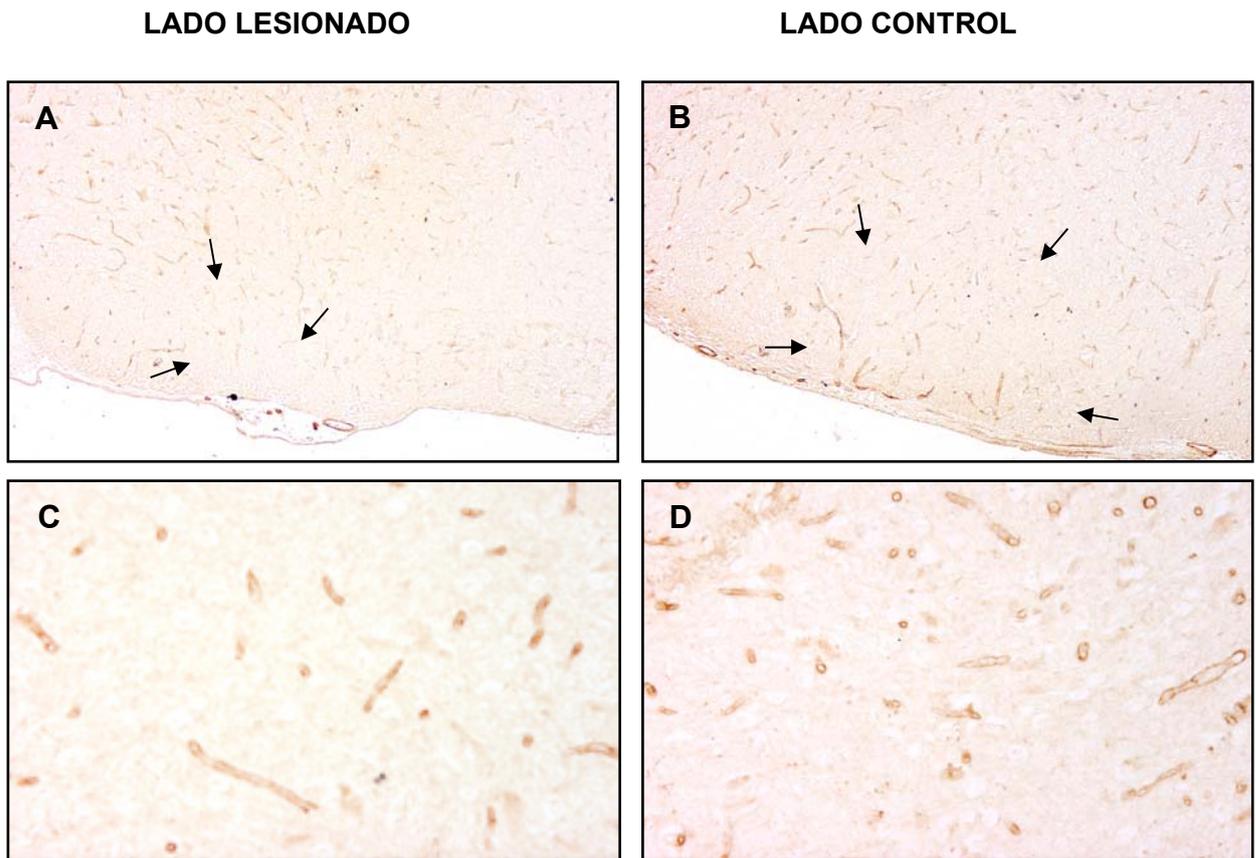


Figura IV.2.24: Inmunodetección de GLUT1 en el núcleo del facial (señalado mediante flechas) de ratones neonatos sacrificados 8 días tras la operación. **A y C-** lado lesionado. **B y D-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A y B 200X. C y D 400X.

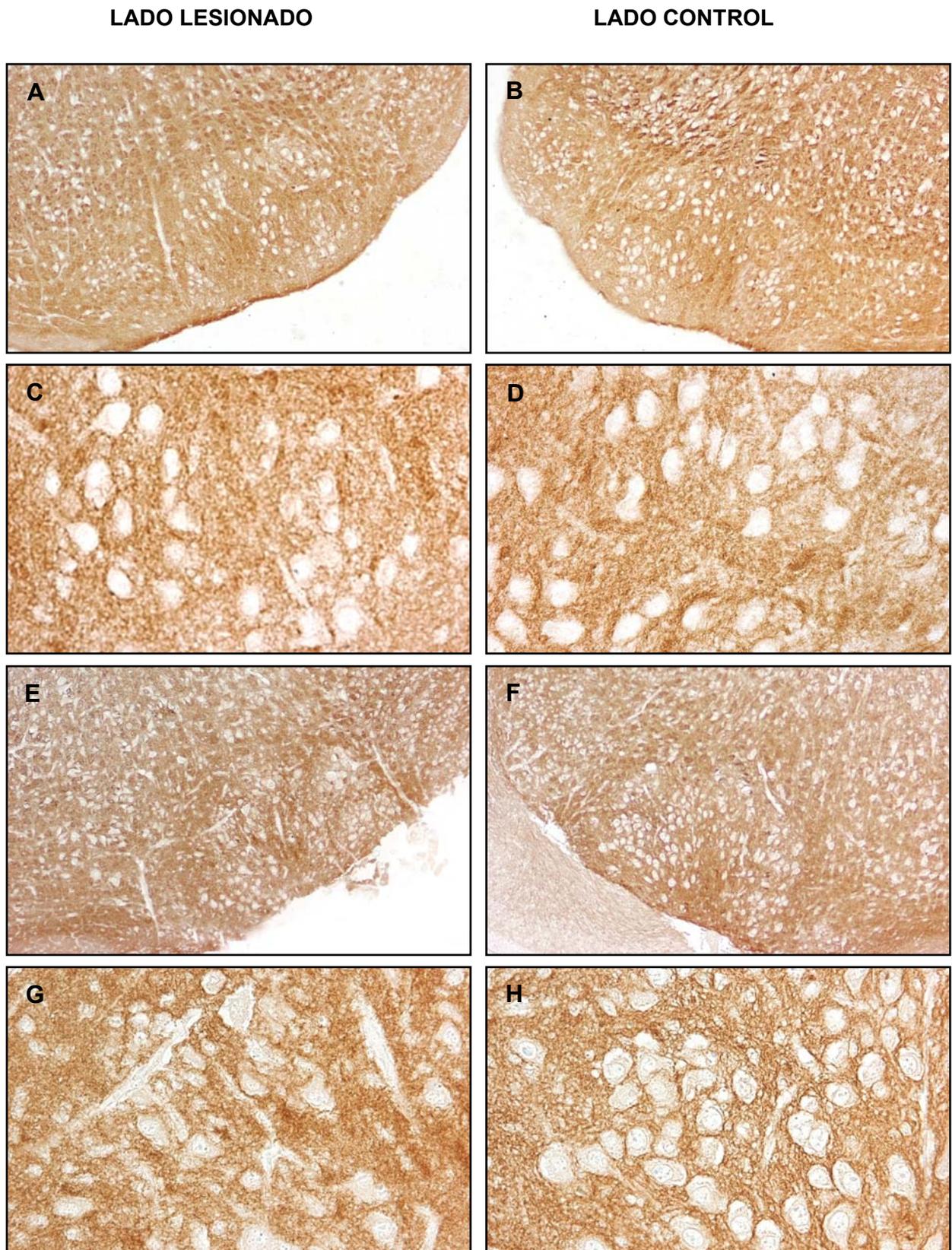


Figura IV.2.25: Inmunohistoquímica frente a GLUT3 en el núcleo del facial de ratones neonatos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la axotomía.

A, C, E y G- lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

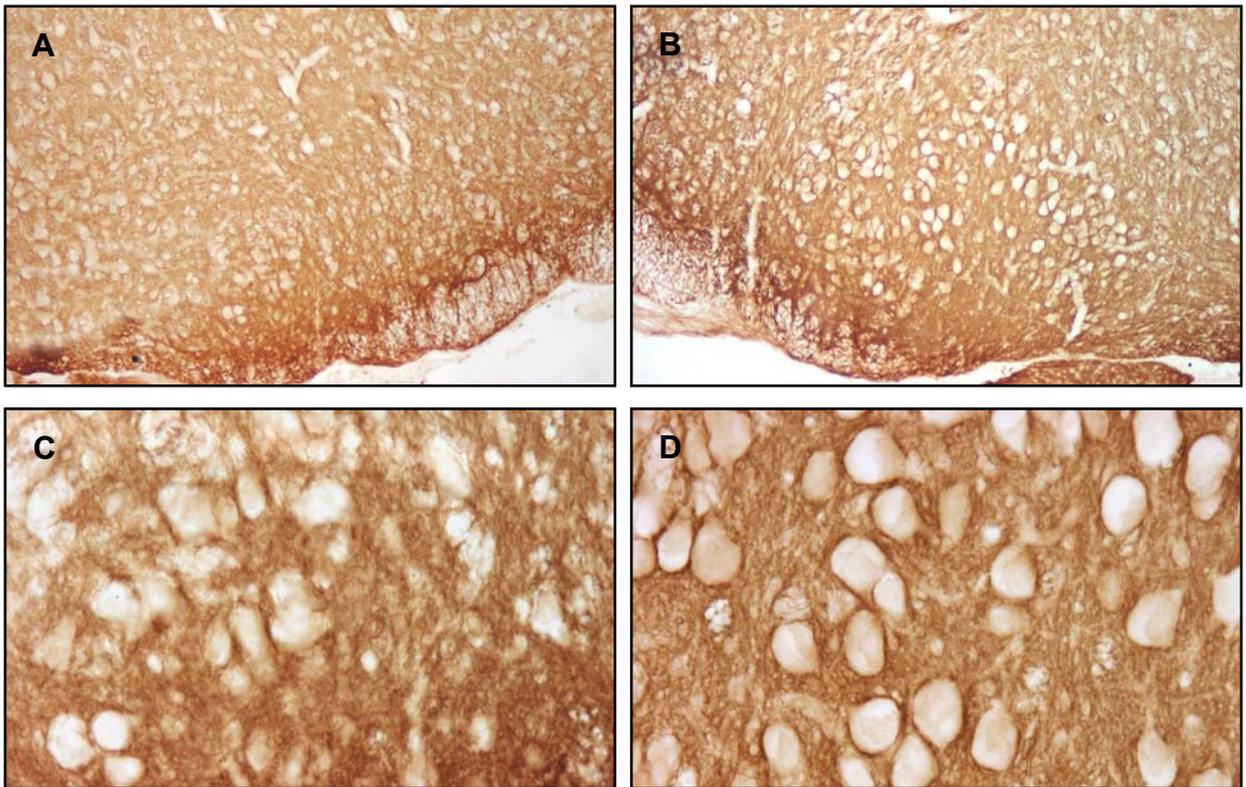


Figura IV.2.26: Inmunodetección de GLUT3 en el núcleo del facial de ratones neonatos sacrificados 8 días tras la axotomía.

A y C- lado lesionado. **B y D-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A y B: 200X. C y D: 400X.

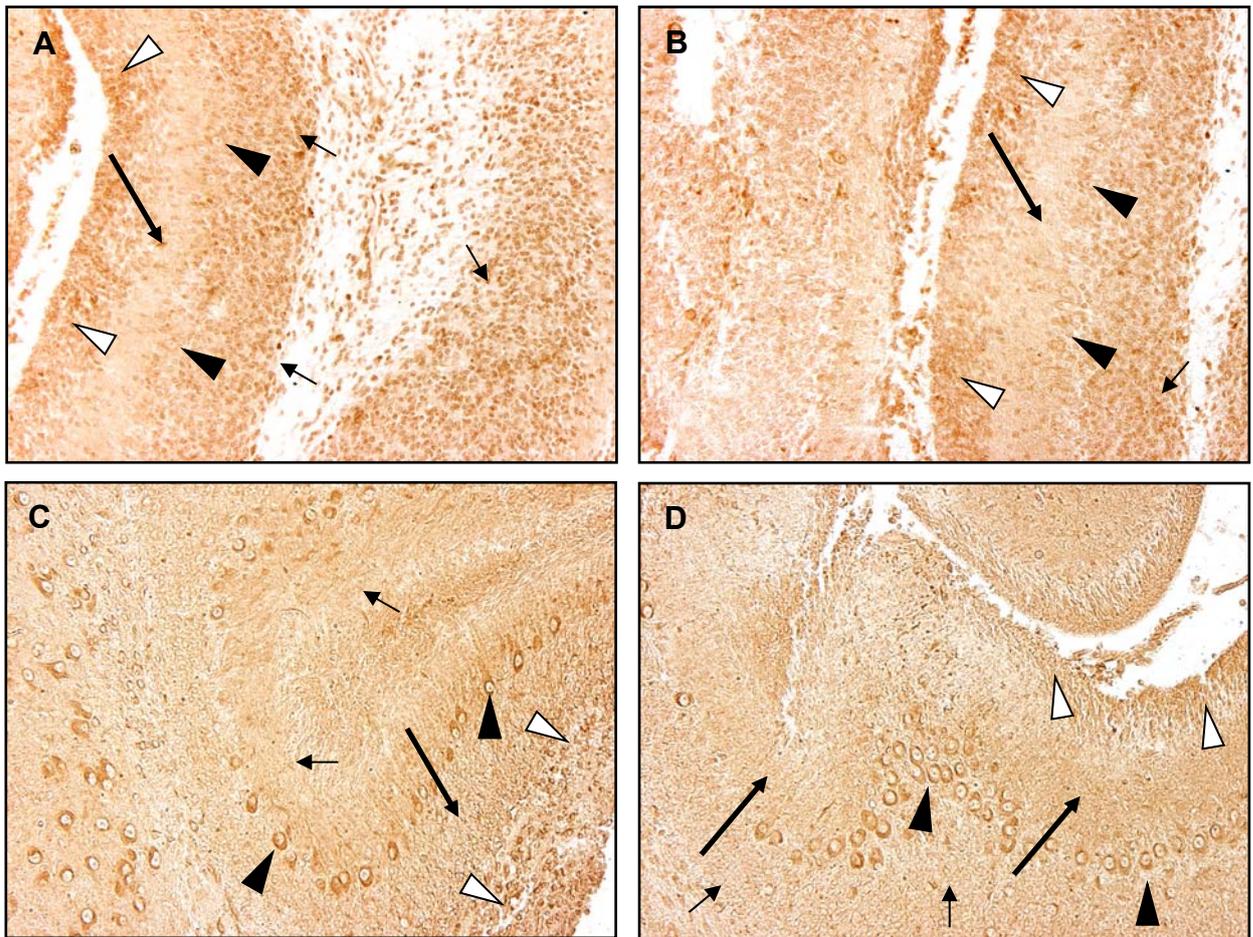


Figura IV.2.27: Inmunodetección de GLUT4 (A y B) y GLUT8 (C y D) en cortes de cerebelo de ratón neonato.

A y B- Secciones incubadas con el anticuerpo anti-GLUT4 en las cuales se observa un marcaje heterogéneo en la capa granular, tanto en la capa externa (punta de flecha blanca) como en la interna (flecha pequeña). En la capa molecular se aprecia un marcaje débil y difuso similar al observado en adulto (flecha grande), mientras que en las células de Purkinje (punta de flecha negra) la IR es más débil que en adulto.

C y D- Se aprecia IR-GLUT8 en el citoplasma de las células de Purkinje (punta de flecha negra), de forma heterogénea en la capa granular externa (punta de flecha blanca) y de manera más débil y difusa en la capa granular interna (flecha pequeña) y en la capa molecular (flecha grande).

Magnificación: 200X.

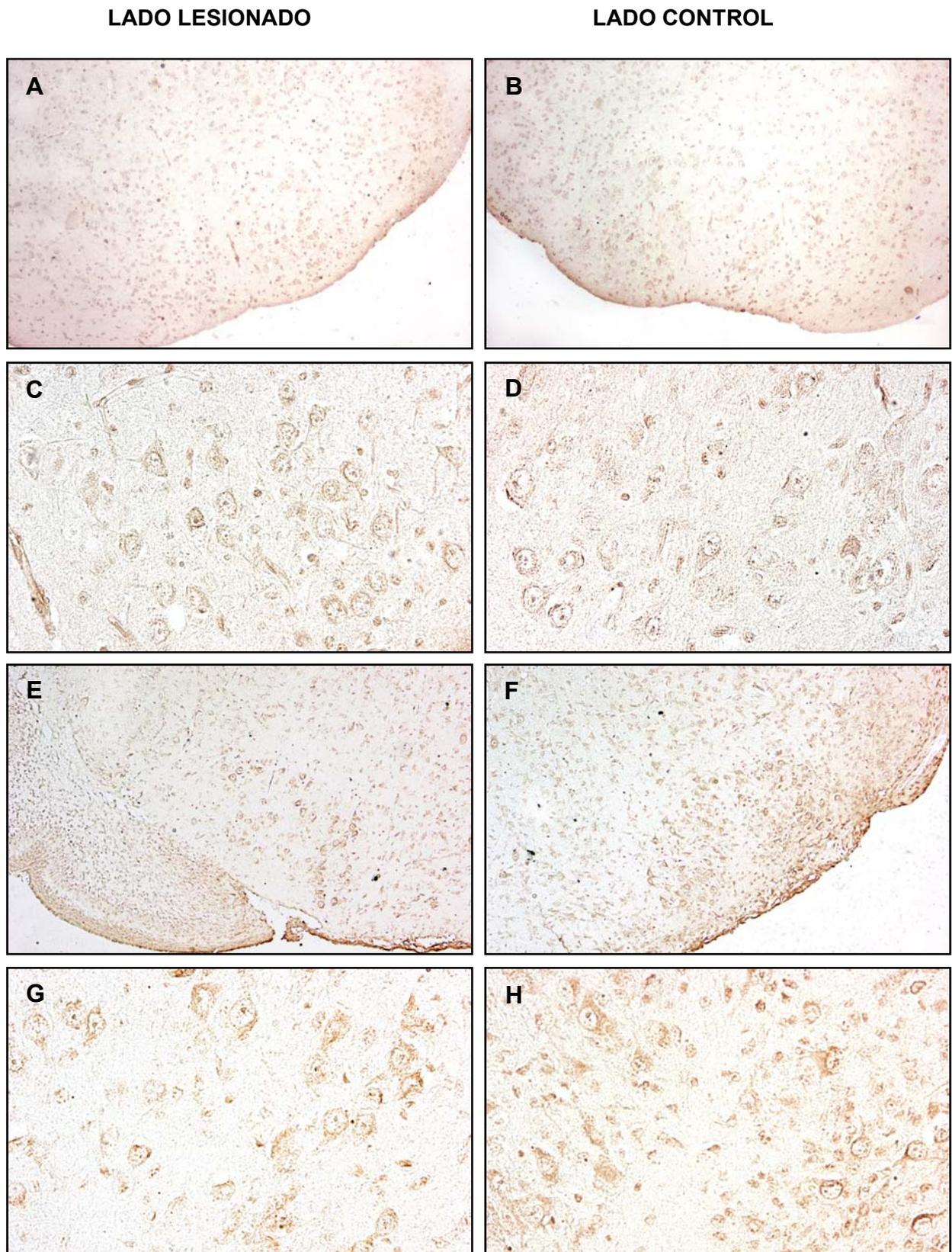


Figura IV.2.28.: Inmunodetección de GLUT4 en secciones del núcleo del facial de ratones neonatos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) post-lesión. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones entre el lado lesionado y el control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

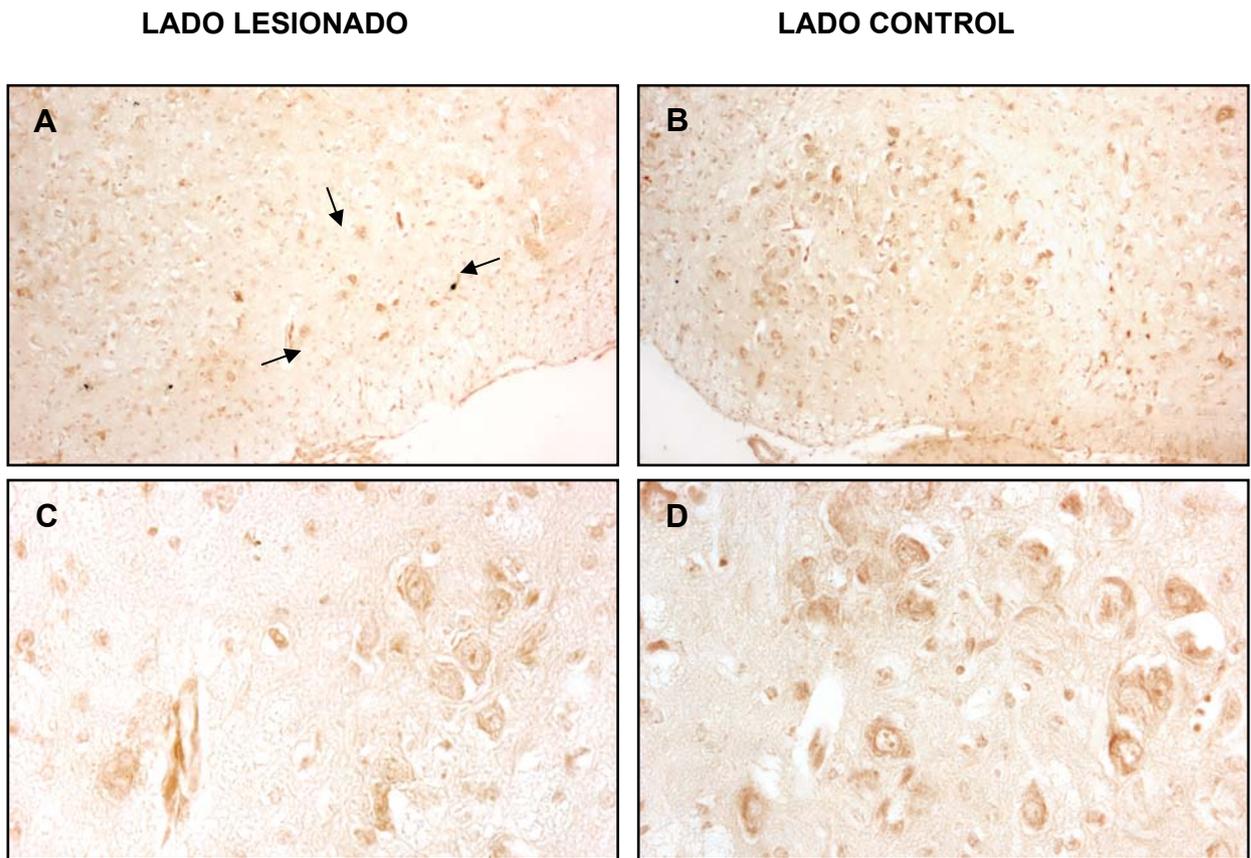


Figura IV.29.: Inmunohistoquímica de GLUT4 en secciones del núcleo del facial de ratones neonatos sacrificados 8 días tras la operación.
A y C - lado lesionado. Obsérvese la reducción en el número de motoneuronas (flechas) **B y D**-lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A y B: 200X. C y D: 400X.

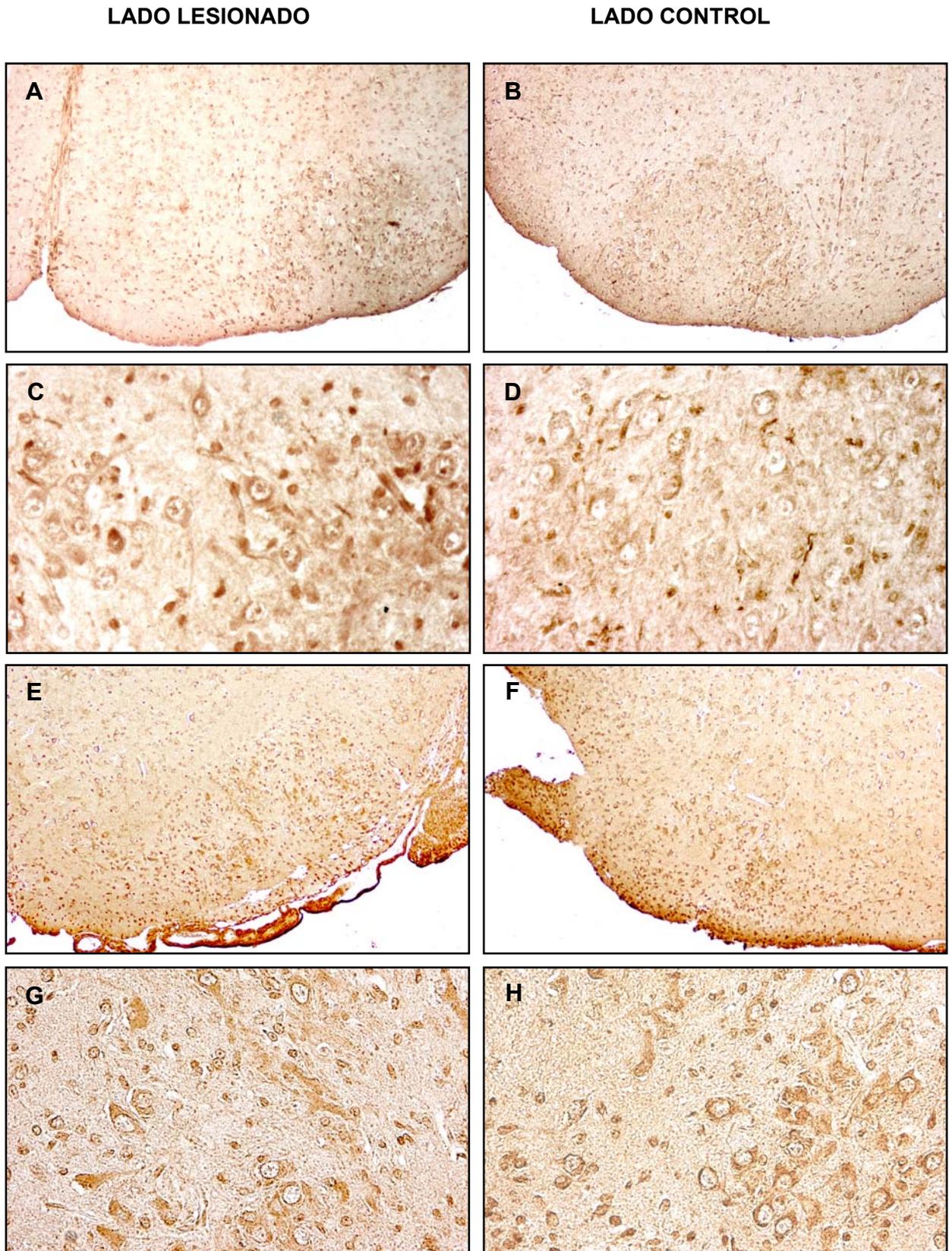


Figura IV.2.30: Inmunodetección de GLUT8 en el núcleo del facial de ratones neonatos sacrificados 24 horas (A, B, C y D) y 3 días (E, F, G y H) tras la axotomía. **A, C, E y G-** lado lesionado. **B, D, F y H-** lado control. No se apreciaron variaciones en el lado lesionado respecto al control. Magnificación: A, B, E y F: 200X. C, D, G y H: 400X.

V.DISCUSIÓN

1. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN TESTÍCULO

1.1. Expresión de transportadores de glucosa en testículo

En este trabajo hemos estudiado la expresión de GLUT8 y GLUT3, en testículo y espermatozoides a lo largo de la espermatogénesis y en la diabetes inducida por estreptozotocina. La espermatogénesis es un complejo proceso que se caracteriza por una secuencia de divisiones mitóticas y meióticas que conducen a la producción de los espermatozoides maduros (McCarrey, 1993). En los testículos de los ratones recién nacidos las células precursoras se autorenewan entre los días 1 y 7. Las primeras divisiones llevan al desarrollo de las espermatogonias tipo A y B. Las espermatogonias tipo B sufren una replicación premeiótica y entran en meiosis como espermatoцитos primarios. Los espermatoцитos secundarios realizan la segunda división meiótica fruto de la cual se generan células germinales haploides. Éstas se diferencian formando espermátidas redondeadas, que se transforman en espermátidas alargadas y finalmente en espermatozoides maduros. La primera ola de espermatogénesis es seguida por olas adicionales que permiten la producción continua de espermatozoides a lo largo de la vida de los animales. (McCarrey, 1993; Zindy et al., 2001).

En este estudio mostramos que GLUT8 aparece por primera vez en los testículos de ratón cuando las espermátidas redondeadas se forman (a partir del día 20 postparto) (McCarrey, 1993), mientras que el inicio de la expresión de GLUT3 es anterior, ya que se empieza a expresar en la fase de espermatoцитo primario, por lo que está presente en testículos de 14 días aunque no en todos los túbulos seminíferos. La expresión de ambos transportadores persiste durante la espermiogénesis, siendo detectada en todos los túbulos de ratones y ratas adultos y en espermatozoides aislados del epidídimo. En este sentido, se ha descrito la presencia de niveles muy bajos de ARNm de GLUT8 en ratas prepuberales, mientras que en adulto los niveles son 40 veces más elevados (Carosa et al., 2005), lo que corrobora la presencia de altos niveles de GLUT8 en testículos maduros.

Los mayores niveles de expresión de GLUT8 están localizados en la región acrosómica a lo largo de toda la espermiogénesis, adoptando la forma cambiante del sistema acrosómico en formación, estando aparentemente ausente en otras localizaciones, a excepción de los bajos niveles apreciados en las células de Leydig de la rata. Trabajos publicados previamente han mostrado que el testículo es el órgano

que expresa los mayores niveles de GLUT8, siendo muy superiores a los de otros órganos (Chen et al., 2003; Doege et al., 2000; Ibberson et al., 2000; Schürmann et al., 2002). Sin embargo estos estudios han mostrado algunas diferencias respecto a las células concretas que expresan el transportador. Por un lado, nuestros resultados confirman los de Schürmann y colaboradores (Schürmann et al., 2002). Pero además, hemos identificado que las células que expresan GLUT8 dentro de los túbulos seminíferos son las espermatidas redondeadas y alargadas. Estos datos explican que tanto el ARNm como la proteína de GLUT8 se detecten en testículos de ratones de 24 días de edad, cuando las espermatidas redondeadas están ya presentes y en edades posteriores, mientras que en ratones de 14 días, en los que todavía estas células no se han diferenciado, GLUT8 no se detecte.

Las diferencias mostradas en los trabajos publicados podrían deberse a las diversas técnicas usadas o a la especie estudiada. Aunque se han descrito diferencias interespecíficas en la expresión de transportadores, cuando el trabajo es realizado por un mismo grupo las diferencias son pequeñas. Por ejemplo, GLUT3 se expresa tanto en roedores como en humano, aunque en rata tiene una expresión más amplia dentro de los túbulos seminíferos (Burant and Davidson, 1994). Nosotros hemos comprobado que en la rata adulta la expresión de GLUT8 es similar a la del ratón, aunque hemos apreciado también bajos niveles de expresión de GLUT8 en células de Leydig de rata, lo que estaría de acuerdo con los resultados mostrados por Chen y colaboradores (Chen et al., 2003). No hemos apreciado esta expresión en el ratón, tal vez debido a diferencias específicas o a que la expresión en esta especie está por debajo del umbral de detección de nuestro anticuerpo. Este anticuerpo fue preparado utilizando como inmunógeno un polipéptido compuesto por los 11 aminoácidos carboxiterminales de GLUT8 de ratón. En la rata esta región sólo difiere en un aminoácido respecto al ratón y los resultados obtenidos muestran que detecta GLUT8 en ambas especies. En la rata también se ha descrito la presencia de GLUT8 en espermatoцитos (Ibberson et al., 2002). Estos investigadores utilizan un anticuerpo que reconoce un bucle intermedio de la proteína GLUT8, mientras que en nuestro trabajo y en el de Schürmann y colaboradores (Schürmann et al., 2002) se ha empleado un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal. No obstante, un estudio detallado de las imágenes mostradas por Ibberson y colaboradores parece indicar que, mientras que el ARNm detectado por hibridación *in situ* sí se localiza en los espermatoцитos (figura 2A en Ibberson et al, 2002), las células que muestran GLUT8-IR parecen ser más internas, probablemente espermatidas (figura 2B en Ibberson et al, 2002). Por otra

parte, algunos de los datos de expresión de transportadores en testículo se basan en cultivos celulares. Así se podría explicar la expresión de GLUT8 y GLUT3 en células de Leydig que han sido cultivadas *in vitro* (Chen et al., 2003) o en células de Sertoli aisladas (Carosa et al., 2005) ya que la modificación de las condiciones de las células y su cultivo podrían modificar la expresión de sus proteínas.

En resumen, se puede concluir a partir de nuestros resultados y su comparación con otros previamente publicados que GLUT8 es un transportador fundamentalmente expresado en el sistema acrosómico de espermátidas y espermatozoides, independientemente de la especie.

Respecto a GLUT3, nuestros resultados corroboran en general los mostrados por Burant y Davidson (1994) y Angulo y colaboradores (1998). Además, hemos identificado los tipos celulares que expresan GLUT3, los espermatoцитos y las espermátidas, y hemos mostrado que la proteína se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática de estas células. Por el contrario, no hemos detectado GLUT3-IR ni en células germinales más inmaduras ni en las células intersticiales, con lo cual nuestros resultados discrepan de los de los otros grupos (Ballester et al., 2004; Kokk et al., 2004). GLUT3 se localiza a lo largo del desarrollo fundamentalmente en la membrana plasmática de espermatoцитos y espermátidas. Hay que destacar que esta localización persiste en los espermatozoides si bien no en toda la membrana celular ya que la cabeza carece de expresión.

El conjunto de nuestro trabajo, junto con los anteriormente citados, muestra que GLUT8 y GLUT3 son, junto con GLUT5 (Angulo et al., 1998; Burant and Davidson, 1994; Burant et al., 1992) dos de los principales transportadores de glucosa del testículo. Además de estos transportadores se ha descrito la presencia, en niveles más bajos, de GLUT1 (Burant and Davidson, 1994; Chen et al., 2003; Kokk et al., 2004), GLUT7 (Li et al., 2004) y GLUT2 (Angulo et al., 1998; Kokk et al., 2004), aunque este último no lo han detectado otros trabajos (Burant and Davidson, 1994). Por el contrario, la mayoría de los estudios realizados consideran que GLUT4 no se expresa en testículo (Burant and Davidson, 1994; Chen et al., 2003), lo que también ha sido corroborado por nuestros resultados.

1.2. Posible función de GLUT8

Tanto la expresión de los transportadores de glucosa como las vías

metabólicas de la glucosa parecen compartimentalizadas en las células espermáticas. En los espermatozoides los transportadores de glucosa muestran una localización precisa, aunque con un cierto grado de variación según la especie, como ya se ha comentado. Mientras que GLUT3 se localiza en la membrana de la pieza intermedia y flagelo, GLUT8 está sólo en la cabeza. GLUT5 se localiza sin embargo en toda la membrana plasmática (Burant et al., 1992). Por otra parte, el metabolismo de las hexosas está también compartimentalizado: en la cabeza del espermatozoide la vía metabólica de la glucosa es la de las pentosas fosfato, mientras que el ATP se genera por glucólisis en la pieza principal del flagelo y por fosforilación oxidativa en la pieza intermedia (Urner and Sakkas, 2003). Es posible que esta compartimentalización esté relacionada con la expresión celular específica de transportadores GLUT, proporcionando una entrada de glucosa para cada vía metabólica.

Los altos niveles de expresión de GLUT8 sugieren que esta proteína puede desempeñar un papel importante en el metabolismo de la glucosa en las células germinales del macho. Es improbable que este papel sea el de la captación de glucosa por parte de las espermátidas ya que estas células no utilizan la glucosa como fuente energética sino que usan el lactato producido por las células de Sertoli (Bajpai et al., 1998) y GLUT8 se localiza en el compartimento intracelular correspondiente al sistema acrosómico. Sin embargo es posible que, en las espermátidas, GLUT8 actúe como un transportador entre el citosol y el interior del acrosoma para proporcionar las moléculas de glucosa necesarias para los procesos de glucosilación y deglucosilación. Durante la maduración de las espermátidas y en el paso de los espermatozoides por el epidídimo se producen glucosilaciones y, fundamentalmente, deglucosilaciones de las proteínas del acrosoma (Bajpai et al., 1998; Clermont and Tang, 1985). Es por lo tanto lógico pensar que por su localización ligada al acrosoma, GLUT8 pudiera intervenir en el transporte de las moléculas de glucosa generadas por las deglucosilaciones, desde el acrosoma al citosol. De esta forma, la glucosa liberada en estos procesos pasaría a estar disponible para las necesidades energéticas de la célula. Una función similar en el transporte de glucosa entre diferentes compartimentos intracelulares ha sido sugerida para GLUT8 en el hipocampo (Piroli et al., 2002). Sin embargo es posible que la función en los espermatozoides sea incluso más compleja. En primer lugar, los espermatozoides sí que son capaces de utilizar tanto la glucosa como la fructosa como material energético (Bajpai et al., 1998) y, aunque GLUT8 ha sido caracterizado como un transportador de glucosa, no se puede descartar la posibilidad de que también pueda transportar fructosa, puesto que este sustrato inhibe fuertemente el transporte de glucosa *in vitro* en *Xenopus leavis* (Ibberson et al., 2000). Por otra parte,

los espermatozoides son células consideradas transcripcionalmente inactivas y, por tanto, durante todo el proceso de transformación de las espermátidas, las células han de preparar toda la maquinaria proteica que necesitarán cuando se hayan liberado como espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos, por lo que la presencia de los transportadores en fases previas del desarrollo de las células germinales puede responder a esta preparación.

A diferencia de las espermátidas, la glucosa es necesaria para la función espermática y ha de ser metabolizada por el espermatozoide para la penetración de la zona pelúcida y la fusión del espermatozoide con el ovocito y en diversos procesos durante la capacitación (Urner and Sakkas, 2003). La capacitación de los espermatozoides es un proceso que requiere el consumo de importante cantidad de energía y la glucosa parece ser la fuente principal de energía para mantener la capacitación *in vitro* en ratón y en la especie humana, puesto que la glucosa induce modificaciones y porcentajes mayores de penetración que otros monosacáridos como la fructosa y la manosa (Travis et al., 2004). Existe pues la posibilidad de que GLUT8 se transloque a la membrana plasmática para poder captar la glucosa en la cabeza del espermatozoide, mientras que GLUT3 se encargaría del transporte de glucosa en la pieza intermedia. La translocación de GLUT8 desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática ha sido observada en blastocistos tratados con insulina, a través de la activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGFR-1) (Carayannopoulos et al., 2000; Pinto et al., 2002). Un cambio de localización de este tipo podría estar sucediendo en los espermatozoides durante la capacitación, y bajo estímulos adecuados, GLUT8 podría pasar a situarse en la membrana plasmática para captar glucosa del medio. El propio factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) podría ser uno de esos estímulos ya que se encuentra en el plasma seminal y su receptor IGFR-1 está presente en el acrosoma del espermatozoide (Naz and Padman, 1999).

Recientemente, se ha mostrado que la inactivación del gen *glut8* produce ratones sin alteraciones, ni en el desarrollo postnatal ni en la homeostasis de la glucosa y que responden de forma adecuada a un ligero estrés (Membrez et al., 2006). No existen datos sobre las células germinales masculinas, pero se sabe que los animales son fértiles. Es posible que exista un solapamiento funcional entre diversos transportadores o que la ausencia de GLUT8 provoque el aumento en la expresión de otros GLUTs que asuman las posibles funciones de GLUT8. Por otra parte, la inducción de algún tipo de estrés reproductivo en estos ratones, como por ejemplo, la

diabetes, podría aportar nueva información sobre la función del transportador en testículo.

1.3 Regulación por la diabetes

A pesar de las alteraciones producidas por la diabetes en el testículo, los mecanismos de transporte de glucosa en estos órganos parecen no verse afectados. El principal transportador de glucosa insulino-dependiente, GLUT4, no se expresa en testículo (Angulo et al., 1998; Burant and Davidson, 1994; Schurmann et al., 2002), lo que también hemos comprobado nosotros, mientras que GLUT8 y GLUT3, ambos con altos niveles de expresión en testículo, de acuerdo con nuestros resultados no se modifican tras un mes de hiperglucemia producida por inyección de stz. Estudios anteriores muestran resultados diferentes respecto a la expresión de GLUT3 en un estado de diabetes: mientras Burant y Davidson (1994) no muestran modificaciones en la expresión de GLUT3 después de 8 días de diabetes, Ballester y colaboradores (2004) observan que no hay diferencias de expresión medidas por western blot, pero sí mediante inmunohistoquímica, donde aprecian un descenso en su expresión en el tejido intersticial tras 3 meses del tratamiento con stz. Estas diferencias pueden deberse a la diferente duración del estado diabético, pero también a los diferentes procedimientos y metodología utilizados. Nuestros estudios muestran alteraciones morfológicas en testículo de animales diabéticos, pero tales cambios no se correlacionan con modificaciones de expresión de GLUT8 o GLUT3, sugiriendo que estas moléculas no están involucradas en las alteraciones reproductivas observadas en los estados diabéticos. Sin embargo, no podemos descartar que cuando la diabetes se prolonga durante largos periodos de tiempo estos transportadores sufran modificaciones.

La ausencia de variación en la expresión de los dos principales transportadores de glucosa en testículo de rata tras el tratamiento con stz sugeriría, en principio, que en este órgano, estas proteínas transportadoras no están bajo el control de la hormona insulina, y que escapan también a la regulación por los niveles de glucemia. De hecho, el papel de la insulina y de los niveles de glucosa en la regulación de GLUT8 (GLUT3 no se considera insulino-dependiente) es bastante complejo y dependiente del órgano. En el hígado de ratones tratados con stz la expresión del ARNm de GLUT8 disminuye ligeramente, pero los niveles de proteína se duplican. Sin embargo, en ratones con diabetes tipo 2 aumentan ambos, los niveles de ARNm y de proteína (Gorovits et al.,

2003). En células Caco-2, procedentes de adenocarcinoma de colon humano, la expresión GLUT8 aumenta con los niveles de glucosa en el medio de cultivo en determinados estadios de diferenciación y también es mayor cuanto mayor es el metabolismo glucídico de estas células (Romero et al., 2007). Sin embargo, la translocación de GLUT8 inducida por la insulina, desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, sólo se ha demostrado por el momento en blastocistos (Carayannopoulos et al., 2000; Pinto et al., 2002). Igualmente, la mayoría de estudios en neuronas parecen indicar que GLUT8 no está en esas células bajo la regulación de la insulina (Alquier et al., 2006). GLUT8 no se transloca a la membrana plasmática desde su localización intracelular, ni en adipocitos ni neuronas, tras el tratamiento con insulina (Augustin et al., 2005), ni tampoco en células PC12 o neuronas del hipocampo (Widmer et al., 2005), ni en células derivadas de neuroblastoma de ratón N2A (Shin et al., 2004). Igualmente, nuestros resultados muestran que el estado hiperglucémico inducido por stz no provoca cambios ni en las células que expresan GLUT8 ni, aparentemente, en su localización intracelular.

Otra posible explicación a la falta de respuesta de GLUT8 y GLUT3 a la ausencia de insulina y los altos niveles de glucosa sanguínea, es que otras fuentes de insulina extrapancreáticas que podrían actuar sobre el testículo. Nosotros hemos investigado esta posibilidad y hemos demostrado la presencia de insulina en el testículo. La insulina allí detectada es producida por el propio testículo ya que la amplificación del ARNm por RT-PCR así lo demuestra. La expresión extrapancreática de insulina fue cuestión de debate en los años 80 (revisado por Kojima et al., 2006), cuando Rosenzweig y colaboradores describieron la detección de insulina por radioinmunoensayo en varios tejidos, entre ellos el cerebro, el hígado y también el testículo (Rosenzweig et al., 1980), aunque estos resultados fueron cuestionados por Eng y Yalow (Eng and Yalow, 1981). Finalmente, la presencia de insulina en tejidos extrapancreáticos se demostró por la detección del ARNm en algunas áreas del cerebro (Devaskar et al., 1994). Posteriormente, otros trabajos han descrito la presencia de insulina en tejidos diferentes al páncreas en condiciones normales o patológicas (Cunha et al., 2005; Kojima et al., 2006). Recientemente también se ha mostrado que los espermatozoides humanos expresan y secretan insulina, que podría actuar de manera autocrina en la regulación del metabolismo de la glucosa, independiente del sistema pancreático (Aquila et al., 2005). Sin embargo, nuestros resultados constituyen el primer trabajo que demuestra la presencia de insulina en testículo por western blot y su distribución celular por métodos inmunohistoquímicos.

No hemos observado expresión de insulina en los espermatozoides, sino en la parte interna de los túbulos seminíferos, en un área que se corresponde con el citoplasma de las espermátidas alargadas y que conforme maduran estas células se concentra, sorprendentemente, en el cuerpo residual. Es interesante señalar que las células de Sertoli, que captarán los cuerpos residuales, tienen receptores para insulina (Oonk and Grootegoed, 1987) y proteínas IRS (insulin receptor substrate), mediadores clave en la señalización de la insulina a partir de sus receptores (Kokk et al., 2007), lo que sugiere que la insulina producida por las espermátidas y empaquetada en el cuerpo residual podría ser captada por las células de Sertoli, sobre las que actuaría de manera paracrina para regular su metabolismo y/o algún otro aspecto de la espermatogénesis. Mientras que en otros tejidos la diabetes induce la expresión extrapancreática de insulina (Kojima et al., 2004), la regulación en testículo parece a la inversa, ya que sus niveles disminuyen en las ratas diabéticas aunque su distribución no se altera. La captación de stz por las células beta del páncreas se produce vía GLUT2 (Szkudelski, 2001), transportador que se expresa en testículo en bajos niveles (Angulo et al., 1998; Kokk et al., 2004). Es posible que la stz entre parcialmente en testículo vía GLUT2, reduciendo, aunque no de forma tan agresiva como ocurre en el páncreas, la producción de insulina. Nosotros no hemos evaluado si el porcentaje de células germinales o la fertilidad de los espermatozoides se ven afectados en nuestro modelo experimental, pero la disminución del peso de los testículos y del diámetro tubular indica que hay una afectación de este tejido. La administración exógena de insulina es capaz de producir la vuelta a los niveles normales del peso corporal, del peso de los testículos y del diámetro tubular, aunque los niveles de insulina producidos por el testículo sigan siendo bajos. Esto sugiere que la reducción de la presencia de insulina en el testículo se debe al daño producido por la stz, más que a los propios niveles de insulina o glucosa en la sangre. La recuperación morfológica del testículo en los animales diabéticos tratados con insulina podría indicar que es la propia insulina circulante la responsable de que la función testicular sea la adecuada. Es posible que la producción de insulina por el testículo sea un mecanismo de seguridad para el caso de que la producción de insulina pancreática esté afectada. Sin embargo, es también posible que, por su localización profunda en los túbulos seminíferos, esté actuando, como se ha comentado antes, de manera paracrina sobre las células de Sertoli, regulando otros aspectos de la espermatogénesis.

2. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN MOTONEURONAS EN RESPUESTA A LA AXOTOMÍA

Hemos analizado aquí la expresión de los transportadores de glucosa en las neuronas del núcleo del nervio facial y su posible variación en respuesta a la axotomía. Como se ha explicado en la introducción, la expresión de los transportadores de glucosa en el sistema nervioso central depende más del tipo celular (neuronas, glía) que de los núcleos concretos en los que las neuronas se encuentran. Se acepta que GLUT1 es responsable del transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica, GLUT4 se expresa fundamentalmente en cuerpos neuronales, aunque también en neuritas y GLUT3 se localiza en el neuropilo. La distribución de GLUT8 está menos estudiada, pero parece localizarse también en cuerpos neuronales y prolongaciones (McEwen and Reagan, 2004). Nuestros resultados confirman estos datos.

Hemos comprobado la expresión de GLUT1 en el endotelio de los vasos cerebrales y la presencia de GLUT3 en las prolongaciones neuronales del tejido estudiado. GLUT4 y GLUT8 se expresan en los cuerpos de las neuronas, aunque también aparece IR frente a estos transportadores en las prolongaciones. En el núcleo del nervio facial, GLUT1 y GLUT3 están ausentes de los somas neuronales, mientras que GLUT4 y GLUT8 se localizan fundamentalmente en los cuerpos de las neuronas, como ya se había descrito (El Messari et al., 2002; El Messari et al., 1998).

La presencia de GLUT3 es especialmente llamativa en el cerebelo en desarrollo, en donde se puede apreciar la expansión creciente de la capa molecular, formada por las prolongaciones de las células de Purkinje (que expresan GLUT3) a expensas de la reducción progresiva de la capa granular externa, que no produce GLUT3.

Aunque no hemos cuantificado los niveles de expresión de los transportadores, la señal obtenida al analizar la presencia de GLUT4 era menor en los animales jóvenes que en los adultos, lo que viene a confirmar los resultados de Sankar y colaboradores (Sankar et al., 2002), que cuantificaron la expresión de los transportadores a partir de homogenados de cerebro completo. También se ha descrito un aumento postnatal en la expresión de GLUT1 (Vannucci and Simpson, 2003), GLUT3 (Sankar et al., 2002; Vannucci and Simpson, 2003), y un descenso de

GLUT8 en la edad adulta (Sankar et al., 2002). Nosotros no hemos realizado comparaciones cuantitativas entre la expresión en adultos y jóvenes, pero la señal obtenida con los anticuerpos anti-GLUT3 y anti-GLUT8 proporcionaron señales comparables. Sin embargo, con el anticuerpo anti-GLUT1 la intensidad fue también menor en los animales jóvenes.

Como se ha señalado en la introducción, hay 7 transportadores que se expresan en cerebro, aunque los principales son GLUT1, GLUT3, GLUT4 y probablemente GLUT8. El hecho de tal diversidad puede obedecer a una simple redundancia fisiológica o a que cada uno tenga funciones específicas. Esta última parece ser una hipótesis bastante probable, que viene avalada por la diversa regulación de los transportadores en función de la condición experimental o de la lesión, y de la región del sistema nervioso central afectada (Dwyer, 2002). Cheng y colaboradores demostraron que en ratones a los que se ha eliminado el gen del factor neurotrófico IGF-1 tienen disminuida la captación de glucosa en varias áreas cerebrales (Cheng et al., 2000). Este descenso está asociado a la disminución de GLUT4, mientras que GLUT1 y GLUT3 no cambian. Por otra parte, la epilepsia provocada por pentilinetetrazol, que provoca un aumento de la demanda de energía en el cerebro, produce un aumento rápido de los niveles de ARNm de GLUT1 y GLUT3, pero no de sus proteínas (Nehlig et al., 2006). Los efectos de la diabetes se han estudiado a distintos niveles por varios grupos. La proteína GLUT4 aumenta en el cerebelo en ratones hiperinsulinémicos genéticamente diabéticos pero disminuye en ratas diabéticas con hipoinsulinemia provocada por la estreptozotocina (Vannucci et al., 1998). Al contrario ocurre con GLUT8, cuyo ARNm aumenta en el hipocampo de ratas tratadas con estreptozotocina sin que haya cambios en los niveles de proteína (Reagan et al., 2001). Por otra parte, mientras que la proteína GLUT1 disminuye en la retina y en la corteza cerebral de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, en estos mismos animales GLUT3 no varía (Badr et al., 2000). El efecto del hipotiroidismo en la expresión de los GLUTs es complejo. En ratas con hipotiroidismo congénito los niveles de ARNm de GLUT1 y GLUT3 en la corteza cerebral no difieren de las controles. Sin embargo la proteína GLUT1 está disminuida en la corteza de animales hipotiroideos de 15 días de edad, y la respuesta al tratamiento con T3 varía según la edad: mientras que en animales de 15 días hace que aumenten los niveles de ARNm, en adultos el mismo tratamiento provoca su disminución. También la producción de ARNm de GLUT3 varía con el tratamiento, disminuyendo en animales hipotiroideos tratados con T3 (Santalucia et al., 2006). Por otra parte, los procesos de aprendizaje provocan un aumento del ARNm y la proteína de GLUT1 en el hipocampo, sin efecto

en GLUT3 (Choeiri et al., 2005) que sí que disminuye en el hipocampo de ratas viejas (Fattoretti et al., 2001).

Los cultivos celulares han servido para estudiar más en detalle la regulación de la expresión de los transportadores y de su localización intracelular. Se ha demostrado que el cultivo de células madre neurales adultas en condiciones de hipoxia y/o de hiperglucemia hace que aumente la síntesis de ARNm de GLUT1 y GLUT3, pero sólo la proteína GLUT3 aumenta (Maurer et al., 2006). En células de neuroblastoma humano el ARNm de GLUT1 aumenta con el tratamiento con el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1 (Russo et al., 2004). La insulina, por otra parte, provoca la translocación de GLUT3 en cultivos de células de hipocampo, si bien no produce la fusión con la membrana ni aumento de la captación de glucosa (Uemura and Greenlee, 2006). Esta hormona, sin embargo, no provoca la translocación de GLUT8 células de neuroblastoma de ratón N2A (Shin et al., 2004). GLUT8 tampoco se transloca bajo diferentes estímulos en células PC12 o en neuronas de hipocampo (Widmer et al., 2005). Sin embargo, la administración de glucosa periférica estimula la translocación de GLUT8 entre diferentes compartimentos del retículo endoplásmico, aunque no hacia la membrana plasmática (Piroli et al., 2002).

Existen algunos datos que relacionan la respuesta de las neuronas motoras a diversas condiciones patológicas con el transporte de glucosa. Ya en 1984 se publicó que la axotomía del nervio hipogloso en ratas adultas provoca un aumento considerable de la utilización de la glucosa en el núcleo correspondiente al nervio seccionado. Este aumento es visible a las 24 horas de la lesión, alcanza los valores mayores entre las 24 y 72 horas y desaparece, regresando a los valores normales, aproximadamente al mes de la axotomía, unos días después de la recuperación funcional (Smith et al., 1984). La axotomía del nervio facial también origina cambios en la captación de glucosa. Esta lesión en ratas adultas provoca un aumento de aproximadamente el 12% del consumo de glucosa medido a los 7 días de la lesión. La misma lesión en animales recién nacidos produce un ligero descenso, estadísticamente significativo, de la captación de glucosa (Ito et al., 1999).

Nuestro estudio es el primero que analiza la expresión de los transportadores en respuesta a una lesión de un nervio motor, tanto en animales adultos, en los que el nervio recupera su funcionalidad al cabo de unas semanas, como en recién nacidos, en los que esta lesión induce una muerte neuronal progresiva generalizada (Moran and Graeber, 2004). Nuestros resultados indican que GLUT1, GLUT3 y GLUT4 no sufren variaciones detectables por los métodos utilizados, ni en animales adultos ni en

recién nacidos. Por el contrario, se aprecia un aumento de GLUT8-IR en las motoneuronas lesionadas en animales adultos entre los 3 y los 8 días tras la sección del nervio. Este aumento no fue detectado por western blot, probablemente porque para realizar esta prueba es necesario disponer de una cantidad de tejido que sobrepasa las dimensiones del núcleo del facial, con lo que el posible aumento en los niveles de expresión del transportador en el núcleo se verá diluido en el resto del tejido. Lo mismo puede ocurrir con los otros transportadores estudiados; sin embargo en estos casos los datos de western blot se han visto confirmados por las pruebas inmunohistoquímicas. No obstante, será necesario confirmar los resultados cuantificando la señal obtenida o estudiando la expresión del ARNm por hibridación *in situ*.

En un principio se podría esperar que fueran precisamente los tres transportadores que no modifican su expresión (GLUT1, GLUT3 y GLUT4) los que alteraran sus niveles tras la axotomía, ya que según las teorías más aceptadas son los responsables de la captación de glucosa por las neuronas (Duelli and Kuschinsky, 2001). Es posible que la presencia de los transportadores en sus niveles fisiológicos sea suficiente para asumir el aumento en el transporte de glucosa responsable del incremento en la captación que ocurre en el animal adulto axotomizado, o que se produzca un ligero aumento de expresión no detectable por los métodos utilizados. Hay que señalar que, aunque los dos trabajos antes indicados muestran un aumento en la captación de glucosa en el núcleo del nervio lesionado en animales adultos, el aumento real que ocurre en el núcleo del nervio facial es tan solo de un 12% (Ito et al., 1999). Por otra parte, la disminución de la captación que se aprecia tras la axotomía en neonatos tampoco es muy intensa. En estos animales, las neuronas que todavía sobreviven siguen expresando los transportadores.

Sólo GLUT8 parece aumentar su expresión tras la axotomía, y sólo en animales en los que la lesión es reversible. La mayor parte de los trabajos publicados hasta el momento muestran que GLUT8 se localiza en compartimentos intracelulares de las neuronas, con escasa asociación a la membrana plasmática (Piroli et al., 2002; Reagan et al., 2001; Shin et al., 2004; Widmer et al., 2005) y que los estímulos que provocan la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática no producen el mismo efecto en GLUT8 (Alquier et al., 2006). En relación con estos datos, recientemente se ha mostrado que en adipocitos 3T3-L1 y células CHO, GLUT8 no se transloca a la membrana plasmática bajo el estímulo de la insulina o del IGF-1 (Augustin et al., 2005). Por ello parece poco probable, aunque no se pueda descartar, que GLUT8 se

transloque a la membrana de las motoneuronas tras la axotomía y sea el responsable de la captación de glucosa. ¿Qué función puede tener, entonces, el aumento de expresión de GLUT8 tras la axotomía de un nervio motor adulto? Piroli y colaboradores (2002) han mostrado que la administración de glucosa periférica produce la translocación de GLUT8 en el retículo endoplásmico en neuronas del hipocampo y han sugerido que puede estar implicado en el tráfico intracelular de glucosa entre el retículo endoplásmico y el citosol. Una función esencial del retículo endoplásmico es la síntesis de proteínas y GLUT8 podría estar implicado en la homeostasis de la glucosa en relación con el retículo endoplásmico, función que es crítica para los procesos de glucosilación. Este hecho también estaría corroborado por otros trabajos que muestran una clara relación entre GLUT8 y células tumorales, donde la expresión de GLUT8 es directamente proporcional al consumo de glucosa por estas células, lo cual coincide con periodos donde la síntesis proteica es muy elevada (Goldman et al., 2006; Romero et al., 2007).

Como respuesta a la axotomía la célula dañada reacciona aumentando la síntesis de numerosas proteínas, entre otras de citoesqueleto (revisado por Moran y Graeber, 2004). Es posible que GLUT8 esté transportando glucosa entre compartimentos intracelulares en las motoneuronas y que el aumento de su expresión en las células lesionadas responda al incremento del tráfico de glucosa dentro de la célula, producido por los nuevos requerimientos para intentar reparar la lesión. En las neuronas lesionadas de los recién nacidos, por el contrario, este aumento no se aprecia, aunque no podemos saber si es causa o consecuencia de su incapacidad para sobrevivir. El ratón al que se le ha eliminado el gen de *glut8* no muestra importantes alteraciones en el sistema nervioso central. Únicamente se ha descrito un aumento de la proliferación de las células del hipocampo sin que afecte a su capacidad de adquisición o retención de la memoria (Membrez et al., 2006). Sería interesante estudiar en estos animales la capacidad de sus motoneuronas de superar lesiones como la axotomía.

Es necesario continuar con el estudio del papel de cada transportador de glucosa en el sistema nervioso central, en condiciones normales o patológicas, para conocer su implicación en las enfermedades o lesiones que afectan a este tejido. También para vislumbrar su posible uso como herramienta o como diana terapéutica. En este sentido, ya se ha mostrado que la sobreexpresión de GLUT1 en hipocampo por medio de terapia génica produce, en ratones, una protección frente a lesiones excitotóxicas que es incluso mayor que la que consigue la proteína antiapoptótica Bcl-

2 (Gupta et al., 2001; McLaughlin et al., 2000). Que éste u otro transportador pueda tener similares efectos en otras alteraciones del sistema nervioso está por demostrar.

3. CONSIDERACIONES FINALES

Cada vez existen más datos que indican que, aunque pueda existir redundancia fisiológica entre algunos transportadores de glucosa, tal vez como un mecanismo de las células para asegurarse el suministro de nutrientes, cada transportador podría desempeñar su propia función. GLUT8 tiene una localización fundamentalmente intracelular, tanto en el testículo, donde se localiza en el acrosoma, como en las neuronas. Aclarar su función en ambas localizaciones requerirá nuevos estudios.

Entre la hipótesis que se pueden dibujar, es posible que GLUT8 tenga una función general en las células en las que se expresa, relacionada con la homeostasis intracelular de la glucosa en relación con la glucosilación de las proteínas, y que se sobreexpresa cuando aumenta la síntesis y procesamiento de proteínas. Este hecho explicaría el aumento observado tras la axotomía del nervio facial adulto. Su regulación parece compleja y, aunque se considera un transportador que responde a la insulina, diversos trabajos discuten esa posibilidad. Esto podría explicar, en principio, que no varíe en el testículo de ratas diabéticas. Sin embargo, la insulina producida por las propias células del testículo podría estar regulando no solo este transportador sino otros muchos procesos fisiológicos en estos órganos. Aunque el ratón al que se ha eliminado el gen de *glut8* no muestra alteraciones importantes, el estudio de su respuesta frente a diversos tipos de estrés puede aportar información importante sobre la función de este transportador

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, de su análisis y discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El transportador de glucosa GLUT8 empieza a expresarse en el testículo de ratón cuando las espermátidas redondeadas se forman y su expresión persiste a lo largo de la espermatogénesis. Se localiza en las espermátidas redondeadas y alargadas, y en los espermatozoides obtenidos del epidídimo, quedando su expresión restringida al sistema acrosómico.

2. GLUT3 se empieza a expresar en el ratón en los espermatoцитos primarios, estando también presente en las células más maduras de la línea germinal del macho. Se localiza fundamentalmente en la membrana celular de las células germinales del testículo y en la membrana plasmática de la pieza intermedia y del flagelo de los espermatozoides.

3. La localización de GLUT8 y GLUT3 en el testículo de la rata adulta es similar a la del ratón, aunque también existen bajos niveles de expresión de GLUT8 en las células de Leydig.

4. La diabetes inducida en la rata por estreptozotocina no provoca cambios en los niveles de GLUT3 ni en los de GLUT8 en el testículo, ni en la distribución de estos transportadores dentro de este órgano.

5. Los testículos de rata producen insulina, que se localiza en el citoplasma de las espermátidas alargadas y que se concentra en el cuerpo residual conforme maduran las espermátidas.

6. La diabetes inducida por estreptozotocina produce una disminución en los niveles de insulina detectados en testículo, pero no hace variar su distribución tisular. La administración subcutánea de insulina no tiene efecto sobre la producción de insulina por parte del testículo.

7. Los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 se expresan en el núcleo del nervio facial del ratón adulto y recién nacido.

8. La axotomía del nervio facial en el ratón adulto hace aumentar los niveles de GLUT8 en las motoneuronas lesionadas. Este aumento es visible a los 3 y 8 días tras la lesión, regresando su expresión a niveles similares a los del lado control

transcurrido un mes desde la sección del nervio. GLUT1, GLUT3 y GLUT4 no modifican su expresión como consecuencia de la axotomía.

9. En ratones recién nacidos, la axotomía no altera los niveles de expresión de ninguno de los cuatro transportadores estudiados en los tres tiempos postlesionales (1, 3 y 8 días) analizados.

10. Por lo tanto, GLUT8 parece ser el único transportador de glucosa que parece estar implicado en los procesos de regeneración de neuronas motoras, favoreciendo la llegada de glucosa a estas células durante la duración de este proceso que demanda un gran gasto energético y de síntesis proteica.

VII. RESUMEN

RESUMEN

GLUT8 es un transportador de glucosa que se expresa fundamentalmente en testículo pero también en el sistema nervioso central. En este trabajo se estudia, utilizando técnicas de RT-PCR, western blot e inmunohistoquímica, la localización concreta de GLUT8 en testículo de ratón y de rata, el efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina, y su expresión y regulación en el núcleo del nervio facial en respuesta a la axotomía en ratones. Los resultados obtenidos en la distribución y regulación de GLUT8 se comparan con los obtenidos para otros transportadores de glucosa como GLUT1, GLUT3 y GLUT4. GLUT8 se localiza en testículo de rata en las espermátidas y los espermatozoides, iniciándose su expresión a los 24 días postnatales, cuando se han formado las espermátidas redondeadas. La expresión persiste a lo largo de la espermiogénesis y en los espermatozoides, estando ausente en las células germinales más inmaduras, las células de Sertoli y el tejido intersticial. La inmunoreactividad frente a GLUT8 está siempre restringida al sistema acrosómico, fundamentalmente en su membrana, reproduciendo la forma cambiante del sistema acrosómico en formación. En la rata adulta la localización del transportador es similar, aunque una ligera inmunoreactividad es detectable en las células de Leydig. La expresión de GLUT3 se inicia antes y se localiza, tanto en rata como en ratón, en las células germinales a partir de los espermatozitos primarios, estando presente principalmente en la membrana celular de espermatozitos, espermátidas y espermatozoides, aunque en este último caso no se localiza en la cabeza de estas células. La diabetes inducida por estreptozotocina no provoca en la rata cambios ni en los niveles ni en la distribución de GLUT8 y GLUT3 en las células testiculares que los expresan. Además, se ha comprobado que el testículo sintetiza insulina, que se localiza en el citoplasma de las espermátidas alargadas y que se concentra en el cuerpo residual. La producción de insulina testicular disminuye con la diabetes aunque su localización no se ve modificada. La axotomía del nervio facial adulto, cuya lesión no provoca una muerte masiva de las motoneuronas dañadas, tiene como consecuencia un aumento en la expresión de GLUT8, detectable por inmunohistoquímica entre los 3 y los 8 días tras la lesión, sin que los niveles de GLUT1, GLUT3 y GLUT4 se vean aparentemente afectados. La misma lesión en ratones recién nacidos no hace variar de manera significativa los niveles de ninguno de los transportadores en las células que los expresan. Estos resultados sugieren que GLUT8 puede desempeñar un papel importante en el suministro de energía en los

espermatozoides, y en el tráfico intracelular de azúcares durante procesos de capacitación y fertilización. También parecen indicar que la diabetes inducida por estreptozotocina no altera de manera importante los mecanismos de transporte de glucosa en el testículo, y que la insulina de origen testicular podría estar regulando estos u otros fenómenos de la espermatogénesis. El aumento de la expresión de GLUT8 tras la axotomía motora adulta puede deberse a una implicación de este transportador en la regulación de la homeostasis de la glucosa en los procesos que llevan a la recuperación de las células tras la axotomía.

VII. SUMMARY

SUMMARY

GLUT8 is a facilitative glucose transporter expressed at high levels in the testis but also in the central nervous system. In this study, the precise distribution of GLUT8 in mouse and rat testis, its regulation after streptozotocin induced diabetes, and its expression and regulation in the facial nucleus after axotomy, is analyzed by RT-PCR, western blot and immunohistochemistry methods. The results are compared with those obtained for other glucose transporters as GLUT1, GLUT3 and GLUT4. GLUT8 expression begins when round spermatids are formed at postnatal day 24. The expression persists throughout spermiogenesis, and it is also detected in spermatozoa, but it is absent from more immature germ cells, Sertoli cells and interstitial tissue. GLUT8 immunoreactivity is always restricted to the acrosomic system, mainly in the acrosomic membrane, in a manner that matches the acrosome system formation. GLUT8 expression is similar in the adult rat testis to the mouse, except for a faint labeling detected in the rat Leydig cells. GLUT3 expression begins before, and it is localized, both in the rat and in the mouse testis, in the spermatocytes, spermatids and in the sperm cells. GLUT3 expression is mainly located in the plasma membrane, although immunoreactivity is not detected in the sperm head. Streptozotocin induced diabetes in rats does not induce changes in GLUT8 or GLUT3 expression levels or cellular distribution. In addition, insulin expression has been detected in the testis. Insulin is present in elongated spermatids and it is concentrated in the residual body of spermatids mature. Its expression levels are declined in the diabetic testis, but the immunohistochemical localization is not altered. Adult facial nerve axotomy, a lesion that does not provoke a massive cell death, induces GLUT8 upregulation detected by immunohistochemistry at 3 and 8 days after axotomy. GLUT1, GLUT3 and GLUT4 levels are not altered by this lesion. The same nerve injury in neonatal mice, which produces a massive motoneuronal cell death, does not vary the levels of any of the glucose transporters studied in the expressing cells. These results suggest that GLUT8 could play an important role in the fuel supply of spermatozoa, and in the traffic of sugars during the capacitation and fertilization processes. They also suggest that the mechanisms of glucose transport in the testes are not affected by streptozotocin induced diabetes and that the insulin of testicular origin could regulate these processes and other mechanisms in the spermatogenesis. The upregulation of GLUT8 after facial nerve axotomy in the adult could reveal a role for this transporter in the glucose homeostasis of the processes leading to cell recovery after axotomy.

IX. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Haila, A., and Tulsiani, D. R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379, 173-82.
- Alpers, D. H. (1994). Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. . In "Physiology of the gastrointestinal tract, " (L. R. e. Johnson, Ed.), pp. 1723-1749. Raven Press, New York:.
- Alquier, T., Leloup, C., Lorsignol, A., and Penicaud, L. (2006). Translocable glucose transporters in the brain: where are we in 2006? *Diabetes* 55 Suppl 2, S131-8.
- Andersen, G., Rose, C. S., Hamid, Y. H., Drivsholm, T., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., and Pedersen, O. (2003). Genetic variation of the GLUT10 glucose transporter (SLC2A10) and relationships to type 2 diabetes and intermediary traits. *Diabetes* 52, 2445-8.
- Anderson, J. E., and Thliveris, J. A. (1986). Testicular histology in streptozotocin-induced diabetes. *Anat Rec* 214, 378-82.
- Anderson, J. E., and Thliveris, J. A. (1987). Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat* 180, 41-8.
- Ando, S., and Aquila, S. (2005). Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 245, 1-6.
- Angulo, C., Rauch, M. C., Droppelmann, A., Reyes, A. M., Slebe, J. C., Delgado-Lopez, F., Guaiquil, V. H., Vera, J. C., and Concha, II. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem* 71, 189-203.
- Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., and Ando, S. (2005). Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology* 146, 552-7.
- Augustin, R., Riley, J., and Moley, K. H. (2005). GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 6, 1196-212.
- Baccetti, B., La Marca, A., Piomboni, P., Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F., and De Leo, V. (2002). Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 17, 2673-7.
- Badr, G. A., Tang, J., Ismail-Beigi, F., and Kern, T. S. (2000). Diabetes downregulates GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes* 49, 1016-21.
- Bajpai, M., Gupta, G., and Setty, B. S. (1998). Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 138, 322-7.
- Ballester, J., Munoz, M. C., Dominguez, J., Rigau, T., Guinovart, J. J., and Rodriguez-Gil, J. E. (2004). Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 25, 706-19.
- Benomar, Y., Naour, N., Aubourg, A., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., Guerre-Millo, M., and Taouis, M. (2006). Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology* 147, 2550-6.

- Birnbaum, M. J. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57, 305-15.
- Blakemore, S. J., Aledo, J. C., James, J., Campbell, F. C., Lucocq, J. M., and Hundal, H. S. (1995). The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem J* 309 (Pt 1), 7-12.
- Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (1990). The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 174-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brant, A. M., Jess, T. J., Milligan, G., Brown, C. M., and Gould, G. W. (1993). Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 1297-302.
- Bryant, N. J., Govers, R., and James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 267-77.
- Burant, C. F., and Davidson, N. O. (1994). GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol* 267, R1488-95.
- Burant, C. F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G. I., and Davidson, N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 267, 14523-6.
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49, 1643-8.
- Burcelin, R., and Thorens, B. (2001). Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion. *Diabetes* 50, 1282-9.
- Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M., Cui, Y., Pingsterhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., Devaskar, S. U., and Moley, K. H. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7313-8.
- Carosa, E., Radico, C., Giansante, N., Rossi, S., D'Adamo, F., Di Stasi, S. M., Lenzi, A., and Jannini, E. A. (2005). Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. *Int J Androl* 28, 99-106.
- Clermont, Y., and Tang, X. M. (1985). Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec* 213, 33-43.
- Coucke, P. J., Willaert, A., Wessels, M. W., Callewaert, B., Zoppi, N., De Backer, J., Fox, J. E., Mancini, G. M., Kambouris, M., Gardella, R., Facchetti, F., Willems, P. J., Forsyth, R., Dietz, H. C., Barlati, S., Colombi, M., Loeys, B., and De Paepe, A. (2006). Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet* 38, 452-7.
- Cunha, D. A., Carneiro, E. M., Alves Mde, C., Jorge, A. G., de Sousa, S. M., Boschero, A. C., Saad, M. J., Velloso, L. A., and Rocha, E. M. (2005). Insulin secretion by rat lacrimal glands: effects of systemic and local variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E768-75.

- Charron, M. J., Brosius, F. C., 3rd, Alper, S. L., and Lodish, H. F. (1989). A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2535-9.
- Chen, Y., Nagpal, M. L., and Lin, T. (2003). Expression and regulation of glucose transporter 8 in rat Leydig cells. *J Endocrinol* 179, 63-72.
- Cheng, C. M., Reinhardt, R. R., Lee, W. H., Joncas, G., Patel, S. C., and Bondy, C. A. (2000). Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10236-41.
- Choeiri, C., Staines, W., and Messier, C. (2002). Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience* 111, 19-34.
- Choeiri, C., Staines, W., Miki, T., Seino, S., and Messier, C. (2005). Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience* 130, 591-600.
- Dawson, P. A., Mychaleckyj, J. C., Fossey, S. C., Mihic, S. J., Craddock, A. L., and Bowden, D. W. (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 74, 186-99.
- Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K., and Zahm, D. S. (1994). Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 269, 8445-54.
- Dobrogowska, D. H., and Vorbrod, A. W. (1999). Quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier glucose transporter (GLUT-1) in four regions of mouse brain. *J Histochem Cytochem* 47, 1021-30.
- Doerge, H., Bocianski, A., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 350 Pt 3, 771-6.
- Doerge, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359, 443-9.
- Doerge, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., and Joost, H. G. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 275, 16275-80.
- Doerge, H., Schurmann, A., Ohnimus, H., Monser, V., Holman, G. D., and Joost, H. G. (1998). Serine-294 and threonine-295 in the exofacial loop domain between helices 7 and 8 of glucose transporters (GLUT) are involved in the conformational alterations during the transport process. *Biochem J* 329 (Pt 2), 289-93.
- Duelli, R., and Kuschinsky, W. (2001). Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci* 16, 71-6.
- Dwyer, D., Vannucci, SJ, Simpson, IA. (2002). Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in the brain. In "Glucose Metabolism in the brain" (R. Bradley, Harris, RA, Jenner, P, Ed.), Vol. 51, pp. 159-188. Academic Press, San Diego, California, USA.
- El-Remessy, A. B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N. T., Caldwell, R. B., and Liou, G. I. (2006). Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 168, 235-44.

- El Messari, S., Ait-Ikhlef, A., Ambroise, D. H., Penicaud, L., and Arluison, M. (2002). Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Chem Neuroanat* 24, 225-42.
- El Messari, S., Leloup, C., Quignon, M., Brisorgueil, M. J., Penicaud, L., and Arluison, M. (1998). Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 399, 492-512.
- Eng, J., and Yalow, R. S. (1981). Evidence against extrapancreatic insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4576-8.
- Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Di Stefano, G., Casoli, T., Gracciotti, N., Solazzi, M., and Pompei, P. (2001). Quantitative immunohistochemistry of glucose transport protein (Glut3) expression in the rat hippocampus during aging. *J Histochem Cytochem* 49, 671-2.
- Fladeby, C., Skar, R., and Serck-Hanssen, G. (2003). Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1593, 201-8.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I., and Seino, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264, 7776-9.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., and Bell, G. I. (1988). Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes* 37, 657-61.
- Gerhart, D. Z., Broderius, M. A., Borson, N. D., and Drewes, L. R. (1992). Neurons and microvessels express the brain glucose transporter protein GLUT3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 733-7.
- Goldman, N. A., Katz, E. B., Glenn, A. S., Weldon, R. H., Jones, J. G., Lynch, U., Fezzari, M. J., Runowicz, C. D., Goldberg, G. L., and Charron, M. J. (2006). GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol*.
- Gómez, O., Romero, A., Peris B., Mesonero, J.E., Terrado, J. (2004). Expression of the glucose transporter GLUT8 in the mouse small and large intestine. In "19th meeting european intestinal transport group" (F. Ponz, Ed.), Vol. 60, pp. Journal of Physiology and Biochemistry, 60:153, Guilford, Reino Unido.
- Gorovits, N., Cui, L., Busik, J. V., Ranalletta, M., Hauguel de-Mouzou, S., and Charron, M. J. (2003). Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology* 144, 1703-11.
- Grootegeod, J. A., Siep, M., and Baarends, W. M. (2000). Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 331-43.
- Guegan, C., and Przedborski, S. (2003). Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111, 153-61.
- Guillam, M. T., Dupraz, P., and Thorens, B. (2000). Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49, 1485-91.
- Guo, X., Geng, M., and Du, G. (2005). Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet* 43, 175-87.

- Guo, Z., Kindy, M. S., Kruman, I., and Mattson, M. P. (2000). ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation impairs cerebral synaptic glucose and glutamate transport and exacerbates ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 463-8.
- Gupta, A., Ho, D. Y., Brooke, S., Franklin, L., Roy, M., McLaughlin, J., Fink, S. L., and Sapolsky, R. M. (2001). Neuroprotective effects of an adenoviral vector expressing the glucose transporter: a detailed description of the mediating cellular events. *Brain Res* 908, 49-57.
- Haber, R. S., Weinstein, S. P., O'Boyle, E., and Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 132, 2538-43.
- Hess, R. A. (1999). Spermatogenesis, overview *In* "Encyclopedia of Reproduction. " (J. D. N. E. Knobil, Ed.), Vol. 4, pp. 539-545. Academic Press.
- Ibberson, M., Riederer, B. M., Uldry, M., Guhl, B., Roth, J., and Thorens, B. (2002). Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology* 143, 276-84.
- Ibberson, M., Uldry, M., and Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 275, 4607-12.
- Ito, D., Tanaka, K., Nagata, E., Suzuki, S., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (1999). Uncoupling of cerebral blood flow and glucose utilization in the regenerating facial nucleus after axotomy. *Neurosci Res* 35, 207-15.
- Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E., and Scrutchfield, W. L. (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60-61, 471-80.
- Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H., Moley, J. F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., and Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E974-6.
- Joost, H. G., and Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18, 247-56.
- Kaestner, K. H., Christy, R. J., McLenithan, J. C., Braiterman, L. T., Cornelius, P., Pekala, P. H., and Lane, M. D. (1989). Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3150-4.
- Kasanicki, M. A., Cairns, M. T., Davies, A., Gardiner, R. M., and Baldwin, S. A. (1987). Identification and characterization of the glucose-transport protein of the bovine blood/brain barrier. *Biochem J* 247, 101-8.
- Kayano, T., Burant, C. F., Fukumoto, H., Gould, G. W., Fan, Y. S., Eddy, R. L., Byers, M. G., Shows, T. B., Seino, S., and Bell, G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 265, 13276-82.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R. L., Fan, Y. S., Byers, M. G., Shows, T. B., and Bell, G. I. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263, 15245-8.

- Keembiyehetty, C., Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Steer, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., and Moley, K. H. (2006). Mouse glucose transporter 9 splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes. *Mol Endocrinol* 20, 686-97.
- Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Nakahara, T., Hara, M., and Chan, L. (2004). Extraprostatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2458-63.
- Kojima, H., Fujimiya, M., Terashima, T., Kimura, H., and Chan, L. (2006). Extraprostatic Proinsulin/Insulin-expressing Cells in Diabetes Mellitus: Is History Repeating Itself? *Endocr J*.
- Kokk, K., Verajankorva, E., Wu, X. K., Tapfer, H., Poldoja, E., and Pollanen, P. (2004). Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in the mouse, rat and human testis. *Medicina (Kaunas)* 40, 156-60.
- Kokk, K., Verajankorva, E., Wu, X. K., Tapfer, H., Poldoja, E., Simovart, H. E., and Pollanen, P. (2007). Expression of insulin signaling transmitters and glucose transporters at the protein level in the rat testis. *Ann N Y Acad Sci* 1095, 262-73.
- Krester, D. M., Loveland, K.L., Simorangkir, D., Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. In "Human Reproduction", Vol. 13, pp. 1-8. Saunders.
- Li, B., Xi, X., Roane, D. S., Ryan, D. H., and Martin, R. J. (2003). Distribution of glucokinase, glucose transporter GLUT2, sulfonylurea receptor-1, glucagon-like peptide-1 receptor and neuropeptide Y messenger RNAs in rat brain by quantitative real time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 113, 139-42.
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J. D., Chen, X. Z., and Cheeseman, C. I. (2004). Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G236-42.
- Linden, K. C., DeHaan, C. L., Zhang, Y., Glowacka, S., Cox, A. J., Kelly, D. J., and Rogers, S. (2006). Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT12 in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F205-13.
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H. G., Cushman, S. W., and Al-Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J* 358, 517-22.
- Macheda, M. L., Williams, E. D., Best, J. D., Wlodek, M. E., and Rogers, S. (2003). Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res* 311, 91-7.
- Maher, F., Vannucci, S. J., and Simpson, I. A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *Faseb J* 8, 1003-11.
- Manolescu, A., Salas-Burgos, A. M., Fischbarg, J., and Cheeseman, C. I. (2005). Identification of a hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by the facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT7). *J Biol Chem* 280, 42978-83.
- Mantych, G. J., James, D. E., and Devaskar, S. U. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132, 35-40.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115, 3545-53.

- Matschinsky, F. M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-41.
- Maurer, M. H., Geomor, H. K., Burgers, H. F., Schelshorn, D. W., and Kuschinsky, W. (2006). Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression. *FEBS Lett* 580, 4430-4.
- McCall, A. L., Van Bueren, A. M., Moholt-Siebert, M., Cherry, N. J., and Woodward, W. R. (1994). Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res* 659, 292-7.
- McCarrey, J. (1993). Development of the germ cell. In "Cell and Molecular biology of the testis" (C. Desjardins, Ewing LL, Ed.), pp. 58-89. Oxford University Press, New York.
- McEwen, B. S., and Reagan, L. P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490, 13-24.
- McLachlan, R. I., Wreford, N. G., O'Donnell, L., de Kretser, D. M., and Robertson, D. M. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148, 1-9.
- McLaughlin, J., Roozendaal, B., Dumas, T., Gupta, A., Ajilore, O., Hsieh, J., Ho, D., Lawrence, M., McGaugh, J. L., and Sapolsky, R. (2000). Sparing of neuronal function postseizure with gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12804-9.
- McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R., and Chen, Y. T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72, 113-7.
- Membrez, M., Hummler, E., Beermann, F., Haefliger, J. A., Savioz, R., Pedrazzini, T., and Thorens, B. (2006). GLUT8 is dispensable for embryonic development but influences hippocampal neurogenesis and heart function. *Mol Cell Biol* 26, 4268-76.
- Miyamoto, K., Tatsumi, S., Morimoto, A., Minami, H., Yamamoto, H., Sone, K., Taketani, Y., Nakabou, Y., Oka, T., and Takeda, E. (1994). Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem J* 303 (Pt 3), 877-83.
- Moran, L. B., and Graeber, M. B. (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev* 44, 154-78.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-5.
- Naz, R. K., and Padman, P. (1999). Identification of insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in human sperm cell. *Arch Androl* 43, 153-9.
- Nehlig, A., Rudolf, G., Leroy, C., Rigoulot, M. A., Simpson, I. A., and Vannucci, S. J. (2006). Pentylentetrazol-induced status epilepticus up-regulates the expression of glucose transporter mRNAs but not proteins in the immature rat brain. *Brain Res* 1082, 32-42.
- Obrosova, I. G., Pacher, P., Szabo, C., Zsengeller, Z., Hirooka, H., Stevens, M. J., and Yorek, M. A. (2005). Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes* 54, 234-42.
- Oko, R., and Clermont, Y. (1999). Spermiogenesis. In "Encyclopedia of Reproduction" (J. D. N. E. Knobil, Ed.), Vol. 4, pp. 602-609. Academic Press.

- Oonk, R. B., and Grootegoed, J. A. (1987). Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 49, 51-62.
- Payne, J., Maher, F., Simpson, I., Mattice, L., and Davies, P. (1997). Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia* 21, 327-31.
- Perrelet, D., Ferri, A., MacKenzie, A. E., Smith, G. M., Korneluk, R. G., Liston, P., Sagot, Y., Terrado, J., Monnier, D., and Kato, A. C. (2000). IAP family proteins delay motoneuron cell death in vivo. *Eur J Neurosci* 12, 2059-67.
- Phay, J. E., Hussain, H. B., and Moley, J. F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66, 217-20.
- Pinto, A. B., Carayannopoulos, M. O., Hoehn, A., Dowd, L., and Moley, K. H. (2002). Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol Reprod* 66, 1729-33.
- Piroli, G. G., Grillo, C. A., Hoskin, E. K., Znamensky, V., Katz, E. B., Milner, T. A., McEwen, B. S., Charron, M. J., and Reagan, L. P. (2002). Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUT8 glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 452, 103-14.
- Rajakumar, A., Thamocharan, S., Raychaudhuri, N., Menon, R. K., and Devaskar, S. U. (2004). Trans-activators regulating neuronal glucose transporter isoform-3 gene expression in mammalian neurons. *J Biol Chem* 279, 26768-79.
- Ramalho-Santos, J., Schatten, G., and Moreno, R. D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67, 1043-51.
- Rand, E. B., Depaoli, A. M., Davidson, N. O., Bell, G. I., and Burant, C. F. (1993). Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol* 264, G1169-76.
- Rayner, D. V., Thomas, M. E., and Trayhurn, P. (1994). Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* 72, 476-9.
- Reagan, L. P. (2002). Glucose, stress, and hippocampal neuronal vulnerability. *Int Rev Neurobiol* 51, 289-324.
- Reagan, L. P., Gorovits, N., Hoskin, E. K., Alves, S. E., Katz, E. B., Grillo, C. A., Piroli, G. G., McEwen, B. S., and Charron, M. J. (2001). Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2820-5.
- Reagan, L. P., Rosell, D. R., Alves, S. E., Hoskin, E. K., McCall, A. L., Charron, M. J., and McEwen, B. S. (2002). GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 932, 129-34.
- Rogers, S., Macheda, M. L., Docherty, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., Gibbs, E. M., James, D. E., and Best, J. D. (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E733-8.
- Romero, A., Terrado, J., Brot-Laroche, E., and Mesonero, J. E. (2007). Glucose transporter GLUT8 mRNA expression in intestinal Caco-2 cells is regulated by growth and metabolism. *Horm Metab Res* 39, 62-4.

- Rosenzweig, J. L., Havrankova, J., Lesniak, M. A., Brownstein, M., and Roth, J. (1980). Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 572-6.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha Hikim, A. P., and GClegg, E. D. (1990). "Histological and histopathological evaluation of the testis." Cache River Press, St. Louis, MO, USA.
- Russo, V. C., Kobayashi, K., Najdovska, S., Baker, N. L., and Werther, G. A. (2004). Neuronal protection from glucose deprivation via modulation of glucose transport and inhibition of apoptosis: a role for the insulin-like growth factor system. *Brain Res* 1009, 40-53.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). "Molecular Cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanguinetti, R. E., Ogawa, K., Kurohmaru, M., and Hayashi, Y. (1995). Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after streptozotocin administration. *Exp Anim* 44, 71-3.
- Sankar, R., Thamocharan, S., Shin, D., Moley, K. H., and Devaskar, S. U. (2002). Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 157-65.
- Santalucia, T., Palacin, M., and Zorzano, A. (2006). T3 strongly regulates GLUT1 and GLUT3 mRNA in cerebral cortex of hypothyroid rat neonates. *Mol Cell Endocrinol* 251, 9-16.
- Scheepers, A., Doege, H., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2001). Mouse GLUT8: genomic organization and regulation of expression in 3T3-L1 adipocytes by glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 969-74.
- Scheepers, A., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28, 364-71.
- Scheepers, A., Schmidt, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., Bell, A., Zahn, C., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2005). Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol* 22, 339-51.
- Schiffer, M., Susztak, K., Ranalletta, M., Raff, A. C., Bottinger, E. P., and Charron, M. J. (2005). Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F186-93.
- Schurmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., and Joost, H. G. (2002). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307, 237-42.
- Shepherd, P. R., and Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341, 248-57.
- Shin, B. C., McKnight, R. A., and Devaskar, S. U. (2004). Glucose transporter GLUT8 translocation in neurons is not insulin responsive. *J Neurosci Res* 75, 835-44.
- Simpson, I. A., Appel, N. M., Hokari, M., Oki, J., Holman, G. D., Maher, F., Koehler-Stec, E. M., Vannucci, S. J., and Smith, Q. R. (1999). Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem* 72, 238-47.
- Simpson, I. A., Vannucci, S. J., DeJoseph, M. R., and Hawkins, R. A. (2001). Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J Biol Chem* 276, 12725-9.

- Smith, C. B., Crane, A. M., Kadekaro, M., Agranoff, B. W., and Sokoloff, L. (1984). Stimulation of protein synthesis and glucose utilization in the hypoglossal nucleus induced by axotomy. *J Neurosci* 4, 2489-96.
- Sonntag, W. E., Bennett, C., Ingram, R., Donahue, A., Ingraham, J., Chen, H., Moore, T., Brunso-Bechtold, J. K., and Riddle, D. (2006). Growth hormone and IGF-I modulate local cerebral glucose utilization and ATP levels in a model of adult-onset growth hormone deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E604-10.
- Stuart, C. A., Wen, G., and Jiang, J. (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism* 48, 876-80.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 537-46.
- Terrado, J., Monnier, D., Perrelet, D., Sagot, Y., Mattenberger, L., King, B., and Kato, A. C. (2000). NGF-induced motoneuron cell death depends on the genetic background and motoneuron sub-type. *Neuroreport* 11, 1473-7.
- Thorens, B., Flier, J. S., Lodish, H. F., and Kahn, B. B. (1990). Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment. *Diabetes* 39, 712-9.
- Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., and Lodish, H. F. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-90.
- Travis, A. J., Tutuncu, L., Jorgez, C. J., Ord, T. S., Jones, B. H., Kopf, G. S., and Williams, C. J. (2004). Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilization in the mouse. *Biol Reprod* 71, 139-45.
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., and Pereira, B. M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240, 151-64.
- Uemura, E., and Greenlee, H. W. (2006). Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp Neurol* 198, 48-53.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J. D., Chatton, J. Y., Riederer, B. M., and Thorens, B. (2001). Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* 20, 4467-77.
- Uldry, M., and Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447, 480-9.
- Urner, F., and Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 125, 17-26.
- Vannucci, S. J., Koehler-Stec, E. M., Li, K., Reynolds, T. H., Clark, R., and Simpson, I. A. (1998). GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* 797, 1-11.
- Vannucci, S. J., and Simpson, I. A. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1127-34.
- Widmer, M., Uldry, M., and Thorens, B. (2005). GLUT8 subcellular localization and absence of translocation to the plasma membrane in PC12 cells and hippocampal neurons. *Endocrinology* 146, 4727-36.

- Wood, I. S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.
- Wright, E. M., and Turk, E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447, 510-8.
- Yoshinaga, K., and Toshimori, K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech* 61, 39-45.
- Zhao, F. Q., Miller, P. J., Wall, E. H., Zheng, Y. C., Dong, B., Neville, M. C., and McFadden, T. B. (2004). Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression, and developmental regulation in mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1680, 103-13.
- Zindy, F., den Besten, W., Chen, B., Rehg, J. E., Latres, E., Barbacid, M., Pollard, J. W., Sherr, C. J., Cohen, P. E., and Roussel, M. F. (2001). Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Mol Cell Biol* 21, 3244-55.