

*“Res és verí, i tot és verí, la  
diferència està en la dosi”*

*Theophrastus Bompert*

*“Mitjançant les xifres, es pot  
demostrar qualsevol cosa”*

*Thomas Carlyle*

### III. MATERIALS I MÈTODES

#### 1. Materials.

##### 1.1. Animals d'experimentació.

Es van utilitzar com animals d'experimentació rates i ratolins. Els ratolins eren albins adults, mascles i femelles, de la soca Swiss (Criffa, Barcelona), amb un pes mitjana d'entre 28-34 g. Les rates eren albines, mascles, de la soca Sprague-Dawley (Criffa, Barcelona), amb un pes mitjana d'entre 250-300 g. Els animals van ser acomodats a l'estabulari en gàbies de Makrolon, sota condicions estàndard de temperatura ( $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humitat relativa ( $50\pm 10\%$ ) i un cicle de llum-fosc de 12 hores diàries (llum 08:00-20:00h). En tot moment els animals van rebre aigua de l'aixeta (excepte en els grups tractats per intoxicació oral) i menjar (dieta estàndard Panlab, A04 per rosegadors, Barcelona) "ad libitum". Es deixava sempre als animals un període d'aclimatació de 7 dies abans de començar l'experiment.

En tot moment es varen seguir les normes per a la manipulació d'animals d'experimentació (Generalitat de Catalunya). Tots els procediments van ser aprovats pel Comitè ètic del Centre.

##### 1.2. Reactius i agents químics.

Es van utilitzar els següents reactius:

- Hidrocortisona, (HC), Sigma-Aldrich Química, Alcobendas, en una solució a l'1% d'etanol:
  - Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), amb una puresa del 99%, Sigma-Aldrich Química, Alcobendas.
- Clorur de manganès tetrahidratat ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich Química, Alcobendas.

- Altres:
  - Transparentació de fetus: etanol, àcid pícric, formol, acetona, alizarina
  - Digestions de mostres: àcid nítric, àcid perclòric (HClO<sub>4</sub>)

### 1.3. Material específic.

#### a) Gàbies d'immobilització

Per la immobilització dels animals es van utilitzar gàbies d'immobilització “cepos para roedores” (Panlab S.L., Leticia, Barcelona), fabricades a partir de cilindres de metacrilat transparent, muntat sobre una base de metacrilat negre amb forats. Segons les necessitats de cada experiment es varen utilitzar tres mides diferents de gàbies. Per ratolins de fins a 30 g, per ratolins de fins a 50 g i per rates de fins a 400 g (*annex 2*).

#### b) Emissor d'ultrasons

L'estrès per soroll a que eren sotmesos els animals es generava a través d'un emissor d'ultrasons o generador acústic “Radarcán” (SC-11R, Ahuyenta roedores, Fadisel S.L., Barcelona, CEBEK, Electronic circuits), de 2000 Hz i 100 db.

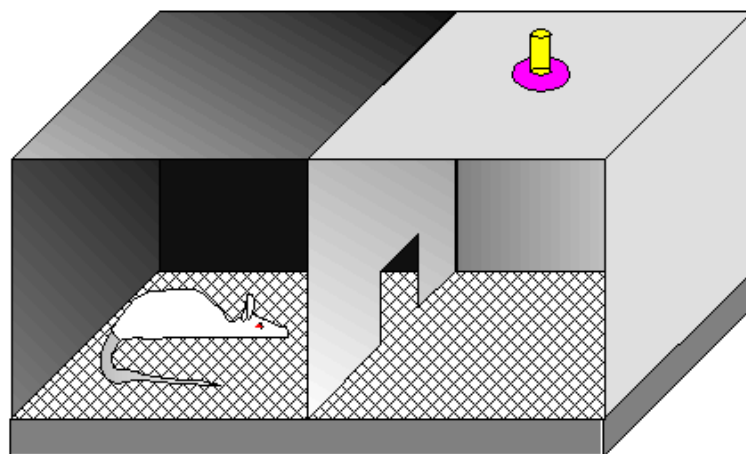
#### c) Aparells per la realització dels diferents tests als animals

- *Rotarod* (Leticia, Barcelona, Espanya): és un aparell que consta d'un cilindre amb moviment giratori (a una velocitat constant de 10 r.p.m. o amb acceleració de fins a 40 r.p.m.) en el que es situa a l'animal per valorar la resistència i la coordinació motora.
- *Mesurador de força*. Per mesurar la força a les extremitats anteriors dels rosegadors es va utilitzar un mesurador de força “Grip Strength Meter” (Ugo Basile, Itàlia). L'animal es posa sobre una base plana, on al davant té un triangle metàl·lic o “agafador”, connectat a un transductor de força. Quan estirem l'animal per la cua aquest agafa instintivament el triangle

metàl·lic. Els rosegadors s'agafen a qualsevol cosa disponible per parar el moviment involuntari cap enrera, fins que la força que fem nosaltres sobrepassa la força de l'animal per agafar-se. Un cop l'animal deixa el triangle metàl·lic, l'amplificador automàticament guarda el valor més alt de força de l'animal (*annex 3*).

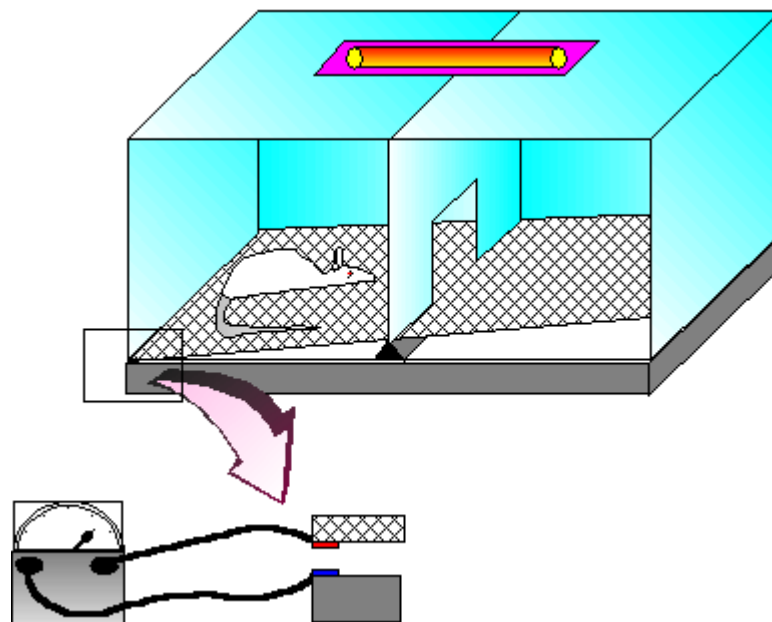
- *Evitació passiva "Passive avoidance"*: l'aparell d'evitació passiva consisteix en una caixa fabricada amb *perspex* i dividida en dues seccions, el compartiment de sortida i el d'escapament. El compartiment de sortida és blanc i il·luminat (bombeta de 24v-10w). El compartiment d'escapament és fosc. Entre els dos compartiments hi ha una porta de guillotina. La base és una reixeta, a través de la qual s'administra el shock elèctric a l'animal quan aquest canvia del compartiment clar al fosc.

Les dimensions de l'aparell per ratolins són de 39 x 9.5 x 17 cm (ref. 7553) i les dimensions de l'aparell per rates són de 40 x 20 x 20 cm (ref. 7550). Aquest està connectat a un controlador que registra la latència d'entrada de l'animal al compartiment fosc, en el qual es pot fixar el temps que passa entre que introduïm l'animal i s'obra la porta, la duració i la intensitat del shock, a més del temps màxim per cada intent. "Passive Avoidance Apparatus", Panlab S.L., Ugo Basile, Itàlia (*figura III.1, annex 4*).



*Figura III.1. Test d'Evitació Passiva.*

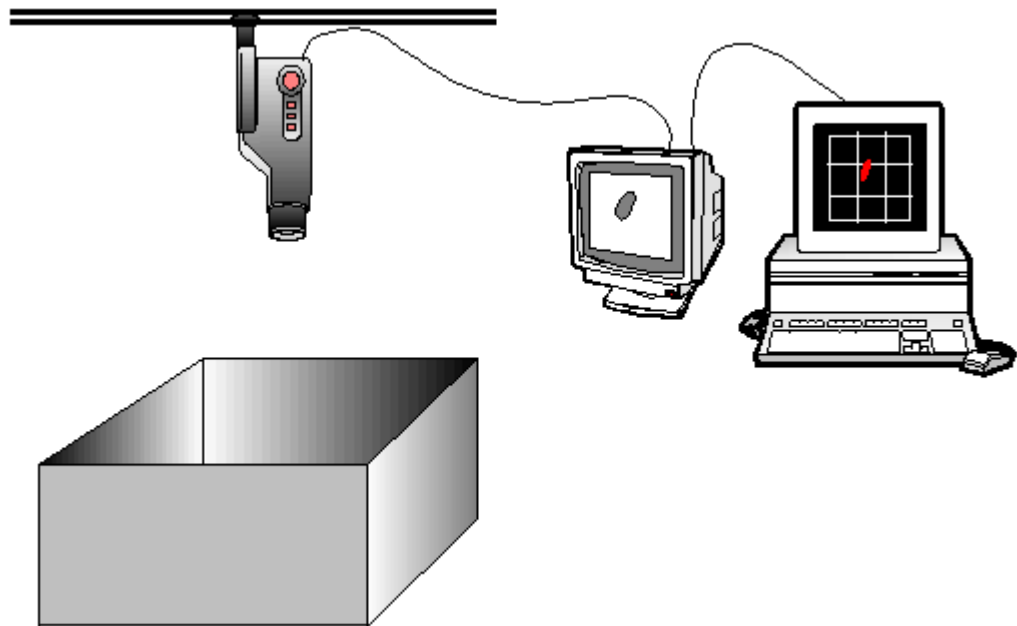
- *Evitació activa “Active avoidance”*, l’aparell d’evitació activa consisteix en una caixa feta de *perspex*, dividida en dos seccions amb una porta/forat que les comunica a nivell de la base. La base és una reixeta, a través de la qual s’administra el shock elèctric. Dins la gàbia l’intensitat lluminosa és de 5 lux quan la llum està apagada. La gàbia té una llum que s’encén de 10w i també es pot emetre un so (acompanyant a l’estímul lluminós), que es pot fixar entre 60-90 db i 110-2000 Hz. Les dimensions de l’aparell per rates són de 55 x 33 x 33 cm (ref. 7530). Aquest està connectat a una unitat de programació i gravació de les dades de l’actuació de l’animal. “Automatic Reflex Conditioner”, Panlab S.L., Ugo Basile, Itàlia. (*figura III.2, annex 5*).



*Figura III.2. Test d’Evitació Activa.*

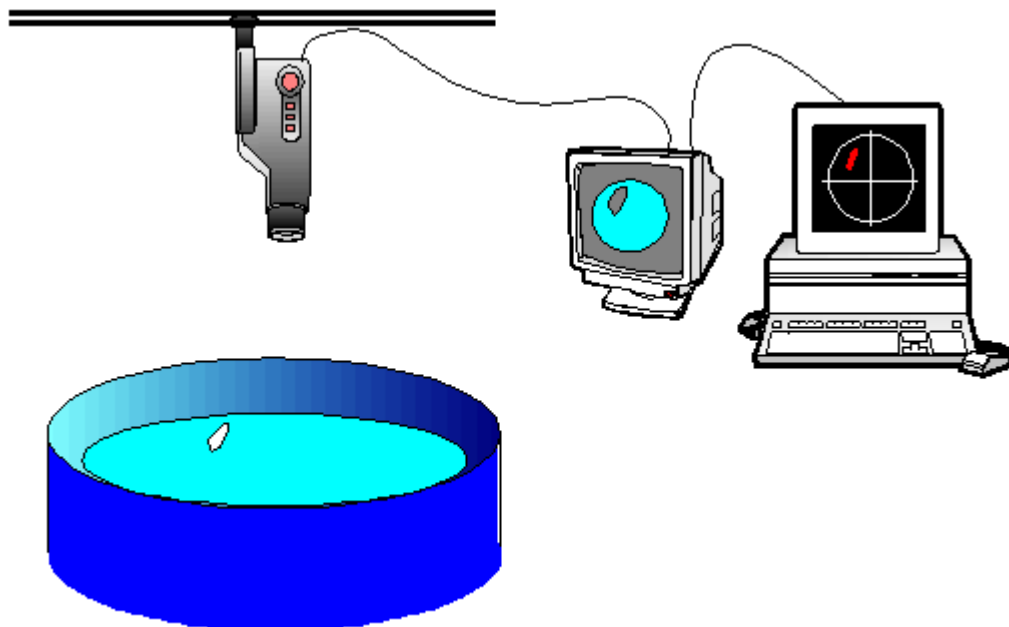
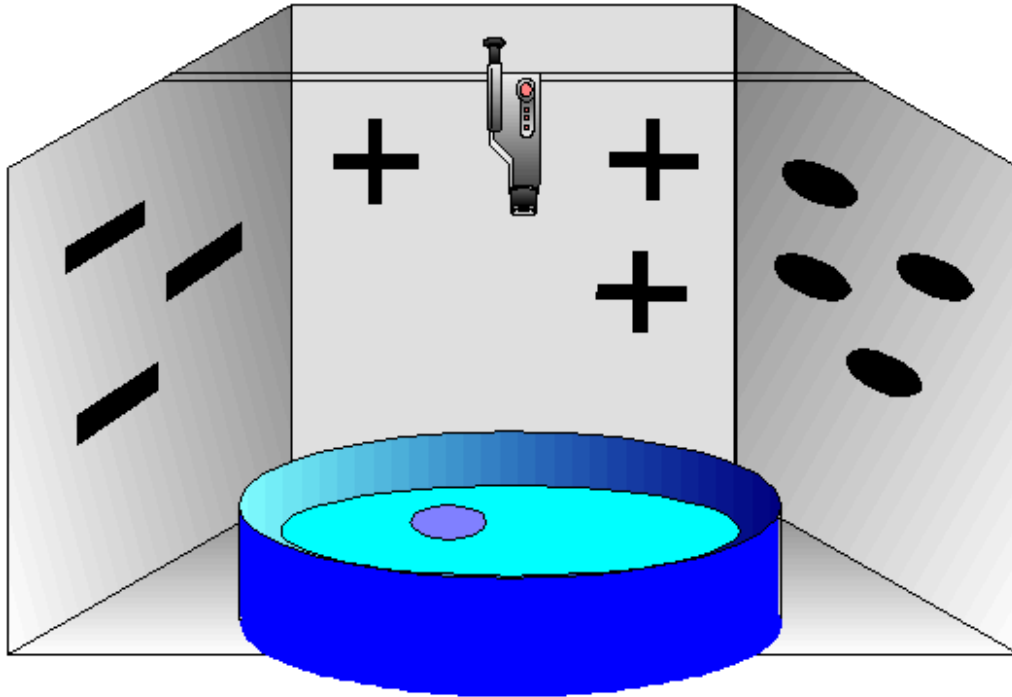
- *Camp obert “Open field”*. Per la realització del test del camp obert, el recinte utilitzat per col·locar l’animal era de fusta plastificada amb una superfície de 80 x 80 cm per rates i 38 x 38 cm per ratolins, amb unes

parets d'alçada de 47 cm i obert per la part superior. L'interior podia estar il·luminat de forma indirecta per un llum blanc de 60 w de potència. A 2.5 metres per damunt de la superfície i centrada, es trobava col·locada la càmera per al registre de les imatges connectada a un ordinador. Per l'obtenció i anàlisi de dades es va utilitzar l'equip Ethovision, versió 1.70 de Noldus Technology (sistema integrat de gravació en vídeo, anàlisi de moviment i reconeixement de patrons de conducta) (*figura III.3*).



*Figura III.3.* Esquema del test del Camp Obert amb el sistema integrat Ethovision 1.70.

- *Laberint d'aigua de Morris "Water maze"*. Per la realització de la prova del laberint d'aigua, descrit per primera vegada per Morris (Morris, 1984), el recinte era una piscina de 160 cm de diàmetre, amb una paret de 60 cm d'alçada. Dins de la piscina i submergida a 1 cm del nivell de l'aigua dipositàvem una plataforma cilíndrica de 12 cm de diàmetre i 20 cm d'alçada de plàstic transparent. Les parets que envoltaven la piscina eren de rajola blanca amb senyals geomètriques diferents a cadascuna d'elles. A 2.5 metres de la base i centrada, es trobava col·locada la càmera pel registre d'imatges, connectada a l'equip Ethovision 1.70 (*figura III.4*).



*Figura III.4.* Esquemes del test del Laberint d'Aigua amb el sistema integrat Ethovision 1.70.

- *Bateria d'observació funcional "FOB"*. Per la realització de la Bateria Funcional o "FOB", el recinte era de plàstic, d'un diàmetre de 50.5 cm. Les parets eren de 21 cm d'alçada.

d) Altres instruments

- Cronòmetre
- Lupa (x20) per l'examen dels fetus
- Làmina de fullola per valorar el reflex de geotaxi: dimensions 12 x 25 cm



## 2. Metodologia general.

### 2.1. Aparellament i identificació dels animals.

Després d'un període d'aclimatació de 7 dies, les femelles es van aparellar amb els mascles, durant 2 hores al matí (de 10:00-12:00h). Seguidament es retiraven els mascles i s'examinava a les femelles considerant el tap vaginal com a indicatiu de copulació, i assignant aquest dia com a dia 0 de gestació. Les femelles positives es separaven de la resta i eren distribuïdes de forma aleatòria als grups de tractament.

### 2.2. Preparació i administració de solucions.

- Hidrocortisona (HC)

L'hidrocortisona va ser diluïda a l'1% d'etanol. S'administrava en una sola dosi de 5 mg/kg/dia (al grup control s'administrava H<sub>2</sub>O a l'1% d'etanol). Les solucions eren ajustades diàriament de manera que un animal de 35 g rebia 0.10 ml de volum.

- MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O per administració subcutània

El Mn per a l'administració subcutània s'administrava dissolt en sèrum fisiològic (H<sub>2</sub>O al 0.9% NaCl). S'administrava a dosis de 1, 2 ó 4 mg Mn/kg/dia (al grup control se li administrava sèrum salí). Les solucions eren ajustades diàriament de manera que un animal de 35 g rebia un volum de 0.20 ml.

- MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O per administració oral

El Mn per l'administració oral era diluït en aigua de l'aixeta, de manera que els animals rebien 0, 1000 ó 2000 mg MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O/kg/dia. Abans de dissoldre el Mn en aigua es va calcular el que bevien els animals, i es van fer les dissolucions en relació a aquests càlculs.

Les solucions eren corregides en el seu pH quan era necessari, de manera que aquest sempre estava en un valor entre 5-7.

### 2.3. Recollida de dades i tests.

#### I. *Toxicitat materna*

Per avaluar la toxicitat materna durant la gestació es van monitoritzar els següents paràmetres:

- Pes matern (g)
- Ingesta de menjar durant els dies 0-18 de gestació (g/mare)
- Nombre d'avortaments
- Duració de la gestació
- Dia en que es produeix el part

Al dia 18 de gestació, els individus destinats a l'estudi de la toxicitat embriofetal, es van pesar i van ser sacrificats per dislocació cervical i es va extreure l'úter gràvid per avaluar els següents paràmetres:

- Pes de l'úter gràvid (g)
- Pes corregit del cos de l'animal (pes final de gestació – pes de l'úter), (g)
- Canvi del pes corregit del cos (pes corregit del cos – pes en el primer dia de gestació), (g)
- Pes absolut del fetge (g)
- Pes absolut dels ronyons (g)
- Pes del fetge / pes del cos (g)
- Pes dels ronyons / pes del cos (g)

#### II. *Toxicitat embriofetal*

Per avaluar la toxicitat embriofetal es va controlar:

- Nombre d'implantacions totals
- Nombre de reabsorcions
- Percentatge de pèrdues post-implantació
- Nombre de fetus vius i morts

Tots els fetus vius van ser extrets de les banyes de l'úter i se'ls va controlar:

- Pes
- Sexe
- Relació mascles / femelles

També es van comptabilitzar si existien malformacions externes dels fetus vius.

➤ Transparentació i examen dels fetus

Aproximadament, la meitat dels fetus vius obtinguts per cesària de cada ventrada va ser destinat a l'estudi visceral i l'altra meitat a l'estudi esquelètic.

➤ Examen visceral

Els fetus, elegits a l'atzar per l'examen visceral, es van col·locar en recipients degudament identificats en 70% d'etanol. Transcorreguts un mínim de 3 dies en aquesta dissolució, van ser fixats en solució aquosa de "Bouin" (amb una proporció de 15 parts d'àcid pícric saturat i 5 parts de formol al 3-4% i una part d'acetona). Els fetus van romandre una setmana en aquesta solució abans de l'examen visceral. A causa de les emanacions irritants del fixador emprat, els fetus es rentaven amb aigua de l'aixeta durant uns 10 minuts, conservant-los altra vegada en etanol al 70% fins el moment de l'examen visceral (Manson i Kang, 1989; Bosque, 1991).

La valoració de les malformacions viscerals va ser realitzada practicant als fetus diferents talls (Paternain i cols, 1985). Per la visualització de les vísceres abdominals es va practicar un tall a nivell del melic en sentit transversal i un altre longitudinal des del diafragma fins la regió suprapúbica (Manson i Kang, 1989). Això va permetre observar detalladament el tracte gastrointestinal i urogenital, valorar l'existència d'hèrnies diafragmàtiques, i visualitzar les glàndules suprarenals, ronyons i glàndules sexuals.

L'observació de la regió toràcica es va realitzar disseccionant longitudinalment des de la porció inferior del coll fins la zona diafragmàtica a nivell de l'apòfisi xifoïdes (Manson i Kang, 1989). S'observava també en aquesta zona la disposició dels grans vasos, el cor i les seves cavitats, així com la relació que aquest guarda amb el pulmó.

Per observar la cavitat cranial es va practicar un tall horitzontal a nivell de la porció immediatament inferior als pavellons auditius, i es van realitzar talls

transversals des de la zona més anterior (morro del fetus) fins la part posterior (regió occipital). D'aquesta manera s'observava la simetria del septe nasal, paladar, uniformitat i correcta curvatura d'ulls, ventricles cerebrals, etc.

➤ Examen esquelètic

Els fetus destinats a l'examen esquelètic, elegits a l'atzar, es van col·locar en recipients degudament identificats en 70% d'etanol durant 3 dies, seguidament se'ls posava en acetona al 99.8% durant el temps necessari per una completa fixació. Un cop fixats es posaven en hidròxid de potassi (KOH) a l'1%, i es tenyien amb vermell d'alizarina S al 0.002% (Staples, 1975). Un cop tenyits es conservaven amb glicerina al 40% fins el moment de l'examen esquelètic.

Es valorava el tamany, forma del crani i el grau d'ossificació dels ossos frontals, nasals, parietals, occipitals, maxil·lars i mandíbula. Es valorava el tamany, nombre i forma dels cossos vertebrals, costelles i nuclis esternals en tòrax i abdomen. Es va valorar el desenvolupament dels ossos llargs avaluant la cintura escapular i pèlvica, extremitats superiors i inferiors, comptant el nombre de metacarps, metatarsos i falanges pròximes i distants (Hayes, 1989; Rugh, 1990) (*annexos 6, 7, 8*).

### III. Valoració del desenvolupament

Les cries que naixien de forma espontània (el dia 19 de gestació) eren avaluades al primer dia, després del naixement. Vam controlar les següents variables:

- Número de cries que van néixer vives i mortes per ventrada
- Número de cries vives i mortes (cada dia). Amb aquests paràmetres es van calcular els índex de *viabilitat* (número de cries vives al dia 4 / número de cries vives al naixement) i l'índex de *lactància* (número de cries vives al dia 21 / número de cries vives al dia 4)
- Sexe
- Pes de cada cria

De cada ventrada, sempre que va ser possible, i de forma aleatòria, es van deixar amb la mare 3 mascles i 3 femelles. A aquestes 6 cries es va seguir controlant el pes els dies 4, 8, 12 i 21. A banda del control de pes, es va valorar el desenvolupament físic i funcional durant el període postnatal, controlant-se alguns paràmetres ja descrits per Fox al 1965 i ampliat per altres autors (Altman i Sudarshan, 1975; Suter i Schön, 1985; Draski i cols, 1989; Rivera i cols, 1990; Hass i cols, 1995; Kishi i cols, 1995; Bignami, 1996).

Els paràmetres del desenvolupament físic que es varen avaluar eren els següents:

- Desplegament del pavelló auditiu: es va controlar des del dia 3 postnatal fins el dia en que tots els individus de la ventrada tenien els pavellons auditius desplegats. Es calculava la mitjana del dia de desplegament en el grup i es comparava amb les mitjanes dels altres grups.
- Erupció d'incisius: es va controlar des del dia 3 postnatal fins el dia en que en tots els individus de la ventrada s'observaven dos ovals blancs sobre la geniva. Es calculava la mitjana del dia d'erupció d'incisius del grup, i es comparava amb les mitjanes dels grups de tractament.
- Obertura d'ulls: s'examinaven les cries des del dia 12 postnatal fins el dia en que tots els animals de la ventrada tenien els ulls oberts. Es calculava la mitjana del dia d'obertura d'ulls en el grup, i es comparava amb els demés grups de tractament.
- Descens de testicles: s'examinava a partir del dia 21, diàriament, fins que els ratolins mascles se'ls observava el descens dels testicles. Es calculava la mitjana del grup i es comparaven les mitjanes dels diferents grups de tractament.
- Obertura de vagina: es controlava a partir del dia 21, i de forma diària, fins que a les femelles se'ls observava la vagina oberta. Es calculava la mitjana d'obertura de vagina del grup, i es comparava amb els demés grups de tractament.

A més, durant aquest període, vam voler estudiar la *cura materna*. Es va avaluar el temps que tardava la mare (en minuts i segons fins un màxim de 5 minuts ) en tornar les cries al lloc inicial, a partir del moment que els hi canviàvem al cantó oposat de la gàbia.

Per avaluar la *maduració neuromotora* es van realitzar les següents proves:

- Reflex d'adreçament o "Surface righting" (donar-se la volta). Aquesta prova consisteix en col·locar l'animal en posició dorsal sobre una superfície dura i plana. Es controla el temps que tarda (en segons) en donar-se la volta. Aquest test s'aplicava a partir del dia 3 postnatal fins que tots els animals puntuaven 1. Es calculaven les mitjanes diàries de cada grup, i es comparaven amb els demés grups de tractament.
- Geotaxi (o girar-se mirant cap amunt en una superfície inclinada). La prova consistia en col·locar a l'animal en una superfície inclinada amb una inclinació de 30° mirant avall. Es calcula el temps que tarda en girar-se mirant cap amunt. Aquest test s'aplicava els dies 10 i 12 postnatal. Es calculava la mitjana per dia de cada grup, i es comparaven amb els demés grups de tractament.
- Força a les extremitats anteriors. Aquesta prova es passava els dies 9, 11 i 15 postnatal. El dia 9 postnatal s'agafava a l'atzar un animal de la ventrada de cada sexe. El test consistia en col·locar l'animal en una base plana i un cop agafat a un triangle metàl·lic, se l'estirava per la cua cap enrera fins que l'animal es deixava. Es repetia 3 vegades i es prenia el valor més alt. Es calculava la mitjana de cadascun dels dies per grup de tractament i es feien les comparacions de mitjanes entre grups de tractament.
  - Rotarod. Al dia 75 postnatal, s'agafava a l'atzar un animal de la ventrada de cada sexe. El test consistia en la realització durant 2 dies de 3 trials. El primer dia era d'aprenentatge. Es col·locava als animals durant un màxim de 60 segons a 10 r.p.m. durant 3 trials consecutius. El segon dia, 24 h després de l'aprenentatge, es col·locava als animals a 10 r.p.m però incrementant 7 r.p.m. cada minut durant un màxim de 5 minuts. Es repetia

la prova 3 vegades, i s'agafava el millor valor (el temps més alt durant el qual l'animal s'ha aguantat sobre el cilindre). Es calculava la mitjana dels grups, i es comparaven les mitjanes dels grups de tractament.

#### IV. Tests d'aprenentatge (*Valoració conductual*)

Aquests es poden aplicar tant al final de la fase III del desenvolupament en animals joves com en els experiments en animals adults.

- *Camp obert "Open field"*. Aquesta prova permet estudiar diferents paràmetres de l'activitat motora dels animals. Es valora la distància total recorreguda (activitat horitzontal), el nombre d'aixecaments realitzats (activitat vertical) en períodes de temps determinats i el nombre de defecacions de l'animal durant la realització de la prova (reactivitat). L'animal es col·loca en el centre del recinte sota la llum que l'il·lumina. A partir d'aquest moment comença l'observació de l'animal durant el temps que prèviament havíem fixat (en els nostres experiments 15 ó 30 minuts). En els nostres estudis registrem la distància recorreguda com índex d'activitat horitzontal i el nombre d'aixecaments com a índex d'activitat vertical durant els 15 ó 30 minuts, que subdividim en períodes de 5 ó 10 minuts per a la valoració de l'habitució, així com el nombre de defecacions total com a índex de reactivitat (Sánchez i cols, 1998; Colomina i cols, 1999).

Pel registre de totes les accions es va utilitzar l'equip Ethovision, versió 1.70, de Noldus Technology per PC, i una càmera model Sony CCD-IRIS, connectada a un vídeo VHS model Panasonic AG-5700. Aquest equip és un sistema integrat de gravació en vídeo, anàlisi de moviments i reconeixement de patrons de conducta. Permet la gravació automàtica dels moviments de l'animal i el càlcul de la distància recorreguda així com el nombre i durada dels moviments verticals.

Dins del recinte es defineixen dues zones: la perifèria i el centre. La *perifèria* en ratolins ocupava des de les parets del recinte fins a 9.5 cm cap al centre. En rates, la perifèria ocupava des de les parets del recinte fins a 15 cm cap al centre. La zona restant quedava definida com a zona *centre*.

- *Laberint d'aigua de Morris "Water maze"*. Aquest test està dissenyat per valorar l'aprenentatge i la memòria espacial en rosegadors. Així, el laberint d'aigua comporta una tasca de navegació en la qual la rata ha de cercar un objectiu invisible, orientant-se respecte a altres estímuls, que estan a certa distància d'aquest objectiu, però que guarden una relació espacial coneguda amb aquest (Morris, 1981). Sembla ser que els animals fan servir un mapa cognitiu com a representació del seu entorn quan resolen aquesta tasca. Aquest mapa cognitiu comporta una completa representació de l'entorn.

Aquesta prova consisteix doncs bàsicament en una piscina, on hi ha una plataforma submergida o d'escapament, que permet que l'animal deixi de nedar quan arriba a ella, però que no pot veure. En el protocol que fem servir per l'experiment, la plataforma no canvia de lloc en cap dels intents, i l'animal ha de nedar utilitzant les referències espacials per trobar-la. L'animal acaba aprenent a trobar la plataforma gràcies als senyals geomètrics que hi ha a les parets, les quals l'ajudaran a formar-se un mapa cognitiu que serà el que li permetrà localitzar la plataforma.

Per l'adquisició d'aquestes dades també hem utilitzat el sistema integrat Ethovision, versió 1.70. El seu software ajuda al disseny d'experiments, organització de la informació en bases de dades, així com a la visualització de les dades.

Per valorar l'aprenentatge, cada animal té 5 intents o "trials" cada dia durant 4 dies consecutius. Al 5è dia té 4 intents, i a continuació un 5è trial sense plataforma (o també anomenat "trial probe"), en el que valorem el temps que l'animal nada en el quadrant on estava anteriorment situada la plataforma i la distància recorreguda dins d'aquest quadrant. En els trials amb plataforma mesurem el temps que tarden els animals en trobar la plataforma, la velocitat amb que neden i la distància recorreguda en cada intent fins que la troben. En tots els trials també fem recompte de les defecacions o bolus dels animals, que s'utilitzaven com a índex d'ansietat.

Cada trial dura un màxim de 60 segons. Si l'animal no troba la plataforma, se'l col·loca damunt d'ella després de cada trial durant 30 segons (perquè pugui situar-la en el seu mapa cognitiu respecte els demés estímuls). Si la troba, es comencen a comptar els 30 segons des del moment que l'animal hi puja. El temps



---

inter-trial és de 60 segons (60''màx TRIAL + 30''PLAT + 60''descans), (Nagahara i cols, 1995; Almaguer-Melián i cols, 1999).

- *Evitació passiva* “*Passive avoidance*”. Amb aquest test es pot valorar la memòria recent dels animals. El rosegador es situa al compartiment clar o de sortida, i després d'un període variable (60 segons, amb el que considerem que hi ha habituació, ó 3 segons sense habituació), s'obre la porta de separació entre els compartiments, de manera que l'animal pot accedir al compartiment fosc (pel qual es sent atret per la seva condició d'animal nocturn). Transcorreguts alguns segons, l'animal entra de forma espontània al compartiment fosc. El temps que tarda en accedir al compartiment fosc es coneix com període de latència d'adquisició (T1). Un cop dintre, un segon després i de forma automàtica, es tanca la porta de separació i es produeix una descàrrega de 0.3 mA (ratolins) ó 1 mA (rates). Transcorregudes 24 hores, es sotmet a l'animal a la mateixa prova, però sense que es produeixi descàrrega elèctrica. Es va fer una valoració de la memòria calculant el temps que tardava l'animal en accedir al compartiment fosc, latència de record (T2) (Thorne i cols, 1987; Roozendaal i McGaugh, 1997). El període de latència és més gran en els animals que recordin que l'accés al compartiment fosc suposa una situació aversiva (descàrrega elèctrica), en la fase de record. En aquest estudi, el període de latència es va limitar a 5 minuts, transcorreguts els quals es considera que l'animal ha après la tasca de forma significativa.
- *Evitació activa* “*Active avoidance*”. El model d'evitació activa és un model d'aprenentatge/memòria basat en la teoria del condicionament clàssic. El condicionament clàssic és una forma d'aprenentatge en la que un estímul no significatiu i que no té efectes sobre la conducta adquireix les propietats d'un estímul significatiu i amb capacitat per induir l'aparició d'una conducta. Implica per tant l'associació entre dos estímuls: l'estímul amb efectes sobre la conducta o estímul incondicionat (EI) i l'estímul que en un principi és neutre i que adquireix en aquest procés les capacitats per modificar la conducta o estímul condicionat (EC). En aquest cas, l'EI són descàrregues elèctriques de 0.4 mA-0.6 mA que les rates reben a les potes a través de la reixeta metàl·lica. L'EI és un llum de 10 w i un so de 70 dB i 670 Hz, que es posen en marxa 10 segons abans de que comenci

la descàrrega que dura 5 segons. Els animals són entrenats per escapar de les descàrregues elèctriques. L'animal escapa passant del compartiment on es troba quan s'encén la llum i sent el so, a l'altre compartiment –evitació-, evitant així tot el xoc elèctric. Si l'animal travessa un cop començada la descàrrega, aquesta també s'atura però en aquest cas s'anomena –escapament-. En el nostre experiment els animals van estar exposats a aquest procediment durant 4 dies consecutius. El primer dia els animals restaven a la gàbia durant 10 minuts per a la seva habituació abans de començar els trials. Cada dia l'animal efectuava 50 trials de 30 segons cadascun (10''EI + 5''EC + 15'').

Les variables obtingudes per animal (per cada dia i en total) són les següents:

- Número d'intercrossings'' o vegades que l'animal canvia de compartiment sense cap estímul (IC)
- Número de descàrregues complertes (IR)
- Número d'evitacions (ST)
- Número d'escapaments (RE)
- Latència d'escapament o temps que tarda entre que comença l'EC i l'animal canvia de compartiment (LAT)
- Número de defecacions

(Martí-Nicolovius i cols, 1988; Coll-Andreu i cols, 1991; Coll-Andreu i cols, 1993; Costa-Miserachs i cols, 1993; Costa-Miserachs, 1994; Prunell i cols, 1994; Escorihuela i cols, 1995; Sánchez i cols, 1998).

#### V. Altres tests

- *Bateria d'observació funcional "FOB"*

La bateria d'observació funcional va ser adaptada per nosaltres a partir de la realitzada per l'EPA (US Environmental Protection Agency 1985, 1991b). Aquesta avaluació permet obtenir un índex de estat general, molt útil a l'hora de poder afirmar si els animals presenten signes de toxicitat deguts al tractament, ja que els comparem amb el grup control. Les variables que vàrem observar eren les següents:

## I. Observacions realitzades en el recinte d'exploració

1- Postura de l'animal quant es observat per primera vegada:

- a) Assentat o de peu sobre les seves quatre potes, dues potes ("rearing") o dormit **(puntuació 1)**
- b) Arreplegat o jaient **(puntuació 2)**
- c) Lleuger balanceig en posició de peu **(puntuació 3)**
- d) Balanceig exagerat o caiguda del cap tot i estar en posició de peu **(puntuació 4)**
- e) Jaient aplanat amb les extremitats escampades **(puntuació 5)**
- f) Estirat boca amunt, amb les extremitats cap amunt **(puntuació 6)**

2- Exploració de la marxa. Si l'individu no es mou durant els 2 primers minuts, se li pot donar una empenta (amb cura) per valorar aquest ítem.

- a) Marxa normal **(puntuació 1)**
- b) Atàxia, excessiu balanceig **(puntuació 2)**
- c) Les extremitats posteriors mostren moviments exagerats o sobre compensació, o són arrossegats **(puntuació 3)**
- d) Els peus estan marcadament fora del cos **(puntuació 4)**
- e) Les extremitats anteriors estan esteses o son incapaces de suportar el pes corporal **(puntuació 4)**
- f) Caminar de puntetes **(puntuació 5)**
- g) Arreplegat o acotxat **(puntuació 6)**
- h) Arrossega el cos o esta escampat al terra **(puntuació 7)**

3- Anormalitats de la marxa

- a) Normal **(puntuació 1)**
- b) Lleugerament anormal **(puntuació 2)**
- c) Moderadament anormal **(puntuació 3)**
- d) Severament anormal **(puntuació 4)**

4- Estat de vigilància ("Arousal")

- a) Molt baix (coma, estupor) **(puntuació 1)**
- b) Baix, algun moviment del cap o corporal present **(puntuació 2)**

- c) Deprimit, alguns moviments exploratoris estan presents amb períodes de immobilitat **(puntuació 3)**
- d) Normal **(puntuació 4)**
- e) Alt (“freezing” espontani ) **(puntuació 5)**
- f) Molt alt (salts bruscos, o corre ) **(puntuació 6)**

5- Tancament palpebral

- a) Ulls oberts **(puntuació 1)**
- b) Ulls una mica tancats **(puntuació 2)**
- c) Ulls tancats fins la meitat **(puntuació 3)**
- d) Ulls completament tancats **(puntuació 4)**

6- Aixecament (“Rearing”). Es comptabilitza el número total d'aixecaments en 2 minuts.

7- Autoneteja, “Poliment”o “grooming”. Es comptabilitza el número total de vegades que l'individu passa la seva pota per la seva cara per netejar-se o rascar-se els ulls en 2 minuts.

8- Moviments clònics

- a) No existeixen **(puntuació 1)**
- b) Tremolors en les extremitats, orelles, cap o pell **(puntuació 2)**
- c) Moviments repetitius de la boca o mandíbules **(puntuació 3)**
- d) Tremolor lleuger **(puntuació 4)**
- e) Tremolors severos o generalitzats **(puntuació 5)**
- f) Sacsejades seques **(puntuació 6)**
- g) Mossegades mioclòniques **(puntuació 7)**
- h) Convulsions clòniques **(puntuació 8)**

9- Moviments tònic (caracteritzats per la contracció muscular mantinguda)

- a) Absència **(puntuació 1)**
- b) Contracció dels extensors (extremitats rígides i estirades) **(puntuació 2)**
- c) Opistòtons (cos arquejat cap a l'esquena) **(puntuació 3)**

- d) Emprostòtons (cos arquejat cap a baix) **(puntuació 4)**
- e) Salts explosius (els 4 peus abandonen el terra) **(puntuació 5)**
- f) Convulsions tònico-clòniques que resulten en disnea, depressió postictal, o mort **(puntuació 6)**

**II. Respostes a la manipulació (“handling”). S’avaluen en el moment en que l’animal és retirat del recinte d’exploració**

10- Facilitat per treure l’individu del recinte.

- a) Molt fàcil, l’animal resta quiet **(puntuació 1)**
- b) Moderadament fàcil, l’animal emet vocalitzacions però no defuig a l’experimentador **(puntuació 2)**
- c) Moderadament difícil, l’animal s’aixeca sobre les seves dues potes (“rearing”) sovint seguint la mà de l’investigador **(puntuació 3)**
- d) L’animal fuig **(puntuació 4)**
- e) Molt difícil, l’animal corre al llarg del perímetre del recinte **(puntuació 5)**

11- Reactivitat a la manipulació

- a) Poca resistència a la manipulació **(puntuació 1)**
- b) Moderada **(puntuació 2)**
- c) Moderadament alta, l’animal experimenta tremolors (“freezing”) o està rígid en la mà de l’experimentador **(puntuació 3)**
- d) Alta, intenta mossegar, trepar **(puntuació 4)**

12- Salivació

- a) Cap **(puntuació 1)**
- b) Lleu **(puntuació 2)**
- c) Severa **(puntuació 3)**

13- Llagrimeig

- a) Cap **(puntuació 1)**
- b) Lleu **(puntuació 2)**

c) Severa (**puntuació 3**)

14- Piloerecció

a) Absència (**puntua 0**)b) Presència (**puntua 1**)

15- Miccions (nombre de miccions durant els 2 minuts d'avaluació)

16- Defecacions (nombre de defecacions durant els 2 minuts d'avaluació)

\*Aquelles proves sense valors de rang corresponen a variables quantitatives en un interval fix de temps.

VI. *Anàlisi de concentració de Mn en el SNC*

En l'experiment on avaluàvem els efectes de l'exposició crònica a Mn, després de 19 setmanes de tractament i un cop avaluat el comportament, es va procedir al sacrifici de tots els animals. Es va extreure el cervell separant els hemisferis i el cerebel. L'hemisferi dret va ser processat per al càlcul de concentracions de Mn per espectrofotometria atòmica d'inducció de plasma acoblat (ICP: Inducció de Plasma Acoblat, Thermo Jarrel ASH, PolyScan 61E).

Prèviament les mostres van ser digerides químicament. Aquest procés es basa en la destrucció de la matèria orgànica continguda en aquestes mostres, amb l'objectiu de minimitzar les possibles interferències produïdes per la presència de residus orgànics en la determinació analítica dels elements inorgànics.

Es van agafar, quan la quantitat de mostra disponible ho permetia, 0.5 g. de teixit per l'anàlisi (dues mostres per animal, una de cervell i una de cerebel). S'apuntava el pes de cada mostra i es col·locaven en tubs de pírex, degudament identificats. Es van posar en cada tub 2 ml d'àcid nítric al 65% i es deixaven en predigestió a temperatura ambient aproximadament 24 hores. Un cop finalitzada la predigestió, digeríem el contingut a 80°C, un temps variable (aproximadament 10 hores), fins que el teixit estava dissolt. Seguidament, pujàvem la temperatura fins a 135°C per facilitar l'evaporació aproximadament 2 hores o fins arribar al 50% del

volum inicial. A continuació, deixàvem refredar les mostres i afegíem en cada tub 0.5 ml d'àcid perclòric (HClO<sub>4</sub>) i es calentaven els tubs a 100°C durant 2 hores. Després, es pujava la temperatura a 180°C per permetre la seva evaporació a fi de deixar aproximadament 1 ml de volum de mostra. A continuació, diluïem fins un volum total de 10 ml amb aigua bidestil.lada (MQ). Es procedia a l'emmagatzematge a -20°C fins al moment de la seva lectura (Sánchez i cols, 1997; Gómez i cols, 1998).

Amb l'objectiu de valorar la possible contaminació ambiental originada per la manipulació i els compostos químics utilitzats, es van assignar tubs controls sense material orgànic, i amb idèntic processament que els anteriors.

#### VII. *Anàlisi de corticosterona en sang*

En l'experiment on avaluàvem els efectes dels diferents tipus d'estrès en adults, en el moment del sacrifici dels animals, i un cop acabades totes les proves conductuals, es va extreure de cadascun sang de la vena porta (aproximadament 2 ml) i es va guardar en tubs estèrils amb anticoagulant EDTA. Seguidament, es van centrifugar a 3000 r.p.m. durant 10 minuts. Es va extreure el plasma i es va guardar en "eppendorffs", degudament identificats, a -70°C fins el moment del seu anàlisi. L'anàlisi es va efectuar utilitzant el Kit RIA I<sup>125</sup> -ImmuChen<sup>TM</sup> Double Antibody-, per rates i ratolins (ICN Biomedicals, Inc, CA, USA).

Per l'anàlisi, les mostres i els reactius es van deixar a temperatura ambient. Es va diluir el plasma de les rates a 1:200 (10 µl de plasma fins a 2 ml de diluent). El procediment seguit va ser el següent: es van col.locar 0.1 ml del contingut obtingut per cada mostra en tubs degudament identificats. A més a més de les mostres, es van col.locar dos tubs de diluent i dos tubs "blancs" o control i 10 tubs amb els patrons necessaris per l'anàlisi. A continuació, es va afegir a tots els tubs 0.2 ml de corticosterona marcada (I<sup>125</sup>). Seguidament, i excepte en els tubs amb només diluent, es van afegir 0.2 ml d'anticòs per corticosterona, agitant el contingut obtingut amb vòrtex i deixant incubar a temperatura ambient durant 2 hores. Transcorregudes les 2 hores es va afegir a tots els tubs 0.5 ml de solució de precipitat agitant el nou contingut amb vòrtex altra vegada. Tots els tubs eren centrifugats a 2300-2500 r.p.m. durant 15 minuts. Un cop centrifugats es decantava el contingut dels tubs i

s'analitzava el precipitat en un comptador gamma (Cobra II. Auto-Gamma, Packard Instruments Company, INC, USA).

*VIII. Valoració del pes de les glàndules adrenals*

Al final de l'experiment i en el moment del sacrifici dels animals, es varen extraure les glàndules adrenals per valorar-ne les possibles diferències de pes entre grups. Un cop extretes es dipositaven en un recipient degudament identificat i es deixaven sense tapar a temperatura ambient 12 h. A l'endemà es posaven 4 hores en estufa a una temperatura de 40°C per a assecar-les totalment i seguidament es pesaven en una bàscula de precisió.



### **3. Metodologia específica.**

A continuació es descriu la metodologia seguida en cadascun dels 4 experiments realitzats.

#### **3.1. Estudis de fase II.**

Els estudis anomenats de fase-II estan adreçats a avaluar els efectes teratogènics del tòxic durant el període d'organogènesi.

##### **3.1.1. Efectes materno i feto-tòxics de l'exposició prenatal a hidroclorid de cortisona (HC) i manganès (Mn).**

Per aquest estudi es van utilitzar 78 ratolins gestants de la soca Swiss que estaven sota condicions estàndard d'estabulari. Les femelles prenyades van ser distribuïdes a l'atzar en 8 grups diferents, depenent de la dosi de Mn que havien de rebre i si rebien o no HC: grup control, grup control amb HC, grup tractat amb Mn a dosi baixa, grup tractat amb Mn a dosi mitja, grup tractat amb Mn a dosi alta, grup tractat amb Mn a dosi baixa més HC, grup tractat amb Mn a dosi mitja més HC i grup tractat amb Mn a dosi alta més HC.

El dia 6 de gestació, després de pesar a tots els animals gestants es va començar a administrar el Mn i l'HC diàriament, i fins el dia 17. Cada dia es pesaven els animals i s'ajustaven les dosis al seu pes. També pesàvem diàriament el menjar que consumien durant el tractament. Tots els animals van tenir lliure accés a menjar i aigua.

Les dosis de Mn estaven basades en resultats d'estudis previs que mostraven que el NOAEL per la toxicitat materna en ratolins era de 4 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , mentre que el NOAEL per la toxicitat embriofetal era de 2 mg/kg/dia (Sánchez i cols, 1993). L'HC era administrada en dosis similars a les descrites en situacions d'estrès lleuger o moderat (Magariños i McEwen, 1995).

---

La distribució dels animals gestants, les concentracions de Mn i les concentracions d'HC administrades eren les següents:

- Grup I: Control no tractat (11 animals). Van rebre durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació) via subcutània, una injecció de sèrum salí (vehicle del Mn) ajustada a 0.2 ml per 35 g d'animal, i una injecció de solució a l'1% d'etanol (vehicle de l'HC) ajustada a 0.1 ml per 35 g d'animal.
- Grup II: Control amb HC (10 animals). Van rebre per via subcutània durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació) una injecció de sèrum salí ajustada a 0.2 ml per 35 g d'animal i una injecció de HC rebent una dosi diària de 5 mg/kg/dia.
- Grup III: Tractat amb Mn (8 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 1 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i solució a l'1% d'etanol ajustada a 0.1 ml per 35 g d'animal.
- Grup IV: Tractat amb Mn (11 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 2 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i solució a l'1% d'etanol ajustada a 0.1 ml per 35 g d'animal.
- Grup V: Tractat amb Mn (11 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 4 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i solució a l'1% d'etanol ajustada a 0.1 ml per 35 g d'animal.
- Grup VI: Tractat amb Mn i amb HC (7 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 1 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i HC a dosi de 5 mg/kg/dia.
- Grup VII: Tractat amb Mn i amb HC (11 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 2 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i HC a dosi de 5 mg/kg/dia.

- Grup VIII: Tractat amb Mn i amb HC (7 animals), van rebre per via subcutània, durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació), dosis de 4 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i HC a dosi de 5 mg/kg/dia.

El dia 18 de gestació, es pesaven les femelles gestants i es sacrificaven per dislocació cervical. Es realitzaven cesàries i s'extreien els úters, fetge i ronyons. Es van valorar els paràmetres de toxicitat materna i embrio-fetal descrits anteriorment. També es van avaluar els defectes esquelètics i viscerals després de sotmetre els fetus vius a un procés de transparentació i tinció amb vermell d'alizarina S o de fixació en solució de Bouin, respectivament.

### **3.2. Estudis de fase III.**

Els estudis anomenats de fase-III bàsicament avaluen els efectes tòxics en el desenvolupament.

#### **3.2.1. Efectes de l'exposició prenatal a Mn i estrès en el desenvolupament postnatal.**

Per a la realització d'aquest estudi es van utilitzar 63 mares gestants, que van poder portar a terme tot el període de gestació. Els animals utilitzats eren ratolins femelles de la soca Swiss que estaven sota condicions habituals d'estabulari. Les femelles positives eren distribuïdes a l'atzar en 6 grups de tractament diferents depenent de la dosi de Mn que havien de rebre i si havien d'estar sotmesos a estrès o no. Els grups de tractament eren els següents: grup control, grup control estressat, grup tractat amb Mn a dosi baixa, grup tractat amb Mn a dosi alta, grup tractat amb Mn a dosi baixa i sotmès a estrès, i grup tractat amb Mn a dosi alta i sotmès a estrès.

Les dosis de Mn estaven basades en resultats d'estudis previs que mostraven que el NOAEL per la toxicitat materna en ratolins era de 4 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , mentre que el NOAEL per la toxicitat embriofetal era de 2 mg/kg/dia (Sánchez i cols, 1993).

Al dia 6 de gestació i després de pesar a tots els animals gestants, es va començar a administrar el Mn, i a sotmetre als animals a estrès per immobilització durant 2 hores pel matí (10:00-12:00), depenent del grup a que pertanyien, diàriament durant tot el període de tractament (dies 6 al 17 de gestació) (McCormick i cols, 1995). Cada dia es pesaven els animals i s'ajustaven les dosis al seu pes. També es controlava diàriament el pes del menjar que consumia cada animal durant tot el tractament. Tots els animals van tenir lliure accés al consum d'aigua i menjar.

La distribució dels animals gestants, les dosis de Mn i l'estrès van ser les següents:

- Grup I: Control no tractat (12 animals). Van rebre durant el període de tractament (del dia 6 al dia 17 de gestació), per via subcutània una injecció diària de sèrum salí ajustada a 0.2 ml per 35 g d'animal.
- Grup II: Control estrès (10 animals). Van rebre durant el període de tractament (del dia 6 al dia 17 de gestació), per via subcutània una injecció diària de sèrum salí ajustada a 0.2 ml per 35 g d'animal. Seguidament, eren sotmesos a estrès per immobilització durant un període de 2 hores (10:00-12:00). Per sotmetre'ls a l'estrès es van col.locar els animals en les gàbies d'immobilització ja descrites.
- Grup III: Tractat amb Mn (11 animals). Van rebre durant el període de tractament (del dia 6 al dia 17 de gestació), per via subcutània 1 mg/kg/dia de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .
- Grup IV: Tractat amb Mn (12 animals). Van rebre durant el període de tractament (del dia 6 al dia 17 de gestació), per via subcutània 2 mg/kg/dia de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .
- Grup V: Tractat amb Mn i sotmesos a estrès (8 animals). Van rebre per via subcutània i durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació) 1 mg/kg/dia de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Seguidament, eren sotmesos a estrès per immobilització durant un període de 2 hores (10:00-12:00), col.locant-los en les gàbies d'immobilització.

- Grup VI: Tractat amb Mn i sotmesos a estrès (11 animals). Van rebre per via subcutània i durant el període de tractament (del dia 6 al 17 de gestació) 2 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ . Seguidament eren sotmesos a estrès per immobilització durant un període de 2 hores (10:00-12:00), col·locant-los en les gàbies d'immobilització.

A més a més del control del menjar i del pes dels animals gestants, també es van registrar si es produïen morts, avortaments i/o parts prematurs.

Es va deixar a les femelles portar a terme la gestació (dia 19) i alletar les cries fins els 21 dies. Es van controlar les variables del desenvolupament ja descrites, núm. de cries vives i mortes al dia 1, índex de viabilitat, índex de lactància, sexe i pes de les cries els dies 4, 8, 12 i 21. Paràmetres del desenvolupament físic: desplegament del pavelló auditiu, erupció d'incisius, obertura d'ulls, descens de testicles i obertura de vagina. Maduració neuromotora: reflex d'adreçament, geotaxi, força a les extremitats anteriors. Valoració de la cura materna dies 1 i 3 postnatal.

Al dia 45 postnatal, es va escollir a l'atzar un mascle i una femella de cada ventrada i se'ls va aplicar el test del Camp Obert. Es col·locava a l'animal al centre del recinte i se'l deixava deambular lliurement durant 30 minuts. Es va registrar la distància recorreguda en el total del recinte i la distància i temps que l'animal estava al centre del recinte i a la perifèria. També es registraven el número de defecacions de l'animal durant 30 minuts.

Al dia 75 postnatal es tornava a mesurar la força, amb un mascle i una femella de cada ventrada, i s'aplicava la prova del rotarod.

A dia 80 postnatal s'aplicava el test d'Evitació Passiva, en un mascle i una femella de cada ventrada, registrant les latències T1 i T2 de cada animal. També es registraven les defecacions de l'animal.

### 3.3. Estudis amb adults.

#### 3.3.1. Efectes de l'exposició crònica d'adults a Mn i estrès.

Per aquest estudi es van utilitzar 90 rates mascle de la soca Sprague Dawley d'un pes inicial de 250-300 gr. Els animals van estar en quarantena 7 dies i se'ls va col·locar sota condicions estàndard d'estabulari. Després d'aquest període d'acomodació, es van pesar els animals i es van dividir aleatòriament en 6 grups de tractament segons la dosi de Mn a rebre, i segons si havien d'estar sotmesos o no a estrès. El Mn era dissolt en aigua de beguda. L'estrès al que eren sotmesos els animals era l'estrès per immobilització ja descrit.

Durant el període d'acomodació es va calcular el que menjaven i el que bevien els animals. També es va fer un seguiment del pes dels mateixos.

La distribució dels animals en els grups de tractament, les dosis de Mn dissolt en l'aigua de beguda i l'estrès al que eren sotmesos els animals eren els següents:

- Grup I (15 animals): control no tractat
- Grup II (15 animals): control estressat. Els animals eren sotmesos a estrès per immobilització durant 2 hores 5 dies a la setmana.
- Grup III (15 animals): tractats amb Mn. El Mn era dissolt en aigua de beguda a dosi de 1000 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .
- Grup IV (15 animals): tractats amb Mn. El Mn era dissolt en aigua de beguda a dosi de 2000 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .
- Grup V (15 animals): tractats amb Mn i sotmesos a estrès. El Mn era dissolt en aigua de beguda a dosi de 1000 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i els animals eren sotmesos a estrès per immobilització durant 2 hores, 5 dies a la setmana.

- Grup VI (15 animals): tractats amb Mn i sotmesos a estrès. El Mn era dissolt en aigua de beguda a dosi de 2000 mg/kg/dia de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i els animals eren sotmesos a estrès per immobilització durant 2 hores, 5 dies a la setmana.

Durant les 19 setmanes que va durar el tractament, tots els animals van tenir lliure accés tant al menjar com a l'aigua. Es va fer un control de pes dels animals setmanal. També es calculava setmanalment la ingesta de menjar i el consum d'aigua.

Les dosis de Mn en aigua de beguda estan basades en estudis anteriors (0, 10 i 20 mg/ml) i calculades pels nostres animals segons el que consumien d'aigua (Pappas i cols, 1997; Lai i cols, 1999). El model d'estrès utilitzat en aquest estudi també està basat en investigacions anteriors d'altres autors (Dahbhar i cols, 1996).

Durant el tractament, el comportament animal es va valorar amb la Bateria Funcional d'Estudi "FOB" adaptada per nosaltres, els dies 15, 30, 60 i 90. Un cop finalitzat el període de tractament, es va sotmetre els animals a diferents proves conductuals:

- Camp obert, on es feia una valoració de l'activitat horitzontal, vertical i defecacions com a índex de reactivitat. Aquesta prova es feia amb llum intensa (bombeta de 245V-100W) durant 15 minuts.
- Laberint d'aigua, on es valorava l'aprenentatge espacial dels animals. La prova l'administràvem segons el nostre protocol. La temperatura de l'aigua era de 19-22°C.
- Evitació passiva, on es valorava l'aprenentatge dels animals i el record, a més de les defecacions com a índex de reactivitat.

Un cop finalitzades les proves conductuals es va procedir al sacrifici dels animals, extraient l'encèfal i guardant l'hemisferi dret a  $-20^{\circ}C$  per la determinació de Mn en cervell i cerebel.

### 3.3.2. Efectes neuroconductuals de dos tipus d'estrès: immobilització i soroll.

Per aquest estudi es van utilitzar 45 rates mascle de la soca Sprague Dawley amb un pes inicial de 250-300 g. Els animals va estar en quarantena 7 dies i se'ls va col·locar sota condicions estàndard d'estabulació.

Després del període d'acomodació, es van pesar els animals i es van dividir aleatòriament en 4 grups de tractament segons el tipus d'estrès que havien de rebre: grup control, grup estressat per immobilització, grup estressat per soroll continu, i grup estressat per soroll intermitent (mitjançant l'emissor d'ultrasons "Radarcán"). La distribució dels animals als grups de tractament i l'estrès al que eren sotmesos van ser els següents:

- Grup I (11 animals): grup control no estressat.
- Grup II (10 animals): grup estressat per immobilització. Els animals eren sotmesos a estrès per immobilització durant 2 hores, 5 dies a la setmana durant 21 dies.
- Grup III (12 animals): grup estressat per soroll continu. Els animals eren sotmesos a estrès per soroll (sense interrupcions) durant 2 hores, 5 dies a la setmana durant 21 dies.
- Grup IV (12 animals): grup estressat per soroll intermitent. Els animals eren sotmesos a estrès per soroll de manera intermitent durant 5 dies a la setmana, de manera que cada sessió d'estrès era de 2 hores de soroll, distribuïdes en un període de 6 hores; és a dir, a intervals del 33%.

Durant els 21 dies que va durar el tractament, els animals tenien lliure accés a menjar i aigua. Setmanalment es controlava el pes dels animals així com la ingesta de menjar i el consum d'aigua.

El model d'estrès per "restraint" utilitzat, estava basat en estudis anteriors d'altres autors (Dahbhar i cols, 1996). Els models d'estrès per soroll continu i intermitent utilitzat en aquest experiment també estava basat en estudis previs



(Kimmel i cols, 1976; Nawrot i cols, 1980; Alario i cols, 1987; Paparelli i cols, 1992; Gesi i cols, 1999).

Un cop finalitzat el període de tractament (21 dies), es va sotmetre als animals a les següents proves conductuals:

- Camp obert, on es feia una valoració de l'activitat horitzontal, vertical i defecacions, com a índex de reactivitat. Aquesta prova es feia amb llum intensa (bombeta de 245V-100W) i durant 15 minuts.
- Evitació activa, on es mesurava l'aprenentatge/memòria dels animals. La prova durava 4 dies consecutius, els dos primers dies la intensitat del xoc elèctric era de 0.4 mA, mentre que els darrers dos dies era de 0.6 mA.

Un cop finalitzades les proves conductuals es procedia al sacrifici dels animals, extraient les glàndules adrenals i 2 ml de sang de la vena cava pels posteriors anàlisis.

#### 4. Tractament estadístic de les dades.

Per l'avaluació estadística de les dades es va utilitzar el paquet informàtic estadístic SPSS per PC, versió 9.0.1.

Per evitar atribuir al tractament diferències degudes a l'atzar es va treballar amb un nivell de significació del 5% ( $p < 0.05$ ). D'aquesta manera, quan s'afirma que existeixen diferències entre els grups de tractament, es fa amb una probabilitat d'encert del 95%. Es calculaven en primer lloc, els descriptius de totes les variables (mitjanes i desviacions estàndard). Com la majoria de les dades estudiades seguien una distribució normal, es va aplicar el test de Levene per avaluar si existia homogeneïtat en la variància d'error. Quan s'acceptava la hipòtesi nul·la, és a dir que no existien diferències entre les dades, volia dir que estàvem davant d'unes dades homogènies. S'aplicava llavors un ANOVA (anàlisi de la variància). Quan el test de Levene era significatiu es realitzaven tests no paramètrics: Kruskal-Wallis.

En els casos en que l'ANOVA donava diferències significatives entre els grups, es feien proves de comparacions múltiples entre grups o proves "post-hoc": LSD (fase-II), Bonferroni (fase-III) o HSD de Tuckey (experiments amb adults). En els casos en que no es complia la condició d'homogeneïtat de la variància, les comparacions es van realitzar mitjançant el test no paramètric de la U de Mann-Whitney.

En els estudis de desenvolupament, la ventrada era la unitat d'anàlisi (fase-II i fase-III). Els tests d'ANOVA es van realitzar amb dues variables (dosi de Mn i estrès).

En l'estudi de Mn en adults, els ANOVA també es van realitzar amb dues variables (dosi de Mn i estrès). S'utilitzava ANOVA amb mesures repetides quan volíem analitzar la diferència entre grups respecte a la progressió dels animals en alguna prova que se'ls feia repetir.

En l'estudi en adults sobre els diferents tipus d'estrès, l'ANOVA realitzat era a un nivell (tipus d'estrès). També s'utilitza ANOVA amb mesures repetides quan es

volia analitzar la diferència entre grups respecte a la progressió dels animals en alguna prova que se'ls feia repetir.

Es van efectuar correlacions bivariants entre algunes de les variables estudiades, quan es volia avaluar si existien correlacions lineals entre elles mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Es feien correlacions parcials quan es volia estudiar relacions lineals entre variables, traient la influència d'una tercera variable també amb el coeficient de correlació de Pearson.