

AGRAÏMENTS:

- Molt especialment a la Montse i la Lluïsa per la seva inestimable qualitat personal i com no, professional. Sense vosaltres tot hagués estat molt diferent; gran part del mèrit d'aquesta tesi és vostre!.
- Al Dr. Domènec Sánchez i el Dr. José Luís Domingo per demostrar-me que hi ha gent que et valora i contribueix en tot el possible per a que puguis avançar.
- Al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la URV per permetre'm iniciar-me en aquest món tan apassionat i *complicat* alhora.
- Al grup de Farmacologia, gràcies pel vostre recolzament i els postres coneixements. I sobretot a la Marta, el Miquel i la Vanesa pel vostre suport moral i les bones estones al laboratori.
- Als meus companys de toxicologia, especialment al Martí per fer-me creure que soc una persona assenyada i responsable i com no per la seva ajuda tècnica els darrers dies. A la Silvia F per tenir sempre una bona paraula i alegrar-te el dia en els mals moments.
- A l'Ana B i la Griselda per les bones estones passades, per permetre'm ser aquella veu de la consciència, tot i no tenir sempre les coses tan clares. Per la nostra amistat i suport mutu tan a nivell personal com professional. A la Chesca, que seria de nosaltres sense els nostres esmorzars?
- A la Carme S, la Silvia O, l'Anna T, la Maria S i la Carme G per les estones de *reflexió* i per compartir moments importants d'aquesta tesi.
- A l'Amparo, el Juan i l'Esperanza per la seva ajuda tècnica en tot moment.
- A tota la resta de companys de la facultat que en un o altre moment m'han facilitat la feina.
- Al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona per la seva col·laboració i rigor professional.

- Als meus pares, per recolzar-me i animar-me en tot moment. Sense vosaltres m'hauria perdut moltes coses importants.
- Al Josep per haver-me ensenyat que les presses són dolentes, que cal anar poc a poc per arribar a la fita. Per patir la tesi juntament amb mi i com no per haver-me suportat tot aquest temps.
- També vull agrair l'esforç de totes aquelles persones que en algun moment m'han posat obstacles per què gràcies a elles s'ha estimulat el meu esperit de superació.

A.1 LLISTA D'ABREVIATURES

%	Percentatge
ACTH	Hormona adrenocorticòtropla
ATP	Adenosinatrifosfat
ATSDR	Agency for toxic substances and diseases registry
AUD	Acetat d'uranil dihidratat
BSA	Albúmina sèrica bovina
CAT	Catalasa
CDNB	1-clor-2,4-dinitrobenzè
CHO	Cèl·lules ovàriques d'hàmsster xinès
CRH	Factor alliberador d'hormona adrenocorticòtropla
DL ₅₀	Dosi letal 50
DNA	Àcid desoxirribonucleic
DO	Densitat òptica
DU	Urani empobrit
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
GPx	Glutació peroxidasa
GR	Glutació reductasa
GSH	Glutació reduït
GSSG	Glutació oxidat
GSSG/GSH	Ràtio entre el glutació oxidat i el reduït
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
HCl	Àcid clorhídric
HNO ₃	Àcid nítric
HPA	Hipotalamohipofític adrenal

Annexos

ICP	Inducció de plasma acoblat
KCl	Clorur de potassi
KH_2PO_4	Potassi di-Hidrogen Fosfat
K_2HPO_4	di-potassi hidrogen fosfat anhidro
LOAEL	Nivell mínim al qual s'observen efectes adversos
LOEL	Nivell mínim amb efectes observables
MDA	Malondialdehid
Na_2CO_3	Carbonat sòdic
NaCl	Clorur de sodi
NAD	Dinucleòtid d'adenina i de nicotinamida
NADP+	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina
NADPH	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NaHCO_3	Sodi hidrogen carbonat
$\text{Na H}_2\text{PO}_4$	Sodi di-Hidrogen fosfat
$\text{Na}_2 \text{H PO}_4$	di-sodi hidrogen fosfat anhidro
NaOH	Hidròxid sòdic
NEM	N-etil-maleïmida
NEM	N-etil-maleïmida
NMC	Nivell màxim contaminant
NOAEL	Nivell sense efectes adversos observables
NOEL	Nivell sense efectes observables
NPV	Nucli paraventricular
NO_2	Diòxid de nitrogen
HO^\bullet	Radical hidroxil
OPT	O-phtalaldehid
pH	Potencial Hidrogen

REDOX	Reducció oxidació
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RNA	Àcid ribonucleic
SN	Sistema nerviós
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
SNS	Sistema nerviós simpàtic
SNV	Sistema nerviós vegetatiu
S.P.S.S.	Statistical Package for the Social Sciences
SOD	Superòxid dismutasa
TBA	Àcid tiobarbitúric
TBARS	<i>Tiobarbituric acid reactive substances</i>
T-BuOOH	T-butilhidroperòxid
TCA	Àcid tricloracètic
TI	Ingesta tolerable
u	Unitats
U	Urani
UF ₆	Hexafluorur d'urani
UO ₂	Diòxid d'urani
UO ₃	Triòxid d'urani
U ₃ O ₈	Octaòxid d'urani
EUA	Estats Units d'Amèrica
UNSCEAR	Comitè Científic de les Nacions Unides sobre els efectes de la radiació atòmica
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	Organització Mundial de la Salut

A.2 Documents per obtenir les dades:

- **Cesàries**

RATA N.:	DATA:
PES ANIMAL DIA 0:	
PES ANIMAL DIA 14:	
PES ÚTER:	
NRE. IMPLANTACIONS:	
FETUS VIUS:	
FETUS MORTS:	
REABSORCIIONS:	

• **TOXICITAT REPRODUCTIVA DE L'URANI**

DOSIS: _____

DATA: _____ ANIMAL: _____

1. *Pes de l'animal sencer, testicle i epidídim*

Pes cos: _____g

Epidídim esquerre: _____g

Epidídim dret: _____g

Testicle esquerre: _____g

Testicle dret: _____g

Total pes testicles: _____g % Testicles/Cos: _____%

2. *Epidídim esquerre*

a) Valoració de la mobilitat dels espermatozoides

		GRAUS DE MOBILITAT				
CAMP	MÒBILS	+	++	+++	++++	IMMÒBILS
1						
2						
3						
4						
5						

Percentatges formes mòbils:

b) Valoració de la morfologia dels espermatozoides

		TIPUS ANORMALITAT					
CAMP	NORMAL	GARFI	CAP	CAP AMORF	PLEGAT	DOBLE CUA	ANORMAL
1							
2							
3							
4							
5							

Percentatge anormalitat:

3. EPIDÍDIM DRET: Recompte espermàtides

X = _____ = / 64 =

TOTAL = _____ x 10.000 x 16 x 2 =

Nre. espermàtides (10⁶)/epidídim: _____

Nre. espermàtides/g epidídim: _____

Nre. espermàtides/epidídim/g animal: _____

4. TESTÍCLE DRET: Recompte espermàtides

X = _____ = / 64 =

TOTAL = _____ x 10.000 x 16 x 2 =

Nre. espermàtides (10⁶)/testicle: _____

Nre. espermàtides/g testicle: _____

Nre. espermàtides/testicle/g animal: _____

- AVALUACIÓ CRIES**

GRUP NÚM. Gàbia

DIA 0 DE GESTACIÓ DIA DEL PART

SEGUIMENT DEL PES DE LA VENTRADA

Data	Dia	Pes (g) ♂				Mitjana	Pes (g) ♀				Mitjana
	1										
	4										
	12										
	21										

DESPLEGAMENT DEL PAVELLÓ AUDITIU

Data	Dia	♂				%	♀				%
	2										
	3										
	4										
	5										

ERUPCIÓ DELS INCISIUS

Data	Dia	♂				%	♀				%
	5										
	6										
	7										
	8										

OBERTURA D'ULLS

Data	Dia	♂				%	♀				%
	13										
	14										
	15										

ÍNDEX DE VIABILITAT/ÍNDEX DE LACTÀNCIA

Nre. cries vives en néixer	
Nre. cries vives el dia 4	
Nre. cries vives el dia 21	
Índex de viabilitat	
Índex de lactància	

Annexos

REFLEX D'ADREÇAR-SE (SURFACE RIGHTING)

Data	Dia	Temps (segons) ♂			Temps (segons) ♀		
	4						
	5						
	6						

EVITACIÓ D'UN DESNIVELL (CLIFF AVOIDANCE)

Data	Dia	Temps (segons) ♂		Temps (segons) ♀	
	7				
	8				
	9				

FORÇA D'AFERRAR-SE (FORELIMB GRIP STRENGTH)

Data	Dia	Temps (segons) ♂			Temps (segons) ♀		
	10						
	11						
	12						
	13						

PASSIVE AVOIDANCE

Data	Dia	Temps (segons) ♂			Temps (segons) ♀		
	20						
	21						

OBSERVACIONS:

- D'aquesta tesi s'han derivat els següents articles i participacions a congressos:

CONGRESSOS

Linares V., Bellés M., Albina ML., Sánchez DJ., Domingo JL.

Influence of chronic exposure to uranium and stress on male reproduction in rats
XXXIII Congress The Physiological Society

Publicació: J Physiol Biochem 2005; 61(1);178

Societat de Fisiologia; Sevilla 2005

Belles M., Albina ML., **Linares V.**, Gómez M., Sánchez DJ., Domingo JL.

Combined action of uranium and stress in the rat. Behavioral effects.

Measuring Behavior 2005

Noldus; Amsterdam 2005

Belles M., Albina ML., **Linares V.**, Colomina MT., Sánchez DJ., Domingo JL.

Influence of restraint stress on uranium-induced behavioral effects in rats.

Finnish Institute of occupational health

Finnish Institute of occupational health; Finlandia 2005

ARTICLES

Toxicology Letters 2005, 158; 176-185

Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects

Montserrat Bellés, M. Luisa Albina, **Victoria Linares**, Mercedes Gómez, Domènec J. Sánchez, José L. Domingo.

Toxicology Letters 2005, 158; 186-195

Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction

Victoria Linares, M. Luisa Albina, Montserrat Bellés, Emilio Mayayo, Domènec J. Sánchez, José L. Domingo.

Toxicology 2005, 215; 69-79

Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats

M. Luisa Albina, Montserrat Bellés, **Victoria Linares**, Domènec J. Sánchez, José L. Domingo

BIBLIOGRAFIA

- Al'Absi M, Bongard S, Lovallo WR. *Adrenocorticotropin responses to interpersonal stress: effects of overt anger expression style and defensiveness*. International Journal of Psychophysiology 2000; 37:257-265.
- Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Trancho G. *Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats*. Physiology and Behavior 1987; 40:29-32.
- Albina ML, Bellés M, Gómez M, Sánchez DJ, Domingo JL. *Influence of maternal stress on uranium-induced developmental toxicity in rats*. Experimental Biology and Medicine 2003; 228:1072-1077.
- Almaguer-Melián W, Jas-García J, Francis-Turner L, Antúnez-Potashkina I, Bergado-Rosado JA. *Estudio comparativo de la lesión de fibra-fórnix por aspiración y transección*. Revisión Neurología 1999; 29:704-709.
- Alonso SJ, Damas C, Navarro E. *Behavioral despair in mice after prenatal stress*. Journal of Physiology and Biochemistry 2000; 56:77-82.
- Altman J i Sudarshan K. *Postnatal development of locomotion in the laboratory rat*. Animal Behaviour 1975; 23:896-920.
- Anderson DK, Rhees RW, Fleming DE. *Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area 8SDN-POA of the rat brain*. Brain Research 1985; 332:113-118.

- Archer VE, Wagoner JK, Lundin FE. *Lung cancer among uranium miners in the United States*. Health Physics 1973a; 25:351-371.
- Archer VE, Wagoner JK, Lundin FE. *Cancer mortality among uranium mill workers*. Journal Occupational and Environmental Medicine 1973b; 15:11-14.
- Arfsten DP, Schaeffer DJ, Johnson EW, Cunningham JR, Still KR, Wilfong ER. *Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity*. Environmental Research 2005; 3: in press.
- Arruda-Neto JDT, Manso MV, Nogueira GP, Taricano ID, Saiki M, Zamboni CB, Bonamin LV, Camargo SP, Cestari AC, Deppman A, Garcia F, Gouveia AN, Guzman F, Helene OA, Jorge SA, Likhachev VP, Martins MN, Mesa J, Rodriguez O, Vanin VR. *Long-term accumulation and microdistribution of uranium in the bone and marrow of beagle dogs*. International Journal of Radiation Biology 2004; 80:567-575.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for uranium (update)*: Atlanta, GA: Public Health Service 1999.
- Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM. *Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat*. Teratology 1978; 18:211-218.
- Beijer K i Jernelöv A. *Sources, transport and transformatin of metals in the environment*. In: Handbook on the Toxicology of Metals, General Aspects. Friberg L, Bordberg FF, and Vouk VB (Eds). Elsevier, Amsterdam 1986; 1:68-74.

- Benes P, Kratzer K, Vlckova S, Sebestova E. *Adsorption of uranium on clay and the effect of humic substances*. Radiochimica Acta 1998; 82:367-373.
- Bentley KW, Stockwell DR, Brit KA, Kerr CB. *Transient proteinuria and aminoaciduria in rodents following uranium intoxication*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 1985; 34:407-416.
- Bignami G. *Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity*. Environmental Health Perspectives 1996; 104:285-298.
- Bosque MA, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J. *Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate*. Biological Trace Elements Research 1993; 36:109-118.
- Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 1976; 72:248-254.
- Briner W. *Altered open-field performance in depleted uranium exposed rats*. Metal Ions in Biology and Medicine, L. Khassanova, Ph. Collery, I. Maynard, Z. Khassanova, J.C. Etienne (Eds), John Libby Eurotext, Paris 2002; 7:342-345.
- Briner W, i Davis D. *Lipid oxidation and behavior are correlated in depleted uranium exposed mice*, in: L. Khassanova, Ph. Collery, I. Maynard, Z. Khassanova, J.C. Etienne (Eds), Metal Ions in Biology and Medicine, John Libby Eurotext, Paris 2002; 7:59-63.
- Briner W, i Murray J. *Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats*. Neurotoxicology and Teratology 2005; 27:135-144.

- British Geological Survey. *Regional geochemistry of the lake District and adjacent areas*. British Geological Survey, 1992. Keyworth, Nottingham, UK.
- British Geological Survey. *World mineral statistics 1994-98: production: exports: imports*. British geological Survey, 2000. Keyworth, Nottingham, UK.
- Brown DP i Bloom T. *Mortality among uranium enrichment workers*, Report to National Institute for Occupational Safety and Health 1987, Cincinnati, Ohio. NTIS PB87-188991.
- Buege JA i Aust SD. *Microsomal lipid peroxidation*. *Methods in Enzymology* 1978; 52:302-310.
- Buendia J. *Estrés y depresión*. En: *Estrés y Psicopatología*. Buendía J (Eds), Ediciones Pirámide, Madrid, 1993; 6:97-112.
- Chandra SV, Shukla GS, Murthy RC. Effect of stress on the response of rat brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1979; 47:603-608.
- Chantal H, Kabbay M, Maccari S. *Prenatal stress increases the hypothalamopituitary-adrenal axis*. Respons in young and adult rats. *Journal of Endocrinology* 1994; 6:341-345.
- Chechoway H, Pearce N, Crawford-Brown DJ, Cragle DL. *Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant*. *American Journal of Epidemiology* 1988; 127:255-266.
- Cheng YL, Lin JY, Hao XH. *Trace uranium determination in beverages and mineral water using fission track techniques*. *Nuclear Tracks and Radiation Measurement* 1993; 22(1-4):853-855.

- Chernoff N, Miller DB, Rosen MB, Mattscheck CL. *Developmental effects of maternal stress in the CD-1 mouse induced by restraint on single days during the period of major organogenesis*. Toxicology 1988; 51:57-65.
- Centre for Health Promotion and Preventative Medicine (CHPPM). *Depleted Uranium. Human exposure assessment and health risk characterisation*. Health Risk Assessment Consultation No. 26-MF-7555-00D, 2000. CHPPM, Aberdeen, Md, USA.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. *Measurement of catalase activity in tissue extracts*. Analytical Biochemistry 1970; 34: 30-38.
- Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J. *Effects of maternal stress on methyl mercury-induced developmental toxicity in mice*. Physiology and Behavior 1995; 58:979-984.
- Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J. *Influence of maternal restraint stress on arsenic-induced pre-and postnatal alterations in mice*. Psychobiology 1996; 24:227-234.
- Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J. *Influence of maternal stress on the effects of prenatal exposure to methylmercury and arsenic on postnatal development and behavior in mice: a preliminary evaluation*. Physiology and Behavior 1997; 61:455-459.
- Colomina MT, Esparza JL, Corbella J, Domingo JL. *The effect of maternal stress on developmental toxicity of aluminum in mice*. Neurotoxicology and Teratology 1998; 20:651-656.
- Colomina MT, Sánchez DJ, Domingo JL, Sanchez-Turet M. *Exposure of pregnant mice to aluminum and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring*. Psychobiology 1999; 27:521-529.

Bibliografía

- Colomina MT, Albina ML, Torrente M, Domingo JL. *Teratogenia en experimentación animal: interacción del estrés con tóxicos*. Monografías de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud 2000; 2:121-123.
- Colomina MT, Roig JL, Sánchez DJ, Domingo JL. *Influence of age of exposure on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in the brain of rats*. Neurotoxicology 2002; 23:775-781.
- Cooper JR, Stradling GN, Snith H i Ham SE. *The behaviour of U-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats*. International Journal of Radiation Biology 1982; 41:412-433.
- Craft ES, Abu-Qare AW, Flaherty MM, Garofolo MC, Rincavage HL, Abou-Donia MB. *Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects*. Journal of Toxicology and Environmental Health 2004; 7:297-317.
- Cross F, Filipy R, Loscutoff S. *Histopathologic, morphometric and physiologic investigation of lungs of dogs exposed to uranium ore dust*. International Conference: Hazards Mineral Control. Measures and Medical Aspects 1981a; 228-235.
- Cross F, Palmer R, Busch R. *Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust*. Health Physics 1981b; 41:135-153.
- Curtis AL, Pavcovich AL, Grigoriadis De, Valentino RJ. *Previous stress alters corticotropin realising factor neurotransmission in the locus ceruleus*. Neuroscience 1995; 65:541-550.
- Dallman MF, Akana SF, Bradbur MJ, Strack AM, Hanson ES, Scribner KA. *Regulation of the hypotalamo pituitary adrenal axis during stress: feedback, facilitation and feeding*. Seminars in Neurosciences 1994; 65:360-368.

- Del Corral P, Mahon AD, Duncan GE, Howe CA, Craig BW. *The effect of exercise on serum and salivary cortisol in male children.* *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1994; 26:1297-1301.
- Diamond GL, Gelein RM, Morrow PE, Panner BJ, Baggs RB. *Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long-Evans rat.* *Fundamental Applied Toxicology* 1989; 13:65-78.
- Dipino RK, Kabat MH i kane RL. A comparison of 5 measures of premorbid intellectual functioning in a sample of patients injured with DU. *Archives of Clinical Neuropsychology* 1998; 13(1):23-24.
- Dobbing J i Sands J. *Vulnerability of developing brain IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt.* *Biology of the Neonate* 1971; 19:363-378.
- Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J. *Acute toxicity of uranium in rats and mice.* *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1987; 39:168-174.
- Domingo JL, Paternain JL, Ortega A, Corbella J. *Revisión de la terminología utilizada en publicaciones de teratología y toxicidad en el desarrollo. Una propuesta de resentación de resultados.* *Revista de Toxicología* 1988; 5:101-108.
- Domingo JL, Ortega A, Paternain JL, Corbella J. *Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration.* *Archives of Environmental Health* 1989a; 44:395-398.
- Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J. *Developmental toxicity of uranium in mice.* *Toxicology* 1989b; 55:143-152.
- Domingo JL. *Chemical toxicity of uranium.* *Toxicol Ecotoxicol News* 1995; 2:74-78.

Bibliografia

- Domingo JL. *Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review*. *Reproductive Toxicology* 2001; 15:603-609.
- Domingo JL, Domingo A, Colomina MT. *Influence of maternal stress on metal-induced pre- and postnatal effects in mammals: a review*. *Biological Trace Elements Research* 2004; 98:193-207.
- Dorman DC. *An integrative approach to neurotoxicology*. *Toxicologic Pathology* 2000; 28:37-42.
- Draski LJ, Burrig RG, Donovan PJ. *The influence of prenatal and/or postnatal exposure to lead on behavior of preweanling mice*. *Physiology and Behavior* 1989; 45:711-715.
- Dupree-Ellis E, Watkins J, Ingle JN, Phillips J. *External radiation exposure and mortality in a cohort of uranium processing workers*. *American Journal of Epidemiology* 2000; 125:91-95.
- Durakovic A. *Medical effects of internal contamination with uranium*. *Croatian Medical Journal* 1999; 40(1), 49-66.
- Durbin PW. *Metabolic models of uranium. Biokinetics of uranium in man*, Richland, Washington 1984, NTIS, Springfield, Va, USA. Report USUR-05, HEHF-47.
- Dygert H. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-Hill Book Inc., New York 1949; 603-675.
- Ebbs SD, Norvell WA, Kochian LV. *The effect of acidification and chelating agents on the solubilisation of uranium from contaminated soil*. *Journal of Environmental Quality* 1998; 27(6):1486-1494.
- Eisenbud M i Quigley JA. *Industrial hygiene of uranium processing*. *AMA Archives Industrial Health* 1956; 12:12-22.

- Faustmann EM i Omenn GS. *Risk Assessment*. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed. Klaassen CD (Eds). McGraw-Hill, New York 1996; 75-88.
- Feldman RG, Ratner MH, Feldman ES. *Approach to neurotoxicity tort cases*. Neurologic Clinics 1999; 17:267-281.
- Fernald Environment Management Project (FEMP). *Technical basis for internal dosimetry at the Fernald environmental management project, revision 3*, FEMP 1997.
- Fisenne IM, Perry PM, Decker KM i Keller HK. *The Daily Intake of 234,235,238U, 228,230,232Th and 226,228Ra by New York City Residents*, Health Physics 1987; 53:357-363.
- Fisenne IM. *Long lived radionuclides in the environment, in food and in humans*. Fifth International Symposium on the Natural Radiation Environment, tutorial sessions, Report EUR 14411, EN, Commission of the European Communities, ISSN 1018-5593, 1993.
- Fisher DR, Swint MJ, Kathren RL. *Evaluation of health effects in equoyah Fuels corporation workers from accidental exposure to uranium hexafluoride, US*. Nuclear Regulatory commission 1990, Washington DC. NUREG/CR-5566 PNL-7328.
- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Winstck M. *Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats*. Physiology and Behavior 1986; 37:681-687.
- Fujii J, Luchi Y, Matsuki S, Ishii T. *Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues*. Asian Journal of Andrology 2003; 5:231-242.

- Fulco CE, Liverman CT, Sox HC (Eds). *Gulf War and Health. Depleted uranium, sarin, pyridostigmine bromide, vaccines*. National Academy Press 2000; Vol 1, Washington DC. <http://wwwbooks.nap.edu/catalog/9953.html>.
- Gandy J, Millner GC, Bates HK, Casciano DA, Harbison RD. *Effects of selected chemicals on the glutathione status in the male reproductive system of rats*. Journal of Toxicology and Environmental Health 1990; 29:45-57.
- Geissler PW, Mwaniki DL, Thiongo F, Friis H. *Geophagy among school children in Western Kenya*. Tropical Medicine and International Health 1997; 2(7):624-630.
- Gerber GJ i O'Shaughnessy D. *Comparison of the behavioral effects of neurotoxic and systemically toxic agents: how discriminatory are behavioral tests of neurotoxicity?* Neurobehaviour Toxicology and Teratology 1986; 8:703-710.
- Gesi M, Riva A, Soldani P, Fornai F, Natale G, Lenzi P, Pellegrini A, Paparelli A. *Central and peripheral benzodiazepine ligands prevent mitochondrial damage induced by noise exposure in the rat myocardium: an ultrastructural study*. Anatomical Record 1999; 225:334-341.
- Gibson R. *Zinc nutrition in developing countries*. Nutrition Research Reviews 1994; 7:151-173.
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secoures VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ, Moss MA. *Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat*. Toxicological Sciences 1998a; 41:117-128.

- Gilman AP, Villeneuve DC, Securs VE, Yagminas AP, Tracy BL, Wuinn JM, Valli VE, Wiles RJ i Moss MA. *Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit*. Toxicological Science 1998b; 41(1):129-137.
- Golden MH i Golden G. *Trace elements*. British Medical Bulletin 1981; 37:31-36.
- Gómez M, Esparza JL, Domingo JL, Singh PK, Jones MM. *Aluminum distribution and excretion: a comparative study of a number of chelating agents in rats*. Pharmacology and Toxicology 1998; 82:285-300.
- Goyer RA. *Toxic effects of metals*. In: Casarett & Doull's. Toxicology. The basic science of poisons. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, and Root RK (Eds). McGraw-Hill Companies, New York 1996; 691-693.
- Grandin T. *Assessment of stress during handling and transport*. Journal of Animal Sciences 1997; 75:249-257.
- Gunnar MR i Barr RG. *Stress, early brain development, and behavior*. Infants Young Child 1998; 11:1-14.
- Gunnar MR. *Quality of early care and buffering of neuroendocrine stress reactions: potential effects on the developing human brain*. Preventive Medicine 1998; 27:208-211.
- Gurr E. *Synthetic Dyes in Biology, Medicine and Chemistry*. Academic Press 1971, London, New York.
- Hahn FF, Guilmette RA, Hoover MD. *Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats*. Environmental Health Perspectives 2002; 110:51-59.

- Harley JH. *Naturally occurring sources of radioactive contamination. Radionuclides in the food chain*. MW Carter (Ed), International life sciences institute monographs 1988; 58-71. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Harley NH, Foulkes EC, Hilbourne LH, Hudson A i Anthony CR. *A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War illnesses*. Volume 7: Depleted uranium, 1999. RAND, National Defence Research Institute, Washington, USA.
- Hass U, Lund SP, Simonson L, Fries AS. *Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats*. *Neurotoxicology and Teratology* 1995; 17:341-349.
- Herranz M, Abelairas A, Legarda F. *Uranium contents and associated effective doses in drinking water from Biscay (Spain)*. *Applied Radiation and Isotopes* 1997; 48(6):867-861.
- Herranz M, Abelairas A, Legarda F. *Uranium contents in raw waters from Biscay (Spain)*. *Applied Radiation and Isotopes* 1999; 51(2):203-208.
- Hissin PJ, Hilf R. *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. *Analytical Biochemistry* 1976; 74: 214-226.
- Hooper FJ, Squibb KS, Siegel EL, McPhaul K, Keogh JP. *Elevated urine uranium excretion by soldiers with retained uranium shrapnel*. *Health Physics* 1999; 77(5):512-519.
- Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P. *Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat*. *Neurotoxicology* 2005; 26:1015-1020.

- International Commission for Radiation Protection (ICRP). *Human respiratory tract model for radiological protection*, ICRP-66, Annals of the ICRP, 1994; 24(1-3).
- International Commission for Radiation Protection (ICRP). *Age-Dependent Doses to Members of the Public From Intake of Radionuclides: Part 3. Ingestion Dose Coefficients*. ICRP-69; 1995. Pergamon Press Oxford, England.
- International Commission for Radiation Protection (ICRP). *Age-Dependent doses to Members of the Public From intake of Radionuclides: Part 5*. ICRP-72, Annals of the ICRP 1996; 25(2) Pergamon Press Oxford, England.
- Jette SJ. *Aerosolization of the M29A1 and XM900E1 rounds fired against hard targets*. Pacific Northwest Laboratory, Report PNL-7452, 1990.
- Joels M. *Steroid hormones and excitatory in the mammalian brain*. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1997; 18:2-24.
- Kaneko T, Luchi Y, Kawachiya S, Fujii T, Saito H, Kurachi H, Fujii J. *Alteration of glutathione reductase expression in reproductive organs during the estrous cycle*. *Biology of Reproduction* 2001; 65:1410-1416.
- Kaneko T, Luchi Y, Kobayashi T, Fujii T, Saito H, Kurachi H, Fujii J. *The expression of glutathione reductase in the male tract of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis*. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269:1570-1578.
- Kathren RL i Moore RH. *Acute accidental inhalation of U: a 38 year follow-up*. *Health Physics* 1986; 51(5):609-619.

- Kathren RL, McInvoy JF, Moore RH, Dietert SE. *Uranium in the tissue of occupationally exposed individuals*. Health Physiology 1989; 57:17-21.
- Kaushik S i Kaur J. *Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues*. Clinica Chimica Acta 2003; 333:69-77.
- Kaye GWC i Laby TH. *Tables of physical and chemical constants*. Longman Group Ltd, 15th edition, 1993, Essex, UK.
- Khera KS. *Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformation in mice*. Teratology 1984; 24:411-416.
- Khera KS. *Maternal toxicity in humans and animals. Effects on fetal development and criteria for detection*. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis 1987; 7:287-295.
- Kimmel CA, Cuff JM, Kimmel FL, Heredia DJ, Tudor N, Silverman PM, Chen J. *Skeletal development following heat exposure in the rat*. Teratology 1993; 47:229-242.
- Kimmel CA, Reginald OC, Robert ES. *Teratogenic potential of noise in mice and rats*. Toxicology and Applied Pharmacology 1976; 36:239-245.
- King JA i Edwards E. *Early stress and genetic influences on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in adulthood*. Hormones and Behavior 1999; 36:79-85.
- Kinsley C i Svare B. *Prenatal stress effects: are they mediated by reductions in maternal food and water intake and body weight gain?* Physiology and Behaviour 1986; 37:191-193.
- Kishi R, Chen BQ, Katakura Y, Ikeda T, Miyake H. *Effect of prenatal exposure to styrene on the neurobehavioral development, activity, motor coordination, and learning behavior of rats*. Neurotoxicology and Teratology 1995; 17:121-130.

- Koob GF, Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Britton KT. *Corticotropin releasing factor, stress and behavior*. Seminars in Neurosciences 1994; 6:221-229.
- Kovacs P, Juranek I, Stankovicova T, Svec P. *Lipid peroxidation during acute stress*. Pharmazie 1996; 51:51-53.
- Krishnan K i Brodeur J. *Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience*. Environmental Health Perspectives 1994; 102(9):11-17.
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen LL, Vaisanen SB, Penttila LLM, Komulainen H. *Renal effects of uranium in drinking water*. Environmental Health Perspectives 2002; 110:337-342.
- Lachuer J, Delton I, Buda M, Tappaz M. *The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. Brain Research 1994; 638:196-202.
- Ladron de Guevara J i Moya Pueyo V. *Toxicología Médica. Clínica y Laboral*. Interamericana, McGraw-Hill, Madrid 1995.
- Landa ER i Councell TB. *Leaching of uranium from glass and ceramic foodware and decorative items*. Health Physics 1992; 63: 343-348.
- Leach L, Maynard E, Hodge C. *A five-year inhalation study with natural uranium dioxide dust*. Health Physics 1970; 18:599-612.
- Leach L, Yuile C, Hodge H. *A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. Post-exposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat*. Health Physics 1973; 25:239-258.

Bibliografia

- Leach L, Gelein R, Panner B. *The acute toxicity of the hydrolysis products of uranium hexafluoride (UF₆) when inhaled by the rat and guinea pig*. Final report 1984. ISS K/SUB-81-9039-3. US National Technical Information Service, Document DE84011539.
- Ledvina R, Kolar L, Frana J. *Uranium, thorium and some other elements in topsoils of the Trebon region from the aspect of production contamination*. Rostlinna Vyroba 1996; 42(2):73-78.
- Leggett RW i Harrison JD. *Fractional absorption of ingested uranium in humans*. Health Physics 1995; 68:484-498.
- Leggett RW. *The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment*. Health Physiology 1989; 57:365-383.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. *Prenatal stress produces deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus*. Neurobiology 2000; 97:11032-11037.
- Lestaevel P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. *The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium*. Toxicology 2005; 212:219-226.
- Lightman SL. *How does the hypothalamus respond to stress?* Seminars in Neurosciences 1994; 6:215-219.
- Lin R, Wu L, Lee C. *Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells*. Mutation Research 1993; 319:197-203.
- Linsalata P. *Uranium and thorium decay series radionuclides in human and animal foodchains*. Journal of Environmental Quality 1994; 23:633-642.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. *Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats*. FASEB Journal 1996; 10:1532-1538.

- Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL. *Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice*. *Fundamental Applied Toxicology* 1991; 16:821-829.
- Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J. *Reproductive toxicity evaluation of sodium metavanadate in male mice*. *Toxicology* 1993; 80:199-206.
- Lu S i Zhao FY. *Nephrotoxic limit and annual limit on intake for natural U*. *Health Physics* 1990; 58(5):619-623.
- Lucchini R, Albini E, Placidi D, Alessio L. *Mechanism of neurobehavioral alteration*. *Toxicology Letters* 2000; 112-113:35-39.
- Luine V, Villegas M, Martínez C, McEwen BS. *Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance*. *Brain Research* 1994; 639:167-170.
- Luine V, Martínez C, Villegas M, Magariós AM, McEwen BS. *Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance*. *Physiology and Behaviour* 1996; 59:27-32.
- MacPhail RC. *Behavioral analysis in neurotoxicology*. In: *Neurobehavioral Toxicity. Analysis and interpretation*. Weiss B, O'Donoghue JL (Eds), Raven Press, New York 1994; 2:7-18.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. *Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain*. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24:420-429.
- Magariños AM i McEwen BS. *Stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors*. *Neuroscience* 1995; 69:89-98.

- Malenchenko AF, Barkun NA, Guseva GF. *Effect of uranium on the induction and course of experimental autoimmune orchitis and thyroiditis*. Journal of hygiene, epidemiology, microbiology and immunology 1978; 22:268-277.
- Manson JM i Kang YJ. *Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology*. In: Principles and methods of toxicology. 2ed. Hayes AW (ed), Raven press, New York 1989; 311-359.
- Marcilhac A i Siaud P. *Regulation of the adrenocorticotrophin response to stress by the central nucleus of the amygdala in rats depends upon the nature of the stressor*. Experimental Physiology 1996; 81:1035-1038.
- Maynard EA i Hodge HC. *Studies of the toxicity of various uranium compounds when fed to experimental animals*. Voeglen C (Ed). Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds, McGraw-Hill, New York 1949; 1: 309-376.
- Maynard EA, Downs WL, Hodge HC. *Oral toxicity of uranium compounds*. In: Voegtlin C, Hodge HC (Eds), Pharmacology and Toxicology of Uranium, McGraw-Hill, New York 1953; 3:1221-1369.
- McClain DE, Benson KA, Dalton TK, Ejnik J, emond CA, Hodge SJ, Kalinich JF, Landauer MA, Miller AC, Pellmar TC, Stewart MD, Villa V, Xu J. *Biological effects of embedded depleted uranium (DU):summary of armed forces radiobiology research institute research*. The science of the total environment. 2001; 274:115-118.
- McConnell MA, Ramanujam VMS, Alcock NW, Gabehart GJ and Au WW. *Distribution of uranium-238 in environmental samples from a residential area impacted by mining and milling activities*. Environmental Toxicology and Chemistry 1998; 17(5):841-850.

- McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown I, Hamilton M, Jacobson-Kram D, Burrows B, Walsh M. *Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans*. Environmental Research 2000; 82:168-180.
- McDiarmid MA. *Depleted uranium and public health*. British Medical Journal 2001; 322:123-124.
- McDiarmid MA, Engelhardt S, Olivier M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Handwerker B, Albertini RJ, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS. *Health effects of depleted uranium on exposed gulf war veterans: a 10-year follow-up*. Journal of Toxicology and Environmental Health 2004; 67:277-296.
- McDonald-Taylor CK, Bhatnagar MK, Gilman A, Yagminas A, Singh A. *Uranyl nitrate-induced glomerular basement membrane alterations in rabbits: a quantitative analysis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 1992; 48(3):367-373.
- McDonald-Taylor CK, Singh A i Gilman A. *Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis*. Journal of Toxicological Pathology 1997; 25(4):381-389.
- McEwen BS. *Introduction: stress and nervous system*. Seminars in Neurosciences 1994a; 6:195-196.
- McEwen BS. *Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior*. In: Basic Neurochemistry. Siegel GS, Agranoff BW, Wayne R, Molinoff PB (eds), Raven Press, New York 1994b; 893-913.

- McGivern RF, Poland RE, Taylor AN, Branch BJ, Raum WJ. *Prenatal stress feminizes adult male saccharin preference and maze learning: antagonism by propranolol*. Monographs in Neural Sciences 1986; 12:172-178.
- Meaney MJ, Tannenbaum B, Francis D, Bhatnagar S, Shanks N, Viau V, O'Donnell D, Plotsky PM. *Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. Seminars in Neurosciences 1994; 6:247-259.
- Miller DB i Chernoff N. Restraint-induced stress in pregnant mice. *Degree of immobilization affects maternal indices of stress and development outcome in offspring*. Toxicology 1995; 98:177-186.
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, Whittaker T, Xu J, Ejnik JW, Hamilton MM, Parlette E, St John T, Gerstenberg HM, Hsu H. *Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by DU-urynal chloride*. Environmental Health Perspectives 1998a; 106(8):465-471.
- Miller AC, Fuciarelli AF, Jackson WE, Ejnik EJ, Emond C, Strocko S, Hogan J, Page N, Pellmar T. *Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with DU or tantalum pellets*. Mutagenesis 1998b; 13(6):643-648.
- Misra HP, Fridovich I. *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. Journal of Biological Chemistry 1972; 247: 3170-3175.
- Misund A, Frengstad B, Siewers U, Reimann C. *Variation of 66 elements in European bottled mineral waters*. The Science of the Total Environment 1999; 243/244:21-41.

- Moorcraft WH. *Heightened arousal in the 2-week-old rat: the importance of starvation*. *Developmental Psychobiology* 1981; 14:187-199.
- Morishina HO, Pedersen H, Finster M. *The influence of maternal psychological stress on the fetus*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1978;131:286-290.
- Morris RGM. *Spatial localization does not require the presence of local cues*. *Learning and Motivation* 1981; 12:239-260.
- Morris R. *Developmental of a water maze-procedure for studying spatial learning in the rat*. *Journal of Neurosciences Methods* 1984; 11:47-56.
- Morrow PE, Gelein R, Beiter H. *Inhalation and intravenous studies of UF6/UO2F2 in dogs*. *Health Physiology* 1982; 43:859-873.
- Muller C, Ruzicka L, Bakstein J. *The sex ratio in the offspring of uranium miners*. *Acta Univ Carol Medicina (Praha)* 1967; 13:599-603.
- Murata M, Takigawa H, Sakamoto H. *Teratogenic effects of noise and cadmium in mice: does noise have teratogenic potential?*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1993; 39:237-245.
- Nagahara AH, Otto T, Gallagher M. *Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze*. *Behavioral Neuroscience* 1995; 109:3-9.
- Nawrot PS, Cook RO, Staples RE. *Embriotoxicity of various nois stimuli in the mouse*. *Teratology* 1980; 22:279-289.

Bibliografia

- National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP). *Exposures from the uranium series with emphasis on radon and its daughter*. NCRP 1984, Report No 77, Bethesda, Maryland, USA.
- Nelson WE, Vaughan VC, McKay RJ. *Tratado de Pediatría*. Salvat (Eds), Barcelona 1980; 1386-1387.
- Nelson BK. *Interactions in developmental toxicology: a literature review and terminology proposal*. *Teratology* 1994; 49:33-71.
- Neubert D, Barrach HJ, Merker HJ. *Drug-induced damage to the embryo or fetus (molecular and multilateral approach to prenatal toxicology)*. *Current Topics in Pathology* 1980; 9:241-233.
- NRC. *Measuring Lead Exposure in Infants, children and Other Sensitive Populations*. Washington, DC: National Academy Press 1993.
- Orchinik M. *Glucocorticoids, stress, and behavior: shifting the timeframe*. *Hormones and Behaviour* 1998; 34:320-327.
- Ozmen M i Yurekli M. *Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998; 6(2):111-115.
- Paparelli A, Soldani P, Breschi MC, Martinotti E, Scatizzi R, Berrettini S, Pellegrini A. *Effects of subacute exposure to noise on the noradrenergic innervation of the cardiovascular system in young and aged rats: a morphofunctional study*. *Journal of Neural Transmission* 1992; 88:105-113.
- Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM. *The effects of uranium on reproduction, gestation and postnatal survival in mice*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 1989; 17:291-296.

- Paule MG, Reuhl K, Chen JJ, ali SF, Slikker WJr. *Developmental toxicology of trimethyltin in the rat*. Toxicology and Applied Pharmacology 1986; 84:412-417.
- Pavlakis N, Pollock CA, McLean G, Bartrop R. *Deliberate overdose of uranium: toxicity and treatment*. Nephron 1996; 72:313-317.
- Pellmar TC, Hogan JB, Benson KA, Landauer MR. *Health risk assessment of embedded DU: behaviour, psychology and histology -6 month time point*. AFFRI Special Report 1997; 97-4.
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM i Landauer MR. *Distribution of uranium in rats implanted with DU pellets*. Toxicological Sciences 1999a; 49:29-39.
- Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB. *Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments*. Neurotoxicology 1999b; 20(5);785-792.
- Peters DA. *Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone level*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 1982; 17:721-725.
- Polednak i Frome E. *Mortality among men employed between 1943 and 1947 at a uranium-processing plant*. Journal of Occupational Medicine 1981; 23:168-178.
- Pozzani U. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-Hill Book Company 1949, Inc., New York, USA.
- Rasco JF i Hood RD. *Effects of maternal restraint stress and sodium arsenate in mice*. Reproductive Toxicology 1994; 8:49-54.

Bibliografia

- Rasco JF i Hood RD. *Maternal restraint stress-enhanced teratogenicity of all-trans-retinoic acid in CD-1 mice*. *Teratology* 1995; 57-62.
- Repetto M. *Toxicología fundamental*. Díaz de Santos (Eds), Madrid 1997.
- Rhees RW i Fleming DE. *Effects of malnutrition, maternal stress, or ACTH injection during pregnancy on sexual behavior of male offspring*. *Physiology and Behaviour* 1981; 27:879-882.
- Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. *Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid*. *Clinical Chemistry* 1992; 38: 704-709.
- Rivera S, Sanfeliu C, Rodríguez-Farré E. *Behavioral changes induced in developing rats by an early postnatal exposure to lindane*. *Neurotoxicology and Teratology* 1990; 12:591-595.
- Roberts E. *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*. McGraw-Hill Book Company, New York 1949; 561-585.
- Roozendaal B i McGaugh JL. *Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats*. *European Journal of Neurosciences* 1997; 9:76-83.
- Rothermel J. *Uranium tetrachloride: pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-hill 1949, New York, USA.
- Rothstein A. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-Hill 1949, New York; 548-648.
- Rowett HG. *The rat as a small mammal*. John Murray, London 1960. UK.

- Rugh R. *The mouse. Its reproduction and development*. Oxford Science Publications 1990; Oxford. UK.
- Russell JJ, Kathren RL, Dietert SE. *A histological kidney study of uranium and non-uranium workers*. Health Physics 1996; 70(4):466-472.
- Salvetti F, Chelli B, Gesi M, Pellegrini A, Giannaccini G, Lucacchini A, Martini C. *Effect of noise exposure on rat cardiac peripheral benzodiazepine receptors*. Life Sciences 2000; 66:1165-1175.
- Sánchez DJ, Gómez M, Llobet JM, Corbella J, Domingo JL. *Effects of aluminum on the mineral metabolism of rats in relation to age*. Pharmacology and Toxicology 1997; 80:11-18.
- Sánchez DJ, Bellés M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL. *Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats*. Biological Trace Elements Research 2001; 84:139-154.
- Sandi C, Venero C, Cordero MI. *Estrés, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento*. Ariel Neurociencia 2001, Barcelona.
- Sapolsky RM. *Glicocorticoids, stress and exacerbation of excitotoxic neuron death*. Seminars in Neurosciences 1994a; 6:323-331.
- Sapolsky RM. *Individual differences and the stress response*. Seminars in Neurosciences 1994b; 6:261-269.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. Endocrine Reviews 2000; 21:55-89.

- Schaich KM. *Metals and lipid oxidation*. Contemporary issues, Lipids 1992; 27(3):209-218.
- Schneider ML, Clarke AS, Kraemer GW, Roughton EC, Lubach GR, Rimmkaufman S, Schmidt D, Ebert M. *Prenatal stress alters brain biogenic amine levels in primates*. Development and Psychopathology 1998; 10:427-440.
- Scialli AR. *Is stress a developmental toxin?* Reproductive Toxicology 1988; 1:163-171.
- Selye H. *The alarm reaction*. Canadian Medical Association Journal 1936; 34:706.
- Selye H. *Stress and disease*. Science 1955; 122:625-631.
- Singh NP, Bennett DD, Wrenn M. *Concentrations of alpha-emitting isotopes of U and Th in uranium miner's and miller's tissues*. Health Physiology 1987; 53:261-265.
- Slikker WJr. *Principles of developmental neurotoxicology*. Neurotoxicology 1994; 15:11-16.
- Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Cristofani R, Paparelli A. *SEM/TEM investigation of rat cardiac subcellular alterations induced by changing duration of noise stress*. Anatomical Record 1997; 248:521-532.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. *Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement*. Neuroscience 2000; 97:253-266.
- Spencer HS, Osis D, Fisenne IM, Perry P, Harley NH. *Measured intake and excretion patterns of naturally occurring ²³⁸U and calcium in humans*. Radiation Research 1990; 24:90-95.

- Spiegel C. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-Hill 1949, New York, USA.
- St. Omer VE, Ali SF, Holson RR, Scalzo FM, Slikker WJr. *behavioral and neurochemical effects of prenatal methylene dioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats*. *Neurotoxicology and Teratology* 1991; 13:13-20.
- Stam R, Croiset G, Bruijnzeel AW, Visser RJ, Akkermans LMA, Wiegant WM. *Sex differences in long-term stress-induced clonic, behavioural and hormonal disturbances*. *Life Sciences* 1999; 64:2837-2849.
- Stokinger HE, Baxter RC, Dygert HP. *Toxicity following inhalation for 1 and 2 years*. Voegtlin C, and Hodge HC (Eds), *Pharmacology and Toxicology of Uranium compounds* 1953; vols 3-4, McGraw-Hill, New York.
- Stott DN. *Follow-up study from birth of the effects of prenatal stress*. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1973; 15:770-787.
- Stout SC i Nemeroff CB. *Stress and psychiatric disorders*. *Seminars in Neuroscience* 1994; 6:271-280.
- Suter KF i Schön H. *Testing strategies in behavioral teratology: I. Testing battery approach*. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 1985; 8:561-566.
- Szuran T, Zimmermann E, Pliska V, Pfister HP, Welzl H. *Prenatal stress effects on exploratory activity and stress-induced analgesia in rats*. *Developmental Psychobiology* 1991; 24:361-372.
- Szuran T, Zimmermann E, Welzl H. *Water maze performance and hippocampal weight of prenatally stressed rats*. *Behavior Brain Research* 1994; 65:153-155.

- Tannenbaum A, Silberstone H, Kosiol J. *The distribution and excretion of uranium in mice, rats and dogs*. Tannenbaum A (Eds), *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds 1951*; 128-181. McGraw-Hill, New York.
- Taylor DM i Taylor SK. *Environmental uranium and human health*. *Reviews on Environmental Health* 1997; 12:147-157.
- Thorne BM, Cook A, Donhoe T, Lyon S, Medeiros DM, Moutzoukis C. *Aluminum toxicity and behavior in the weanling Long-Evans rat*. *Bulletin of the Psychonomic Society* 1987; 25:129-132.
- Torrente M, Colomina MT, Domingo JL. *Effects of prenatal exposure to manganese on postnatal development and behavior in mice: influence of maternal restraint*. *Neurotoxicology and Teratology* 2002; 24:219-225.
- Torrente M, Colomina MT, Domingo JL. *Behavioral effects of adult rats concurrently exposed to high doses of oral manganese and restraint stress*. *Toxicology* 2005; 211:59-69.
- United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). *Drinking water criteria document for uranium*, EPA Report PB86-241049, 1985. Washington DC, USA.
- United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). *Environmental Radiation Data*, Report 42, 1986. NTIS PB166311. Washington DC, USA.
- United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). *Review of RSC Analysis*. Report prepared by Wade Miller Associates, Inc for the US Environmental Protection Agency, 1991. Washington DC, USA.

- United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). *Radionuclides (Uranium, Radium and Radon)*, 2000. In United Air Toxics Website, Office of Air Quality Planning and Standards, <http://www.epa.gov/ttnuatw1/hlef/radionuc.html>.
- United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). *EPA facts about uranium*, 2002. Available at: <http://www.epa.gov/superfund/resources/radiation/pdf/uranium.pdf>.
- The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). UNSCEAR 2000; Report to the General Assembly.
- Valdés M i De Flores T. *Psicobiología del estrés*. Martínez Roca (Eds), Barcelona 1986.
- Vogel MH. *Stress –the neglected variable in experimental pharmacology and toxicology*. Trends in Pharmacological Sciences 1987; 8:35-38.
- Vogel WH. *The effects of stress on toxicological investigation*. Human Exposure Toxicology 1993; 12:265-271.
- Vom Saal FS. *Variation in infanticide and parenteral behavior in male mice due to prior intrauterine proximity to female fetuses: elimination by prenatal stress*. Physiology and Behaviour 1983; 30: 675-681.
- Wadhwa PD, Porto M, Sandman CA, Garite TJ. *A biopsychosocial investigation of the effects of stress on birth outcomes*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1993; 168:320.

Bibliografia

- Ward GR i Wainwright PE. *Reproductions in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice*. Physiology and Behaviour 1988; 44:781-786.
- Wedeen RP. *Renal diseases of occupational origin*, Occupational Medicine 1992; 7:449.
- Weiss B. *Risk assessment: the insidious nature of neurotoxicity and the aging brain*. Neurotoxicology 1990; 11:305-323.
- Weiss I, Pryce CR, Jongen-Relo AI, Nanz-Bahr NI, Feldon J. *Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat*. Behavior Brain Research 2004; 152:279-295.
- Weiss B i O'Donoghue JL. *Neurobehavioral Toxicity*. Analysis and interpretation. Raven Press 1994, New York.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. *Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity*. Analytical Biochemistry 1990; 184: 193-199.
- World Health Organization (WHO). *Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-based Exposure Limits*, Environmental Health Criteria 1994; 170, WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). *Guidelines for drinking-water Quality*. Addendum to Volume 2, 1998. Health criteria and other supporting information WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). *Depleted Uranium. Sources, Exposure and Health Effects*. Department of Protection of the Human Environment. Report No:WHO/SDE/PHE/01.1, 2001. WHO, Geneva, Switzerland.

- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET, Willis DL. *Metabolism of ingested U and Ra*. Health Physiology 1985; 48:601-633.
- Wyrobeck AJ i Bruce WR. *Chemical induction of sperm abnormalities in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1975; 72:4425-4429.
- Zaire R, Notter M, Riedel W, Thiel E. *Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners*. Radiation Research 1997; 147:579-584.
- Zelikoff JT, Bertin JE, Bubacher TM, Hunter ES, Miller RK, Silbergeld EK, Tabacova S, Rogers JM. *Health risks associated with prenatal metal exposure*. Fundamental Applied Toxicology 1995; 25:162-170.

- 1.** De forma generalitzada, no s'observen variacions en els tests d'aprenentatge realitzats a mascles exposats a urani, ni en funció de les dosis administrades ni per l'estrès.
- 2.** L'exposició oral a l'urani de manera crònica produeix alteracions en la morfologia i la producció d'esperma. L'estrès aplicat conjuntament no potencia aquests efectes.
- 3.** No s'observen diferències significatives en el pes dels testicles, així com en la ràtio del pes del testicle/pes corporal i pes de l'epidídim, en funció de les dosis d'urani emprades, ni pel fet d'estar estressats o no.
- 4.** En els animals exposats a urani, la concentració augmenta significativament en tots els òrgans estudiats. L'estrès no modifica la concentració d'urani ni al cervell ni al testicle ni al ronyó.
- 5.** L'administració de dosis elevades d'urani produeix una important transformació angiomatosa al ronyó. L'aplicació de l'estrès conjuntament amb l'urani no potencia significativament aquests efectes.
- 6.** L'urani provoca alteracions morfològiques progressives als túbuls seminífers dels testicles en funció de la dosi. L'estrès no modifica significativament aquest paràmetre.
- 7.** En el testicle augmenta l'SOD, i disminueixen la GR i el GSH com a conseqüència de l'exposició a l'urani. L'estrès no potencia aquests efectes.
- 8.** L'urani, però no l'estrès, provoca un augment dels valors de TBARS, GSSG i SOD en el ronyó.
- 9.** Al cervell, l'efecte de l'urani es manifesta amb una alteració dels valors de TBARS, GPx, GR i del sistema del glutatió. L'estrès, aplicat conjuntament, no potencia aquests efectes.

- 10.** No s'observen, de forma global, diferències significatives en el nombre total d'implantacions, implantacions viables i no viables/ventrada. No obstant això, l'urani provoca una disminució, no dependent de la dosi, del percentatge de femelles prenyades.
- 11.** En la descendència dels animals exposats a urani, els diferents paràmetres de desenvolupament físic i neuromotor, així com d'aprenentatge, globalment no es veuen afectats. A més, l'estrès no modifica els resultats.

CONCLUSIÓ GLOBAL

L'exposició a urani per via oral crònica en rates produeix signes de toxicitat en testicles, ronyó i cervell. L'estrès, per immobilització, aplicat conjuntament amb l'urani a les dosis estudiades no en potència els efectes. No obstant això, aquests resultats no comporten que l'estrès en general es pugui descartar com a factor potenciador del efectes de l'urani en altres dosis.

Als meus pares,

Al Josep

1. Efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a urani i estrès en rates mascle adultes

L'urani empobrit és un element potencialment tòxic des del punt de vista químic i radiològic. Els efectes per a la salut depenen de la naturalesa física i química de l'urani al qual l'individu hagi estat exposat, així com de la concentració i durada de l'exposició.

S'han realitzat diferents estudis que avaluen els efectes d'aquest metall. Els resultats obtinguts no són unànimes. Recentment Briner i Murray (2005) han posat de manifest que el DU és una toxina que traspasa la barrera hematoencefàlica i s'acumula a l'SNC, on s'han observat canvis electrofisiològics que provoquen alteracions en la conducta de rates mascle (Pellmar i col·ls., 1999b; McClain i col·ls., 2001). Briner (2002) va trobar que l'exposició a DU en l'aigua de beguda altera el desenvolupament i el comportament de ratolins i de rates. En canvi en aquest treball només hem trobat alteracions puntuals en algun grup dels exposats a l'urani. No s'ha trobat cap empitjorament ni en l'activitat motora (camp obert), ni en l'aprenentatge (laberint d'aigua), ni en la memòria recent (*passive avoidance*).

McDiarmid i col·ls. (2004) han fet un seguiment mèdic sobre els efectes del DU en veterans de la guerra del Golf deu anys després de l'exposició. D'acord amb els nostres resultats tampoc han observat diferències estadístiques entre els grups exposats a baixes i altes dosis d'urani sobre els paràmetres neurocognitius realitzats.

A més a més de l'estudi dels efectes de l'urani hem avaluat la influència de l'estrès per immobilització sobre aquests. L'estrès crònic indueix efectes deleteris en l'hipocamp (Sousa i col·ls., 2000). L'hipocamp està implicat en la memòria espacial i l'eix hipotalamohipofític adrenal, en el cicle dia-nit i l'ansietat. Els efectes neurològics observats després de l'exposició crònica a l'urani són similars als produïts per l'estrès crònic (Houpert i col·ls., 2005). S'ha vist que l'estrès crònic induïa un perfil ansiogènic (Weiss i col·ls., 2004) de la mateixa manera que fa l'urani. A diferència d'aquests treballs, en l'actual estudi, l'estrès no ha potenciat els efectes de l'urani per a cap dels grups d'animals exposats. Aquest fet també s'ha observat en estudis realitzats amb altres metalls com l'alumini i el manganès (Torrente i col·ls., 2005).

2. Efectes sobre la reproducció en rates mascle adultes tractades amb urani i estrès

Fins fa pocs anys, s'ha prestat poca atenció als possibles efectes adversos de l'exposició a l'urani (incloent-hi DU) sobre la reproducció humana. No ha estat fins l'inici de la guerra del Golf que s'han dut a terme estudis més exhaustius sobre la toxicitat d'aquest metall.

En un estudi sobre la ràtio del sexe en la descendència d'homes miners es va veure més descendència femenina de l'esperada, la qual cosa suggeria una possible alteració en l'esperma (Müller i col·ls., 1967). També s'ha descrit una disfunció del sistema endocrí-gonadal, amb una reducció significativa dels nivells de testosterona, en miners de Namíbia, comparats amb individus sense relació ocupacional amb la mina (Zaire i col·ls., 1997).

En aquest treball hem avaluat diferents paràmetres reproductors: concentració, funcionalitat i morfologia de l'esperma de rates mascle exposades a urani i estrès. S'han trobat alteracions en la morfologia i la producció d'espermatozoides com a conseqüència del tractament, però independents de la dosi d'urani. Al igual que en els resultats obtinguts per Llobet i col·ls. (1991), la funció testicular/espermatogènica no s'ha afectat per a cap dosi d'AUD. Això s'ha fet evident per als pesos normals dels testicles i epidídimis i una espermatogènesi normal. La principal afectació trobada és una disminució significativa (no relacionada amb la dosi) en el percentatge de femelles prenyades. Estudis dels mateixos

paràmetres en humans (McDiarmid, 2001) han mostrat unes característiques seminals normals, sense evidències clíniques que afectessin la fertilitat de la persona.

A diferència d'estudis previs realitzats (Llobet i col·ls., 1991; McDiarmid i col·ls., 2004) també hem avaluat la possible interacció de l'estrès sobre els efectes d'aquest metall. En aquest cas, s'ha observat que per a les dosis i període d'exposició establert, l'estrès no ha modificat cap dels paràmetres reproductors avaluats. Recentment s'ha demostrat que l'estrès matern augmenta la toxicitat induïda per l'urani, sembla ser però, que no provoca els mateixos efectes sobre la fertilitat en els mascles (Colomina i col·ls., 1998; Albina i col·ls., 2003; Domingo i col·ls., 2004).

3. Efectes de l'urani i l'estrès sobre diferents òrgans diana. Avaluació de l'estat antioxidant en aquests òrgans

En determinar la concentració d'urani als diferents òrgans (ronyó, testicles i cervell) hem comprovat que efectivament s'acumula i, a més, els nivells més alts es corresponen a les dosis més elevades emprades (40 mg/kg/dia). A més, i de forma significativa, l'òrgan amb més contingut d'urani ha estat el ronyó, seguit del cervell i el testicle. En aquests resultats no s'ha observat cap variació significativa de la concentració d'urani a causa de l'estrès. Aquest fet també s'ha observat en estudis realitzats amb altres metalls com el manganés (Chandra i col·ls., 1979; Torrente i col·ls., 2002).

Un dels efectes tòxics més descrits de l'urani és la nefrotoxicitat. Els ronyons excreten més del 90% dels components solubles de l'urani i menys d'un 1% és excretat a través de les femtes. Estudis realitzats tant amb animals (Diamond i col·ls., 1989; Gilman i col·ls., 1998a) com epidemiològics (Singh i col·ls., 1987; Kathern i col·ls., 1989) demostren que els ronyons són el primer reservori de l'urani. Tot i així, no han trobat un increment de la mortalitat en treballadors exposats al metall com a conseqüència del dany renal (Polednak i Frome, 1981; Checkoway i col·ls., 1988). Tot i que l'efecte més comú que provoca l'exposició a urani és una alteració tant dels túbuls proximals com dels glomèruls (Craft, 2004), en el present treball les alteracions més importants s'han trobat a nivell vascular. La transformació angiomatosa descrita s'ha fet més evident a les dosis d'urani més elevades (20 i 40 mg/kg/dia). Altra

alteració observada és un augment progressiu de la peroxidació lipídica renal segons augmenta la dosi d'exposició. Aquesta podria alterar la conductància iònica, fluïdesa de la membrana cel·lular o altres funcions cel·lulars (Schaich, 1992). A més hi ha una inducció de l'activitat de l'SOD a la dosi de 40 mg/kg/dia + estrès. Aquest és l'únic paràmetre renal afectat per l'estrès. L'increment en la producció dels TBARS reflexa la toxicitat cel·lular provocada per aquest metall. Possiblement les alteracions renals són la manifestació subclínica de la toxicitat provocada per l'urani. Hi ha certa ambigüitat sobre quines són les conseqüències sobre la salut d'aquestes manifestacions. D'altra banda, un estudi realitzat per Kurttio i col·ls. (2002), així com altres treballs sobre la cinètica de l'urani (WHO, 2001), descarten que els efectes de l'urani siguin acumulatius; és a dir, que tant en humans com en animals d'experimentació l'urani provoca una nefrotoxicitat reversible (Bentley i col·ls., 1985; Pavlakis i col·ls., 1996).

Respecte l'efecte de l'urani i l'estrès sobre els testicles i epidídim, l'avaluació histopatològica ha mostrat una alteració progressiva dels teixits. Hi ha alteracions tubulars i intersticials, sobretot pèrdua cel·lular, de cèl·lules de Sertoli, amb vacuolització citoplasmàtica. A diferència d'estudis previs realitzats per Llobet i col·ls. (1991), on no va ser fins la dosi de 80 mg/kg/dia que es va observar la vacuolització, en aquest treball les alteracions testiculars s'han detectat a dosis més baixes.

En relació a l'estat antioxidant, l'urani ha provocat una disminució significativa dels nivells testiculars de GSH i un augment força significatiu dels valors de l'SOD. A més a més, s'ha observat una disminució significativa de la GR testicular, la qual aporta GSH als espermatozoides (Gandy i col·ls., 1990; Kaneko i col·ls., 2001, 2002). Sembla ser que l'urani provoca alteracions en els valors de GSH, bé per disminució directa, bé per inhibició de la síntesi. Aquest fet, acompanyat de la disminució de l'activitat de la GR, provoca una menor activitat catalitzadora en la reducció del GSSG a GSH. El GPx, que rep electrons del GSH, i l'SOD són enzims que "segresten" ROS en els òrgans reproductors masculins (Fujii i col·ls., 2003). L'activació de l'SOD, en aquest treball és conseqüència d'un augment dels radicals lliures en aquest teixit a causa de les diferents dosis d'urani. A diferència d'altres metalls, com el cadmi i l'arsènic, la peroxidació lipídica en aquest teixit no és significativa. L'estrès no ha provocat cap alteració significativa d'aquests paràmetres. En cap cas s'ha apreciat una interacció entre l'estrès i l'urani.

A diferència del que succeeix al tracte reproductor, a les diferents fraccions del cervell s'observa una inducció de la peroxidació lipídica a causa de l'exposició a l'urani. Aquests resultats segueixen la línia dels efectes obtinguts per Briner i Davis (2002) en ratolins. En el present treball s'han trobat correlacions positives entre el contingut d'urani i els TBARS, tant en l'escorça com al cerebel. No obstant això, i discrepant resultats obtinguts per Briner i Murray (2005) en dues setmanes

d'exposició, no s'ha trobat cap correlació entre la peroxidació lipídica observada al cervell i l'activitat motora dels animals exposats durant tres mesos. La resta de sistemes antioxidants estudiats han mostrat pautes comunes en les tres regions d'estudi. La GR disminueix de forma significativa en la majoria dels teixits. S'ha descrit que l'estrès crònic per immobilització disminueix els nivells de GSH (Liu i col·ls., 1996; Madrigal i col·ls., 2001). No obstant això, en aquest treball, no hem apreciat cap alteració addicional a la obtinguda pel metall. A l'hipocamp també s'ha apreciat una correlació positiva entre el contingut d'urani i l'activitat de la SOD i la CAT, el que demostra clarament que l'augment de l'activitat antioxidant és la conseqüència de l'excés d'oxidació en un intent de restaurar parcialment l'homeostàsia cel·lular alterada com a conseqüència de l'exposició a l'urani. Aquests efectes també s'han observat amb altres metalls com l'alumini (Gómez i col·ls., 2005). L'activació diferenciada observada del sistema antioxidant en el cervell, probablement ve determinada per una vulnerabilitat d'aquest cap al dany oxidatiu, específica de cada regió (Kovacs i col·ls., 1996; Kaushik i Kaur, 2003).

4. Efectes tòxics embriofetals per l'exposició prenatal a urani i estrès, en rates mascle

En l'estudi realitzat per avaluar els efectes embriofetals per exposició a l'urani, no s'han observat diferències significatives en el nombre d'implantacions no viables, pes de l'úter gràvid o nombre d'implantacions per ventrada entre els animals exposats o no a l'urani. Les diferències entre grups de tractament han estat mínimes. Aquests resultats concorden amb un estudi previ realitzat amb ratolins (Llobet i col·ls., 1991) també exposats a urani a través de l'aigua de beguda. No obstant això, altres estudis on l'urani ha estat administrat a través de sonda intragàtrica (*gavage*) han mostrat signes d'embriofetalitat a la dosi de 25 mg/kg/dia (Paternain i col·ls., 1989).

Estudis realitzats per valorar la influència de l'estrès matern suggereixen que la immobilització pot augmentar la toxicitat induïda pel metall i afectar el desenvolupament postnatal i la conducta de les cries especialment a les dosis que són també tòxiques per a les mares (Torrente i col·ls., 2005). En el present estudi no s'han observat influències evidents de l'estrès en cap dels paràmetres avaluats. És evident que són molt diferents els efectes embriofetals provocats causats per l'estrès exercit sobre mares gestants, que els obtinguts al estressar les rates mascle abans de la fecundació, ja que durant la gestació les mares gestants no són sotmeses a estrès. L'únic efecte tòxic que podriem esperar vindria donat per una alteració dels paràmetres seminals.

5. Efectes postnatsals del desenvolupament i neuroconductuals en cries de rates mascle exposades a urani i estrès

Tot i que s'han dut a terme moltes investigacions on s'ha demostrat que l'estrès matern potencia la toxicitat embriofetal a nivell del desenvolupament i de la neuroconducta, induïda per metalls tals com l'alumini, l'arsènic o metilmercuri (Colomina i col·ls., 1996, 1997, 1998), en canvi no hi han dades sobre els efectes de la interacció metall + estrès sobre cries de mascles tractats abans de l'encreuament.

En aquest estudi, l'administració d'urani no ha provocat efectes significatius en els desenvolupament físic de les cries. No s'han observat diferències en l'índex de viabilitat, l'índex de lactància, dia del desplegament del pavelló auditiu, entre d'altres. Les úniques diferències han estat en el dia de l'erupció dels incisius en les dosis més elevades d'urani + estrès.

En relació a la maduració neuromotora de les cries, no es van trobar diferències significatives en els resultats del reflex d'adreçament i força en les extremitats anteriors. Al igual que en estudis realitzats amb el manganès (Torrente i col·ls., 2002), les úniques diferències entre grups s'han trobat en la geotaxi (només en femelles), van ser aïllades i no estaven relacionades amb la dosi. En l'avaluació de la conducta de les cries, no es van trobar diferències entre grups. Només i de forma aïllada, no relacionada amb la dosi, es van observar diferències en la distància

recorreguda o el temps en el test del *Water maze* (dies 1-3) i en el temps en el *Trial Probe* (dia 4).

Els resultats d'aquests experiments, juntament amb els d'estudis previs amb altres elements (Colomina i col·ls., 1995, 1999) indiquen que la influència de l'estrès en els efectes de l'exposició prenatal als metalls sobre la toxicitat embriofetal, el desenvolupament postnatal i posterior conducta, depenen de cada element de manera específica, més que d'una influència general d'una situació comuna.

DISCUSSIÓ GLOBAL

En termes generals, els resultats obtinguts en aquest treball demostren que l'estrès no potencia els efectes provocats per l'exposició a l'urani. De fet hi ha diversos factors que influeixen tant sobre el tòxic com sobre l'estrès i que podrien contribuir a que aquests resultats no hagin estat els esperats. Un d'aquests factors és la via d'administració de l'urani. En aquest treball la via d'elecció ha estat la via oral per la facilitat a l'hora d'administrar-la tenint en compte que el tractament ha estat crònic. Possiblement, la via optada no és la més homogènia donat que el volum d'aigua ingerit pels animals no és el mateix i per tant, la quantitat d'urani que reben tampoc és idèntica. També s'ha de tenir en compte que les rates estan engabiades de dos en dos de forma que no es pot discriminar la diferència de beguda ingerida per cada animal. A més a més hi ha moltes variables implicades en el procés d'absorció i per tant d'incorporació del metall en l'organisme. Aquests fets podrien explicar, en part, l'elevada variabilitat obtinguda en els resultats de diversos paràmetres estudiats. Una forma de reduir aquesta variabilitat podria ser l'augment del nombre d'animals per grup. No obstant això, l'elevada variabilitat també es veuria reflectida si féssim un estudi en la població humana (Taylor i Taylor, 1997; Arfsten i col·ls., 2005).

Un altre punt de discussió seria la baixa afectació de les dosis emprades i la possibilitat d'augmentar-les. En aquest treball es va optar per les dosis de 10, 20 i 40 mg/kg/dia que es corresponen a la 1/20, 1/10 i 1/5 de la DL₅₀ (Domingo i col·ls., 1987). Aquestes dosis es van basar en

estudis previs (Paternain i col·ls., 1989; Llobet i col·ls., 1991) on es van establir els efectes adversos de l'urani sobre la reproducció i el desenvolupament. El nivell màxim contaminant (NMC) que la US EPA 2000 estableix per l'urani en l'aigua de beguda és de 30 µg/L (US EPA, 2002). Això significa que un home adult de 70 kg consumint 2L/dia d'aigua, no hauria d'ingerir més de 60 µg d'urani per dia. Tenint en compte que aquesta quantitat és equivalent a 1,42 µg AUD/kg/dia i comparant-la amb la dosi més baixa emprada en aquest estudi (10 mg/kg/dia), el marge d'exposició és de 10.000 respecte els nivells d'urani permesos en la població humana, pel que seria incomprensible un augment molt elevat de les dosis de l'estudi. De totes maneres, s'ha de tenir en consideració que l'extrapolació entre espècies és un pas susceptible en l'avaluació de riscos.

D'altra banda, un altre factor a tenir en compte és el tipus d'estrès aplicat (per immobilització). És possible que al ser un estudi a llarg termini, i al aplicar l'estrès sempre a la mateixa hora, els animals hagin desenvolupat processos adaptatius a la immobilització; és a dir, s'hagin adaptat a la situació estressant. No obstant això, tot i que els efectes obtinguts per l'estrès en el present treball no són molt accentuats, en molts dels paràmetres avaluats (pes dels animals, anormalitats histopatològiques i altres), la tendència de l'estrès ha estat potenciar els efectes de l'urani, tot i que no de forma significativa. En estudis realitzats per avaluar el model d'estrès més adient en la interacció amb metalls (immobilització, soroll, administració d'hidro cortisona), no

sembla haver-hi masses diferències entre aquests. El que s'obté és una alteració en l'activitat més accentuada en els animals sotmesos a soroll de manera intermitent i, al igual que en el present treball, hi ha una variabilitat d'afectació interindividual molt elevada (Sapolsky RM, 1994b; Torrente i col·ls., 2002). Possiblement el soroll podria semblar-se més a les situacions reals que experimenta la població humana diàriament, la qual també presenta una susceptibilitat clarament diferenciada a l'estrès.

En relació als mètodes emprats per avaluar el comportament dels animals (Camp obert, Evitació passiva i laberint d'aigua de Morris), tot i que són els més habituals, no podem descartar que aplicant altres tipus de tests (T-maze, Y-maze, braç radial, test d'habitució, test de la cinta adhesiva, test del cilindre, escala horitzontal i d'altres) podríem confirmar els resultats obtinguts i a més obtenir més informació dels processos d'afectació del comportament dels animals.

Respecte l'estat oxidatiu dels diferents teixits avaluats, les variacions observades en els nivells d'enzims antioxidants poden ser degudes a una acció directa de l'urani sobre la seva activitat o bé per una acció del metall sobre els gens que els codifiquen, provocant una activació o inhibició d'aquests. Mitjançant tècniques d'expressió gènica es podrien conèixer els mecanismes bàsics d'acció de l'urani.

Els resultats d'aquest treball poden ser la base de estudis posteriors que contribueixin a aportar més informació sobre els mecanismes d'acció de l'urani, així com els efectes provocats per la interacció de l'estrès.

I. ANTECEDENTS

L'urani empobrit (DU) s'ha utilitzat durant dècades en l'àmbit de la medicina i també ha tingut aplicacions industrials, però no ha estat fins a l'ús militar, en els conflictes del Golf i dels Balcans, que la població s'ha preocupat sobre les possibles conseqüències d'aquesta exposició.

La preocupació originada pels problemes de salut que podrien patir les poblacions que es troben en les zones de conflicte en què s'ha emprat munició amb DU ha plantejat en l'àmbit de la salut ambiental molts interrogants importants.

D'altra banda, l'estrès és una resposta altament individualitzada a un repte extern o intern. És evident que la humanitat pot estar exposada a diferents tipus d'estrès, i una situació on es fa especialment evident l'estrès és un conflicte bèl·lic.

II. HIPÒTESI

Com que tant els canvis neurocomportamentals i fisiològics com les alteracions bioquímiques es donen com a resposta a l'estrès, l'exposició concurrent a U i estrès es podria manifestar com una interacció, per que n'augmenti o en modifiqui els efectes.

III. OBJECTIUS

3.1 Objectiu general

Aquest treball té com a objectiu general avaluar els efectes de l'exposició a l'U sobre la reproducció i la conducta, així com la influència que l'estrès pot exercir en aquesta exposició.

3.2 Objectius específics

1. Avaluar els efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a U en rates mascle adultes.
2. Avaluar els efectes sobre la reproducció en rates mascle tractades amb U.
3. Estudiar l'efecte de l'U sobre diferents òrgans diana: testicle, ronyó i cervell. Avaluar la peroxidació lipídica i la resposta dels sistemes antioxidants intracel·lulars, enzimàtics i no enzimàtics.
4. Valorar la toxicitat embriofetal per exposició a U abans de la fecundació.
5. Valorar els efectes postnatsals de desenvolupament i neuroconductuals de l'U en cries de rates mascle exposades.
6. Avaluar per cadascun dels objectius anteriors la influència combinada de l'exposició a l'U i l'estrès.

INTRODUCCIÓ	7
I. Conceptes Generals	7
1.1 Toxicologia. Conceptes bàsics	7
1.2 Toxicologia de la reproducció i el desenvolupament. Conceptes bàsics	10
1.3 Neurotoxicologia	14
1.4 Toxicitat dels metalls	16
II. Urani	19
2.1 Generalitats	19
2.2 Urani empobrit (DU)	20
2.3. Fonts d'urani a l'ambient	23
2.3.1 Aire	23
2.3.2 Aigua	24
2.3.3 Terra	26
2.3.4 Menjar	26
2.3.5 Altres fonts d'urani en la dieta humana	30
2.3.6 Exposició laboral	32
2.4 Metabolisme de l'urani	32
2.5 Aplicacions de l'urani a la indústria	37
2.6 Toxicitat química de l'urani	38
2.6.1 Toxicitat de l'urani en animals d'experimentació	39
2.6.2 Toxicitat de l'urani en humans	45
2.6.3 Estudis <i>in vitro</i>	48
III. Estrès	49
3.1 Generalitats	49
3.2 L'estrès com a resposta fisiològica	50
3.2.1 Diferències individuals en la resposta a l'estrès	55
3.3 Models d'estrès en animals d'experimentació	56
3.3.1 Estrès per soroll	57
3.3.2 Administració d'hidrocortisona	58
3.3.3 Estrès per immobilització	58
3.4 Efectes de l'estrès en el desenvolupament	59
3.5 Efectes de l'estrès en l'adult	64
3.6 Estrès i tòxics	66

HIPÒTESI I OBJECTIUS	69
I. Antecedents	71
II. Hipòtesi	71
III: Objectius	72
3.1 Objectiu general	72
3.2 Objectius específics	72
MATERIALS I MÈTODES	73
I. Materials	75
1.1 Animals d'experimentació	75
1.2 Reactius	75
1.3 Material específic	78
II. Metodologia	82
2.1 Aparellament i identificació dels animals	82
2.2 Preparació i administració de l'urani	83
2.3 Estudis amb els mascles adults	84
2.3.1 Tests d'aprenentatge	84
2.3.2 Efectes sobre la reproducció	88
2.3.3 Avaluació de la peroxidació lipídica i sistemes antioxidants	90
2.3.4 Valoració anatomopatològica	97
2.3.5 Anàlisi de la concentració d'urani en els testicles, ronyó i cervell	98
2.4 Estudis amb les cries	99
2.4.1 Toxicitat embriofetal	99
2.4.2 Valoració del desenvolupament	100
2.4.3 Tests d'aprenentatge	102
2.5 Tractament estadístic de les dades	103

RESULTATS	105
1. Efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a urani i estrès en rates mascle adultes	107
2. Efectes sobre la reproducció en rates mascle adultes tractades amb urani i estrès	117
3. Efectes de l'urani i l'estrès sobre diferents òrgans diana. Avaluació de la peroxidació lipídica i de la resposta antioxidant en aquests òrgans	120
4. Efectes tòxics embriofets per l'exposició prenatal a urani i estrès, en rates mascle	174
5. Efectes postnatsals del desenvolupament i neuroconductuals en cries de rates mascle exposades a urani i estrès	176
DISCUSSIÓ	187
1. Efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a urani i estrès en rates mascle adultes	189
2. Efectes sobre la reproducció en rates mascle adultes tractades amb urani i estrès	191
3. Efectes de l'urani i l'estrès sobre diferents òrgans diana. Avaluació de la peroxidació lipídica i de la resposta antioxidant en aquests òrgans	193
4. Efectes tòxics embriofets per l'exposició prenatal a urani i estrès, en rates mascle	197
5. Efectes postnatsals del desenvolupament i neuroconductuals en cries de rates mascle exposades a urani i estrès	198
4. Discussió global	200
CONCLUSIONS	203
BIBLIOGRAFIA	207
ANNEXOS	241

I. CONCEPTES GENERALS

1.1 Toxicologia. Conceptes bàsics

La toxicologia és la ciència que estudia les substàncies químiques i els agents físics, mentre siguin capaços de produir alteracions patològiques als éssers vius. Alhora, també estudia els mecanismes de producció d'aquestes alteracions i els mitjans per contrarestar-les, així com els procediments per detectar, identificar i determinar aquests agents i valorar el grau de toxicitat (Repetto, 1997).

Una substància es considera agent tòxic quan és capaç de produir a un organisme un efecte nociu o perjudicial. Aquest efecte nociu generat per qualsevol agent químic, que administrat a dosis prou elevades pot provocar accions tòxiques als éssers vius, és el que es defineix com a *toxicitat*. Pot manifestar-se en poques hores o tardar diversos mesos a aparèixer. Així, seguint un criteri cronològic, podem classificar la toxicitat en:

- Toxicitat aguda*: els efectes adversos apareixen en un període menor a 24 hores després de l'exposició a l'agent tòxic.
- Toxicitat subaguda*: els efectes nocius apareixen a partir de les 24 hores i fins a 14 dies després de l'exposició.
- Toxicitat subcrònica*: els efectes adversos es manifesten a partir dels 15 dies i fins a 3 mesos.

-*Toxicitat crònica*: la manifestació dels efectes nocius apareix a partir dels 3 mesos (Ladron de Guevara i Moya Pueyo, 1995).

La toxicitat també es pot classificar en funció de l'efecte nociu que provoca a l'organisme. Així doncs, es parla de toxicitat tisular inespecífica, toxicitat tissular específica, carcinogènesi i teratogènesi (Ladron de Guevara i Moya Pueyo, 1995).

Per altra banda, els efectes tòxics d'una substància química poden ser reversibles i irreversibles, ja que depenen en gran manera de la capacitat dels teixits on actua per a regenerar-se. Els efectes induïts per un tòxic en el teixit hepàtic són, en gran manera, reversibles, perquè aquest teixit té una gran habilitat de regeneració. No obstant això, els efectes tòxics produïts al sistema nerviós central (SNC) solen ser irreversibles, perquè les cèl·lules diferenciades de l'SNC no poden dividir-se ni ser regenerades. Normalment els efectes carcinogènics i teratogènics d'agents químics es consideren efectes tòxics irreversibles (Goyer, 1996).

Altres conceptes importants en toxicologia són:

- DL_{50} o dosi letal 50: és la dosi calculada estadísticament d'un agent químic o físic (radiació) que s'espera que produeixi mortalitat al 50% dels organismes d'una població sota un conjunt de condicions definides.

- NOEL o nivell sense efecte observable: és la concentració més elevada o quantitat d'una substància que no causa alteracions en la morfologia, capacitat funcional, creixement, desenvolupament o duració de la vida dels organismes sota condicions definides d'exposició.
- NOAEL o nivell sense efecte advers observable: es poden detectar alteracions en la morfologia, capacitat funcional, creixement, desenvolupament o duració de la vida de l'organisme, les quals són considerades no adverses.
- LOEL o nivell mínim al que s'observen efectes.
- LOAEL o nivell mínim al qual s'observen efectes adversos (Faustmann i Omenn, 1996)
- Xenobiòtic: en sentit estricte, és qualsevol substància que interactua amb un organisme i que no és un dels seus components naturals (substància exògena, substància estranya) (Repetto, 1997).
- TI o ingesta tolerable: la ingesta d'una substància, que pot donar-se al llarg de la vida, sense risc apreciable per a la salut (s'expressa com a mg/kg de pes corporal per dia).

La toxicologia experimental, bé sigui en models *in vitro* o *in vivo*, tracta de descriure els efectes dels tòxics, estudia els mecanismes d'acció i possibles tractaments sota condicions que permetin controlar un gran nombre de variables. En els estudis amb animals s'han de seguir una sèrie de normes. En primer lloc, l'estudi s'ha de realitzar en espècies que tinguin un metabolisme similar a l'home, amb la finalitat de poder extrapolar els resultats obtinguts. En segon, la via d'administració del tòxic ha de ser la mateixa en els animals d'experimentació que en els homes.

1.2 Toxicologia de la reproducció i el desenvolupament.

Conceptes bàsics

Els efectes adversos que les substàncies químiques produeixen sobre la reproducció i el desenvolupament en mamífers varia en funció de l'etapa en la qual es produeix l'exposició a la substància.

Generalment, els efectes produïts en els sistemes reproductors dels adults es refereixen a canvis en la fertilitat i alteracions en l'espermatogènesi o ovogènesi. L'exposició perinatal s'associa amb dèficits en el desenvolupament i dèficits en les funcions orgàniques, mentre que els efectes produïts prenatalment s'associen amb defectes en el naixement i canvis en el desenvolupament i maduració del sistema nerviós central (SNC) (Zelikoff i col·ls., 1995).

Els efectes més greus de l'exposició prenatal a agents tòxics s'associen amb la mort abans del naixement (embrioletalitat) i d'altres de valorats en el moment del naixement: les malformacions i el retard en el creixement (Neubert i col·ls, 1980). Un dels períodes crítics de susceptibilitat als tòxics és l'organogènesi, etapa en què la majoria dels sistemes orgànics s'estan formant. El període d'organogènesi varia d'unes espècies a altres. Així per exemple l'organogènesi en el ratolí es considera des del dia 6 al 15 de gestació. En humans seria del dia 20 al 55 de gestació (Slikker, 1994).

Per estudiar de manera experimental els efectes dels agents tòxics, els animals més utilitzats són rates i ratolins, a causa del període de gestació curt i l'ampli nombre d'individus per ventrada, així com el baix cost i la fàcil manipulació. Actualment, per poder classificar i interpretar millor els resultats, la majoria dels protocols divideixen els treballs en tres fases per estudiar els tòxics en la reproducció i el desenvolupament (Bosque i col·ls., 1993). Segons els objectius plantejats, serà necessari elaborar un estudi de fase I, II o III.

Fase I: Es tracta de determinar els efectes que la substància química exerceix sobre la fertilitat, etapes inicial i final de la gestació, part i lactància. El tòxic s'administra a mascles i femelles adults abans de la concepció.

Fase II: S'avaluen la toxicitat materna i els potencials embriotòxic i teratogènic de la substància química. Els experiments de la fase II són molt rellevants ja que s'examinen els efectes maternotòxics i els potencials embriotòxics i teratogènics de l'agent tòxic quan s'administra durant el període d'organogènesi (Manson i Kang, 1989).

En la fase II, la dosi pot administrar-se durant tota la gestació, que s'assemblaria més a l'exposició humana, o durant certs moments o períodes de la gestació que es consideren més sensibles a l'efecte del tòxic que es vol estudiar. D'aquesta manera, podem perfilar millor els efectes de l'exposició tòxica en moments concrets del desenvolupament.

S'acostumen a valorar les variables següents:

- La toxicitat materna es refereix al conjunt d'efectes nocius sobre la mare gestant, el comportament, l'increment de pes, la ingesta, el pes dels òrgans, la funcionalitat orgànica, i la incidència de lesions macroscòpiques o microscòpiques en animals gestants exposats a una determinada substància química (Khera, 1987; Domingo i col·ls., 1988).
- L'embriotoxicitat i la fetotoxicitat es refereixen a qualsevol efecte tòxic sobre el producte de la concepció com a resultat de l'exposició prenatal.

La característica distintiva entre aquests dos termes és la fase del desenvolupament durant el qual es produeix aquest efecte, si és en la fase d'embrió embriotoxicitat o en la fase de fetus fetotoxicitat. Els termes inclouen malformacions i variacions, alteracions en el creixement i mort en l'úter.

En humans, l'estadi d'embrió dura fins aproximadament 8 setmanes després de la concepció i és seguida de l'estadi fetal (U.S. EPA, 1986, 1991). En ratolins, l'estadi d'embrió es dona entre els 4 dies i mig fins als 15 dies després de la concepció aproximadament, al qual segueix l'estadi de fetus (Rugh, 1990).

En rates, fins a finals de la segona setmana de gestació es dona l'estadi d'embrió, al qual segueix l'estadi de fetus (Rowett, 1960). Així, en rosegadors, comença l'estadi fetal a partir del dia 15 de gestació fins al moment del part.

La fetotoxicitat acostuma a donar-se quasi sempre junt amb la toxicitat materna, i molt sovint se'n considera conseqüència directa (Khera, 1984).

- Podem parlar de teratogènia quan una substància provoca l'aparició d'anomalies permanents, estructurals o funcionals (Manson i Kang, 1989).

Fase III: s'avaluen els efectes de la substància sobre l'etapa final de la gestació, el part, la lactància, la viabilitat neonatal i el desenvolupament de les cries. En aquesta fase el tòxic s'administra des del període final de la gestació fins al deslletament (Domingo i col·ls., 1988).

1.3 Neurotoxicologia

La neurotoxicologia és la ciència que estudia els efectes adversos estructurals i funcionals en el sistema nerviós (SN) provocats per l'exposició a agents químics. La neurotoxicologia pot ser permanent o reversible i es pot expressar en canvis estructurals o alteracions funcionals (neuroquímiques, electrofisiològiques, conductuals) (Dorman, 2000).

L'SN està format pel cervell, el cerebel, el tronc del cervell, la medul·la espinal (SNC) i els nervis perifèrics (SNP) que proporcionen innervació motora i sensitiva. Està clarament involucrat en el manteniment de la conducta sota condicions normals i sota l'exposició a agents químics (MacPhail, 1994).

En neurotoxicologia, tant els símptomes i signes com les alteracions motores, modificacions sensorials o l'estat mental alterat sorgeixen dels trastorns de les funcions de cèl·lules especialitzades de l'SNC i de l'SNP.

Desviacions dels nivells de rendiment esperat en tasques específiques i tests de funcionament neurològic són considerades com a anormalitats (Feldman i col·ls., 1999).

L'SN ofereix una diana única amb especials vulnerabilitats a agents tòxics. L'organització intricada que té aporta innumbrables oportunitats per al trastorn i la conducta reflectiria una sortida integrada de l'SN (Weiss i O'Donoghue, 1994).

La toxicologia del comportament és un camp emergent que està esdevenint molt important a l'hora d'avaluar el risc d'exposició a substàncies neurotòxiques, a causa de l'alta sensibilitat de la conducta cap a l'acció neurotòxica i la integració en funcions conductuals de diferents processos subjacents i neurofuncions, com la motora, la sensorial, l'atencional i la motivacional (Lucchini i col·ls., 2000).

Les anàlisis de la conducta han aportat, i continuaran fent-ho, importants contribucions al coneixement dels efectes tòxics dels agents químics en general i dels efectes neurotòxics en particular (MacPhail, 1994).

Els canvis conductuals poden influir en el desenvolupament de les cries, en l'increment de l'activitat motora, en la disminució de la força a les extremitats, en l'increment de les conductes d'escapament i en dèficits de l'aprenentatge cognitiu (Dobbing i Sands, 1971; Moorcraft, 1981; Gerber i O'Shaughnessy, 1986).

Existeixen molts exemples en la bibliografia en què alguns agents tòxics provoquen neurotoxicitat a les cries i no necessàriament a la mare. En d'altres casos, també s'ha trobat en animals d'experimentació que els adults són més susceptibles que no pas els animals en desenvolupament (Paule i col·ls., 1986; St. Omer i col·ls., 1991).

També s'ha proposat que de les exposicions perinatals a alguns agents en podria resultar una toxicitat silenciosa (o latent), la qual es manifestaria amb l'edat o els canvis ambientals (Weiss, 1990). Per tant, hi ha una evidència creixent que l'exposició durant el desenvolupament a molts agents químics pot produir alteracions a llarg termini en la conducta i en l'SNC (MacPhail, 1994).

1.4 Toxicitat dels metalls

Els metalls són probablement un dels grups de tòxics més antics coneguts per la humanitat. Difereixen d'altres substàncies químiques en el fet que no són creats ni destruïts per l'home; no obstant això, l'ús que en fa influeix en els potencials efectes que poden produir sobre la salut. En primer lloc, per la presència al medi ambient deguda a la contribució humana o antropogènica a l'aire, sòl, aigua i aliments. En segon lloc, per alteracions d'espècies o formes bioquímiques de l'element (Beijer i Jernelöv, 1986).

Els metalls es redistribueixen de forma natural en el medi ambient mitjançant els cicles biològics i geològics. Des del punt de vista geològic, l'aigua de pluja dissol roques i minerals, transporta el material dissolt cap a torrents i rius, i afegeix o treu en el seu trajecte part d'aquest material al sòl adjacent. Per altra banda, als oceans poden precipitar com a sediments, o bé passar a l'aigua de pluja per ser transportats cap una altra banda.

Els cicles biològics inclouen la bioconcentració de metalls en plantes i animals, els quals s'incorporen a cicles alimentaris. De la seva banda, els metalls presents en l'aigua i el sòl poden entrar alhora a la cadena alimentària (Goyer, 1996).

L'activitat de l'home pot reduir considerablement el temps de permanència dels metalls en forma mineral, formar nous compostos i augmentar-ne la distribució. Per això, la contaminació mediambiental per metalls reflecteix totes dues fonts naturals, així com la contribució procedent de l'activitat industrial.

Per a la població general, la dieta constitueix la principal font d'exposició a metalls amb una contribució addicional procedent de l'aire. A més a més, s'han de tenir en compte fonts potencials d'exposició procedents de productes i residus industrials, i una exposició potencial ocupacional.

L'estudi toxicològic d'un metall requereix una informació quantitativa respecte a les dosis o concentracions rebudes i els corresponents continguts del metall en òrgans i teixits. Les relacions dosis-efecte estan en funció del temps d'exposició i de la concentració del metall. Una exposició a metalls pot ser recent i prolongada segons el temps de retenció del metall al teixit. Un paràmetre important del metabolisme i del comportament del metall tòxic en l'organisme és el temps de semivida ($t_{1/2}$), és a dir, el temps que tarda l'organisme a excretar la meitat del tòxic acumulat.

Hi ha molts factors exògens que poden influir en la toxicitat produïda per metalls, entre els quals s'han de destacar l'edat i el grau de desenvolupament, ja que nens i gent gran semblen ser més susceptibles davant una exposició a metalls tòxics que la majoria d'adults (NRC, 1993). D'altres factors exògens són els relacionats amb l'estil de vida i inclouen l'hàbit de fumar o la ingesta d'alcohol. El consum de cigarretes, a més de provocar efectes pulmonars adversos, és una font d'exposició perquè en la composició hi ha alguns metalls tòxics. Per altra banda, la ingesta d'alcohol pot fer alterar la dieta i disminuir l'absorció d'elements essencials.

II. URANI

2.1 Generalitats

L'urani (U) és un element platejat blanc, dens, natural i normalment radioactiu dèbil. Es troba en tot el medi natural de forma variada, però en petites quantitats en roques, terra, aigua, aire, plantes, animals i en tots els éssers humans.

Taula 1. Concentracions d'urani en diferents materials i ambients (Kaye i Laby, 1993)

Material	Concentració (mg/kg)
Roques	1,8
Mar	0,0033
Aigua Corrent	0,00004
Homes	0,001

L'urani elemental té un nombre atòmic de 92, un pes atòmic de 238,0289 g/mol i forma part de la sèrie actínids de la taula periòdica. L'urani metàl·lic té una gran densitat, 19 g/cm³. El metall brilla a l'aire i és dúctil, mal·leable.

L'urani natural conté tres isòtops radioactius (o radioisòtops): ²³⁴U, ²³⁵U i ²³⁸U. El percentatge de cada radioisòtop en pes és 0,0054% ²³⁴U, 0,72% ²³⁵U i 99,27% ²³⁸U.

La vida mitjana (temps perquè la radioactivitat disminueixi a la meitat del seu valor) d'aquests isòtops és molt llarga, 244.000 anys per ^{234}U , 710 milions d'anys per ^{235}U i 4.500 milions d'anys per ^{238}U . L'urani decau en altres radioisòtops, anomenats progènie, fins que acaba com a isòtop estable (no radioactiu) de plom.

Quan es fragmenta en l'aire, l'urani metall és combustible i inflamable, una propietat anomenada piroforicitat, comuna a d'altres metalls com l'alumini (Al) i el ferro (Fe).

Tots els isòtops de l'urani tenen les mateixes reaccions a la natura i presenten gairebé les mateixes característiques físiques, com el punt d'ebullició, la volatilitat i el punt de fusió. En canvi les propietats radioactives dels isòtops són diferents.

En estat pur, l'urani natural, l'urani empobrit i l'urani enriquit només difereixen en la composició d'isòtops i per aquesta raó són pràcticament idèntics químicament, ja que tenen les mateixes reaccions al medi i produeixen els mateixos efectes químics, bioquímics i biològics a l'home.

2.2 Urani empobrit (DU)

El DU com a subproducte de l'enriquiment de l'urani requerit per la indústria nuclear s'obté des de 1940. L'urani es classifica com a DU quan les quantitats de ^{235}U i ^{234}U es redueixen cap a ^{238}U . El DU conté aproximadament de 0,3% a 0,2% ^{235}U , i 99,8% ^{238}U .

L'urani empobrit té una activitat específica de 14,8 Bq/mg que és aproximadament el 60% de la de l'urani natural (25,4 Bq/mg) a causa de l'extracció parcial del ^{234}U .

Tant l'U com el DU i els seus productes (^{234}Th , $^{234\text{m}}\text{Pa}$ i ^{231}Th) es desintegren i emeten partícules α i β que no són gaire penetrants i s'absorbeixen fàcilment per mitjà de l'aire i la pell.

L'U i DU es consideren poc radioactius. Durant el procés que el DU es forma per l'enriquiment, els radioisòtops addicionals en el DU augmenten la dosi radioactiva del DU menys d'un 1%. Aquesta radiació afegida no produeix efectes radiològics addicionals.

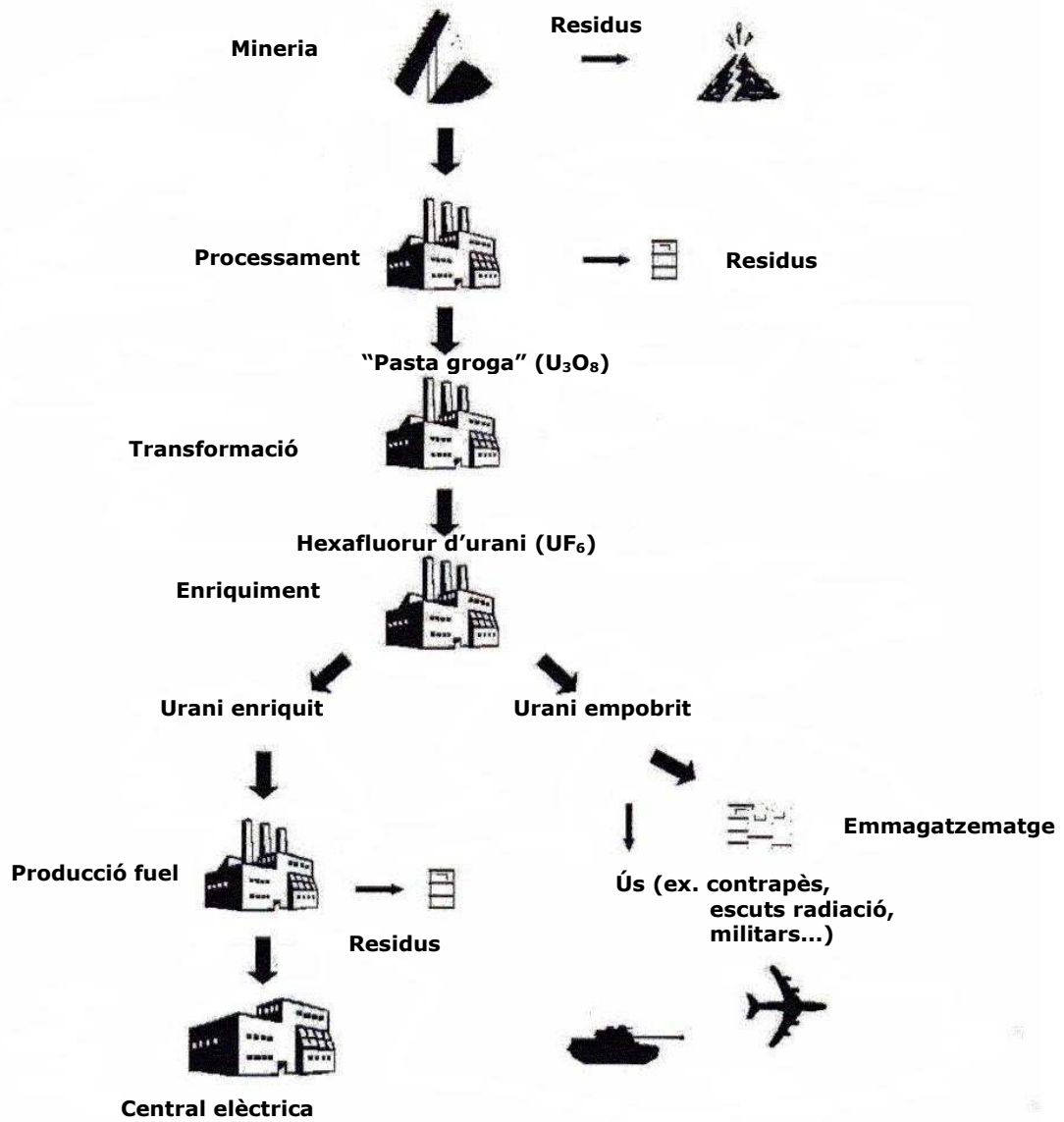


Figura 1. Esquema de la producció, enriquiment i ús de l'urani.

2.3 Fonts d'urani a l'ambient

L'urani es troba a les roques, l'aigua i el cos humà. Es tracta d'un element natural amb una abundància a la terra aproximada de 2 mg/kg (rang de 0,1 a 20 mg/kg). És més abundant que la plata i l'or.

Principalment l'exposició a l'urani es produeix per inhalació, ingestió o irradiació externa, mentre que de forma secundària, mitjançant absorció dèrmica o més concretament formes mòbils de l'urani.

La naturalesa pirotècnica de l'urani té una rellevància especial sobre l'exposició humana a causa de la producció de pols que contenen òxids d'urani. Els òxids més importants són el diòxid d'urani (UO₂), el triòxid d'urani (UO₃) i l'octaòxid de triurani (U₃O₈) (Harley i col·ls., 1999; CHPPM, 2000).

La biosolubilitat i la disponibilitat dels òxids U₃O₈ i UO₂ són relativament baixes, comparades amb d'altres formes d'urani a les quals estan exposats els treballadors de la indústria nuclear (ex. UO₃).

2.3.1 Aire

Segons l'Organització Mundial de la Salut (WHO 1998) els valors d'U en l'aire van de 0,02 ng/m³ a 0,076 ng/m³. Durant aquests estudis s'ha vist que el quocient ²³⁴U/²³⁸U varia molt en les mostres de pols.

A més d'altres carcinògens, el fum del tabac conté quantitats significatives d'urani i ^{210}Po . Així doncs, fumar dos paquets de tabac produeix a la zona 50 ng d'U que poden ser inhalats (WHO, 1998).

S'ha estudiat la solubilitat pulmonar de les partícules ($<10\mu\text{m}$ de diàmetre) produïdes immediatament després dels impactes de les municions (Jette 1990). Algunes d'aquestes partícules poden ser extretes pel transport mucociliar al tracte gastrointestinal (GI) i arribar a l'intestí on s'han de tenir en compte factors d'absorció.

El nivell d'exposició humana a la pols i aerosols derivats del possible impacte de DU oxidat incontrolat està en funció de la proximitat de l'home a la font de contaminació, el grau en què l'urani s'ha dispersat físicament i químicament al medi local, la mida de les partícules i la densitat de la pols produïda.

L'agència de protecció mediambiental americana (US EPA) estima que una exposició típica d'urani en l'aire resulta en una inhalació total d'aproximadament 2-20 ng ^{238}U /dia (US EPA, 2000).

2.3.2 Aigua

L'U sempre es troba en les aigües superficials i en les freàtiques. Hi ha un gran rang de concentracions des de 0,01 $\mu\text{g/l}$ a 1.500 $\mu\text{g/l}$ d'aigua.

En l'aigua de pluja les concentracions d'urani són baixes i variables (rang de 0,018 a 0,17 µg/l als EUA durant març-maig 1993; ATSDR, 1999). Diverses activitats antropogèniques implicades en el procés o ús de materials rics en urani poden modificar-ne l'abundància natural en aigua. Aquestes activitats mineres (urani, plata, altres minerals) i els processos industrials de l'urani per aconseguir la manipulació de fuel nuclear i d'altres productes inclouen el DU en diferents usos.

Els acetats, sulfats, carbonats, clorats i nitrats d'urani es dissolen ràpidament en aigua i generalment predomina la forma carbonatada. Aquests complexos poden estar carregats negativament o ser neutres i com a tals són molt movedissos als sòls i a les aigües infiltrades en regions àrides i semiàrides, com les zones mediterrànies. Sota condicions lleument àcides, típiques de climes humits, la propietat química de l'urani dominant serà la formació de complexos estables amb el terra orgànic. Això implica l'acumulació i retenció de l'U en dipòsits de turba (Benes i col·ls., 1998; Ebbs i col·ls., 1998).

Herranz i col·ls. (1997, 1999) van determinar el contingut mitjà d'urani en l'aigua de beguda de quatre plantes de tractament de la zona nord d'Espanya, i el valor obtingut va ser de 0,11 µg/l. Els mateixos autors van observar una davallada del 60% en el contingut d'urani de les aigües residuals vessades durant el procés de tractament, cosa que indicava un augment del contingut d'urani en els fangs d'aquestes aigües.

2.3.3 Terra

Els nivells d'urani al sòl, normalment no associats amb les fonts antropogèniques de contaminació conegudes, són d'1 a 2 mg/kg. Tot i això, poden haver-hi variacions que reflecteixin no només fonts geològiques, sinó també zones de dispersió amb el transport de sediments fluvials. Les concentracions tan elevades com 4 mg/kg es troben en zones llunyanes de qualsevol activitat antropogènica.

En llocs industrialitzats, l'urani es pot trobar associat a plantes processadores (ex. British Geological Survey, 1992) i residus del sector miner (Ledvina i col·ls., 1996; McConnell i col·ls., 1998), i també en zones d'agricultura on s'han fet servir fertilitzants fosfats rics en urani.

A diferència d'altres metalls, tals com el plom, la mobilitat de l'urani és deguda a la formació de complexos negatius estables (oxianions) amb oxigen i carbó.

2.3.4 Menjar

L'urani com a component del medi natural és present en quantitats ínfimes en tots els aliments. S'incorpora a la fibra dels aliments o s'adhereix a la superfície com a partícula de la contaminació. Les arrels vegetals són les que en contenen els nivells més elevats.

L'ATSDR (1999) cita una revisió de la ingesta oral d'urani als EUA amb un rang de 0,9 a 4,5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ al menjar i el mateix rang a l'aigua de beguda, per una ingesta total de 1,8 a 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Harley (1988) cita una revisió de diferents fonts naturals de contaminació radioactiva duta a terme a diferents països europeus i estima la ingesta d'urani en un rang d'entre 0,5 i 2 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Aquestes dades comparades amb la xifra de 0,5 a 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ al Japó i de 0,5 a 0,9 $\mu\text{g}/\text{dia}$ al Regne Unit suggereixen als autors una ingesta mitjana al món de 4 $\mu\text{g}/\text{dia}$ tot i que afirmen que no és clar si l'aigua de beguda s'ha inclòs o no en les afirmacions revisades.

Segons els estudis realitzats (taula 2) les concentracions d'U més elevades s'han trobat al marisc, als mol·luscos i a les margarides llises (9,5 a 31 $\mu\text{g}/\text{dia}$), suposadament a causa de les elevades concentracions d'urani a la mar. En d'altres aliments com el pa i les verdures fresques, les concentracions eren dues magnituds inferiors ($\approx 2 \mu\text{g}/\text{kg}$) mentre que en l'arròs i la carn era de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Els aliments amb un contingut elevat de fibra, afecten la incorporació d'urani a l'intestí humà, de la mateixa manera que ho farà amb altres minerals (Gibson, 1994). L'eficàcia en la neteja dels vegetals frescos pot variar significativament aquests valors.

La concentració mitjana en nou begudes diferents, incloent-hi te i cafè, és de 0,98 µg/l (rang de 0,26 a 1,65 µg/l) i en sèries d'aigua minerals, de 9,20 µg/l (Cheng i col·ls., 1993). Misund i col·ls. (1999) van fer un seguiment de 56 aigües minerals embotellades triades a l'atzar i van observar que el contingut d'urani oscil·lava de 0,0104 a 9,45 µg/l.

Com molts altres metalls, la disponibilitat als aliments, aigua i terres, afecta l'absorció del cos a través del tracte gastrointestinal. Per exemple, dietes riques en fibra en disminueixen l'absorció (Gibson, 1994; Golden i Golden, 1981) mentre que dietes amb la presència de lligands de baix pes molecular, tals com el citrat, en promouen l'absorció. Spencer i col·ls. (1990) van investigar els patrons d'ingesta i excreció d'urani i calci en l'home. Aquests estudis van confirmar el comportament similar dels diferents isòtops al cos i també l'eliminació d'una part significativa de tota la ingesta per via fecal (l'excreció per via urinària és aproximadament del 2% de tota l'excreció) (Leggett i Harrison, 1995).

L'ATSDR (1999) considera que la font principal d'exposició a l'urani és la ingesta. En una dieta estàndard la ingesta s'estima entre 0,9 i 4,5 µg/dia amb una mitjana d'1,5µg/dia (Linsalata, 1994).

Aliments	Concentració d'urani (ng/kg)
Verdura fresca	1900 ¹
	590-920 ²
Verdura en conserva	340 ¹
	90-180 ²
Arrels de vegetals	620 ¹
	940-1200 ²
Patates	72 ¹
	2660-2920 ²
	15000-18000 ³
Fesols	2200 ¹
	1500-3670 ²
Fruita fresca	160 ²
	710-1290 ²
Fruita enllaunada	81 ¹
	180-290 ²
Sucs de fruites	49 ¹
	40-120 ²
Productes de forns de pa	1900 ¹
	1320-1500 ²
	12000 ³
Farina	390 ¹
	250-680 ²
Productes integrals	1400 ¹
	1450 ²
Macarrons	300 ¹
	400-630 ²
Arròs	240 ¹
	1430-6000 ²
	15000 ³
Carn	190 ¹
	580-1320 ²
	20000 ³
Aus	64 ¹
	140-420 ²
Ous	150 ¹
	230 ²
	9600 ³
Peix fresc	110 ¹
	430-850 ²
	11000 ³
Marisc	16000 ¹
	9500-31000 ²
Productes làctics	59 ¹
	80-310 ²
Te	5000 ³
Cafè	6000 ³
Aigua	49

Taula 2. Concentració mitjana d'urani en productes alimentaris (¹Fisenne i col·ls., 1987; ²NCRP, 1984; ³US EPA, 1985).

El comitè científic de les Nacions Unides sobre els efectes de la radiació atòmica (UNSCEAR, 2000) ha calculat que tota la ingesta anual de l'home és de 460 µg en menjar i aigua, i de 0,59 µg per inhalació.

La bioacumulació del DU en la cadena alimentària està subjecta a un període de retard (*lag*) la magnitud del qual depèn de la climatologia, la disponibilitat de l'urani metàl·lic i les barreges dels òxids d'urani.

2.3.5 Altres fonts d'urani en la dieta humana

Les altres fonts d'urani en la dieta humana inclouen pols i terra, tots dos ingerits de forma inadvertida, ja que provenen dels estris que s'utilitzen per servir els aliments i la cocció.

- Material i procés de cocció

Landa i Councell (1992) van dur a terme diferents estudis en què van calcular la pèrdua d'urani de 33 productes de vidre i dos de ceràmics en els quals l'urani s'havia emprat com a colorant. Els productes de vidre van desprendre un màxim de 30 µg/L i en els productes ceràmics mantinguts en contacte amb una solució d'àcid acètic al 4% durant 24 hores, la concentració d'urani era de 3,1 mg/L.

- Urani a la pols i al sòl

Hi ha tres categories diferents d'ingestió de terra i pols:

a) Ingestions inadvertides de petites quantitats de terra i pols. L'elevada densitat de l'urani i la seva reactivitat química poden provocar una concentració amb diferents rangs de mida i densitat. Això pot comportar concentracions d'urani elevades.

b) Consum deliberat ocasional. Molts nens ho fan a causa del seu comportament explorador i durant un període curt de temps.

c) Geofàgia. Es refereix al consum persistent i intencionat de terra i/o pols, molt sovint en grans quantitats. Històricament s'ha reconegut un fenomen mundial, tot i que la prevalença s'ha associat a determinades comunitats (urbanes i rurals) i persones malnodrides (Geissler i col·ls., 1997)

El percentatge d'urani absorbit depèn de diferents factors com la forma físicoquímica del metall, la forma d'ingerir el terra, el pH de l'estómac, el consum d'aliments, el temps de permanència intestinal.

2.3.6 Exposició laboral

Les condicions de treball dels llocs on els homes s'exposen a l'urani són molt variables i depenen de la cultura de la salut i la seguretat. Els riscos potencials també depenen del tipus d'urani, de la química de l'urani i dels materials que es manipulen al lloc de treball. S'han identificat cinc grups principals de treballadors:

1. Els relacionats amb el sector miner.
2. Els relacionats amb la fabricació i processament del fuel nuclear.
3. Els relacionats amb la manipulació d'urani metàl·lic, components associats i aliatges durant la manufacturació i assemblatge de components industrials.
4. Els relacionats amb la indústria en la qual l'urani està present com a contaminant o producte.
5. Els implicats en serveis d'emergència d'accidents i moments posteriors o incidents implicats amb DU (incendis de fàbriques, accidents aeris).

2.4 Metabolisme de l'urani

Tot i la ubiqüitat de l'urani al medi, no s'ha trobat que tingui cap funció metabòlica en l'home ni en els animals, i gaire bé sempre s'ha considerat com un element no essencial.

- Biodistribució i tòxicocinètica

La seva gran afinitat per molts components fisiològics suggereix que normalment no es troba com a ions lliures. Per exemple, en molts fluids corporals i la sang, qui controla la mobilitat de l'urani en la circulació sistèmica són el carbonat, bicarbonats i complexos citrats de l'urani (VI) (Cooper i col·ls., 1982). Aproximadament la meitat de l'urani que circula a la sang es troba com a complex carbonatat (UO_2CO_3 i $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$) (Durbin, 1984) o associat amb complexos citrats. Tot i així, a pH lleugerament inferiors, en el rang de 5 a 6, l'urani s'adapta a molts lligands orgànics i se suposa que actuen en l'assimilació de l'urani als teixits corporals de la circulació sistèmica. En l'orina, l'urani predomina com a complex bicarbonat (Cooper i col·ls., 1982).

- Ingestió

L'absorció de l'urani del tracte gastrointestinal depèn de la biosolubilitat del component, el consum d'aliments previs i l'exposició continuada a agents oxidants. Wrenn i col·ls., (1985) han valorat la mitjana d'absorció humana a escala gastrointestinal entre l'1% i el 2%. Tenint en compte que els valors recomanats són del 2% (Leggett i Harrison, 1995; ICRP-72, 1996; WHO, 1998), aquests valors són acceptats.

Estudis realitzats en animals sobre els factors que influencien l'absorció gastrointestinal han mostrat que depèn de la quantitat d'urani administrada, l'edat i l'estrès dietètic com una deficiència de ferro.

- Inhalació

Estudis realitzats *postmortem* a treballadors exposats de forma ocupacional mostren grans quantitats d'urani als teixits pulmonars (Kathren i col·ls., 1989). Això implica que la inhalació és una via important d'acumulació. Acumular partícules al tracte respiratori depèn de diversos factors, com la mida i la forma de les partícules, la taxa respiratòria etc. Aquests factors s'han descrit en detall a *ICRP Human Respiratory Tract Model* (HRTM) (ICRP-66, 1994). L'absorció d'urani inhalat a la circulació sistèmica dependrà de la taxa perquè les partícules es dissolguin als pulmons i de les seves interaccions amb els lligands presents al fluid pulmonar.

En anàlisis realitzades *in vitro* de partícules (<10µm AED en diàmetre) produïdes després d'impactes de munició de DU, s'ha trobat que entre el 24% i el 43% del total de les partícules carregades es dissolen ràpidament (Jette, 1990).

- Danys i absorció dèrmica

Estudis realitzats en soldats amb fragments de DU (Hooper i col·ls., 1999) mostraven augments en la concentració d'urani en l'orina (més de 150 vegades superiors als controls). Aquests estudis també mostren una petita pèrdua constant d'urani en individus amb fragments durant un any, la qual cosa suggereix una petita pèrdua controlada de DU. En estudis paral·lels realitzats en rates s'observa un augment de la concentració de DU en ronyons i os, i també se'n van detectar certes quantitats al cervell, als testicles i als nòduls limfàtics d'animals exposats (Pellmar i col·ls., 1999a)

- Excreció i eliminació

La baixa absorció d'urani a l'intestí implica que la majoria de producte ingerit no absorbit se secreta per les femtes. Experimentalment s'ha vist que un cop l'urani entra a la circulació sistèmica, aproximadament el 90% s'excretarà a través dels ronyons en forma d'orina durant un període de pocs dies. La quantitat excretada depèn de les seves característiques químiques en sang. La retenció d'urani als ronyons s'ha atribuït a la creació de complexos amb proteïnes i fosfolípids al túbul proximal (Wedeen, 1992). L'excreció fecal comprèn menys de l'1% de l'urani ingerit (ICRP-69, 1995).

L'eliminació de l'esquelet és considerablement més lenta; s'han estimat vides mitjanes de 300 i 5.000 dies, basades en models de dos compartiments (WHO, 1998; Kathren i col·ls., 1989)

El nivell d'exposició ocupacional s'ha fixat en 0,8 µg/l en orina (FEMP, 1997). Aquest valor assumeix una inhalació aguda d'urani moderadament soluble durant un període de 60 dies de mostreig d'orina.

- Acumulació

En estudis realitzats en individus exposats de forma crònica, es reflecteix l'afinitat de l'urani pel fosfat, que és molt abundant a l'os. (Wrenn i col·ls., 1985; Arruda-Neto i col·ls., 2004). En d'altres estudis realitzats per Pellmar i col·ls. (1999a) en rates, es veu com en aquest model animal l'urani s'acumula a l'interior de l'SNC i als testicles. L'acumulació de l'urani als teixits del cervell també l'han estudiat Ozmen i Yurekli (1998) i Lestaevel i col·ls. (2005).

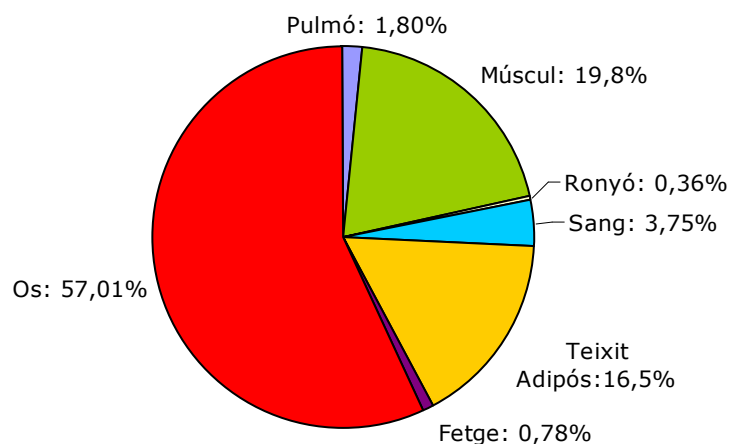


Figura 2: Distribució de ^{238}U en el l'home (Fisenne, 1993)

2.5 Aplicacions de l'urani a la indústria

La producció total calculada d'urani des del 1920, quan es va començar a enregistrar, és d'1,5 milions de tones (British Geological Survey, 2000), tot i que això és només una petita fracció de les 10^{14} tones que s'ha estimat hi ha a la litosfera.

Taula 3. Producció d'urani el 1998 (British Geological Survey, 2000).

País	Tones
Argentina	35
Austràlia	4.901
Canadà	11.041
Xina	500
República Txeca	611
França	508
Gabon	731
Índia	200
Kazakhstan	1.250
Namíbia	2.778
Níger	3.713
Pakistan	23
Portugal	19
Romania	100
Rússia	2.000
Sud-àfrica	965
Espanya	255
Ucraïna	500
EUA	1.872
Uzbekistan	1.930
Total al món	33.900

L'urani té pocs usos industrials. Històricament s'ha emprat en ceràmica i material de vidre, odontologia, catàlisi química, producció d'armes nuclears, etc. En l'actualitat les aplicacions que se li donen inclouen munició i armament militar. L'ús de DU s'ha reconegut en molts conflictes militars, incloent-hi les guerres del Golf, Bòsnia i Kosovo, i en molts fronts militars. L'ús en aquests conflictes demostra clarament els beneficis militars del DU.

2.6 Toxicitat química de l'urani

La toxicitat química de qualsevol element està relacionada amb la interacció d'aquest component amb els processos bioquímics del cos humà. Algunes d'aquestes interaccions poden ser beneficioses i fins i tot essencials, mentre que d'altres poden ser negatives.

Les accions químiques de tots els isòtops i barreges d'isòtops d'urani són idèntiques i independents de la seva activitat específica, perquè l'acció química depèn només de les propietats químiques. Per això, la toxicitat química de l'urani natural, l'empobrit i l'enriquit és idèntica (ATSDR, 1999).

Als anys noranta es van estudiar molt els símptomes i signes de malaltia entre els veterans de la guerra del Golf, i el paper a l'exposició de l'urani com a possible agent causant (Durakovic, 1999; Harley i col·ls., 1999; CHPPM, 2000; Fulco i col·ls., 2000).

Els riscos sobre la salut causats pels efectes químics de l'exposició a l'urani no relacionats amb les radiacions ionitzants es poden calcular mitjançant les guies IPCS (WHO, 1994).

2.6.1 Toxicitat de l'urani en animals d'experimentació

El comportament dosi-resposta d'una substància específica inhalada depèn molt de la mida de les partícules i de la naturalesa química. La toxicitat pulmonar de l'urani varia entre les espècies i depèn de la forma química de l'element (Tannenbaum i col·ls., 1951). L'hexafluorur d'urani pot provocar la mortalitat a rates i cobais a concentracions elevades (entre 26 i 35 mgU/m³). La causa de mort aguda és aparentment la irritació del tracte respiratori. Probablement no és deguda a l'urani sinó a l'àcid hidrofluòric, un producte de la hidròlisi de l'hexafluorur d'urani (Spiegel, 1949; Leach i col·ls., 1984), tot i que la mortalitat pot ser causada pels efectes als ronyons. Es van constatar edemes pulmonars, hemorràgies, inflamacions i emfisemes en rates, ratolins i cobais després de 30 dies d'exposició a 13 mgU/m³ en forma d'hexafluorur d'urani.

S'han observat petits canvis degeneratius en rates i gossos exposats a triòxid d'urani i gossos exposats a nitrat d'uranil hexahidratat a nivells d'exposició d'aproximadament 10 mgU/m³ durant 4-5 setmanes, però no, en canvi, després d'exposicions a diòxid d'urani o octaòxid de triurani (Dygert, 1949; Roberts, 1949; Rothstein, 1949).

Els conills són sensibles al dany pulmonar induït per l'urani. S'han observat edemes pulmonars i hemorràgies després d'exposicions a diuranat d'amoni, peròxid d'urani i triòxid d'urani, però no després d'exposicions a diòxid d'urani (Dygert, 1949; Pozzani, 1949; Rothstein, 1949).

En estudis a llarg termini, amb exposicions de fins un any de diferents animals (rates, conills, cobais, hámsters i gossos) i amb diferents components de l'urani (soluble i insoluble), no es van observar canvis pulmonars en un rang de concentracions de 0,05 a 10 mgU/m³ (Cross i col·ls., 1981a, 1981b). Exposicions cròniques en rates, gossos i micos de diòxid d'urani en dosis de 5 mgU/m³ d'1 a 5 anys no van mostrar canvis histològics ni al pulmó ni als ronyons. Un seguiment posterior a l'exposició mostra una lleugera fibrosi vascular i intersticial en gossos i fibrosi pulmonar en micos (Leach i col·ls., 1970, 1973). Tot i això els investigadors afirmaven que va ser la radiació i no la toxicitat química la causa dels danys apreciats.

Es poden produir efectes renals en animals després d'exposicions per inhalació de durada aguda i intermèdia. Deu minuts d'exposició en rates a 675 mgU/m³ en forma d'hexafluorur d'urani provoca una degeneració greu dels túbuls corticals entre 5 i 8 dies després de l'exposició (Spiegel, 1949).

Els mateixos efectes s'han observat en gossos entre 1 i 3 dies després d'1 hora d'exposar-los a 250 mgU/m^3 en forma de fluorur d'urani (Morrow i col·ls., 1982). S'ha observat proteïnúria i glucosúria en rates després de 2-10 minuts d'exposició a hexafluorur d'urani (Leach i col·ls., 1984).

En estudis de durada intermèdia amb cobais, porcs, ratolins, rates, gats, conills i gossos, les exposicions per inhalació a diferents compostos d'urani van danyar-los els ronyons. Els efectes eren compost-dependent i concentració-dependent i anaven des de lesions mínimes microscòpiques a l'epiteli tubular fins a necrosis greus de l'epiteli tubular en diferents espècies (Dygert, 1949; Rothermel, 1949; Stokinger i col·ls., 1953). En un d'aquests estudis, els ratolins van ser exposats a pols de tetraclor d'urani durant 30 dies. L'exposició els va causar degeneració greu, necrosis de l'epiteli tubular corticorenal i mortalitat en el grup d' 11 mgU/m^3 al tercer dia. Al final de l'estudi es va observar una degeneració tubular moderada en el grup de $2,1 \text{ mgU/m}^3$ i una degeneració mínima en el grup de $0,1 \text{ mgU/m}^3$.

Els efectes nefrotòxics de l'urani en els animals poden incloure danys als glomèruls, evidenciats per signes histopatològics als ronyons de les rates i conills exposats a 15,3 mgU/m³ de diòxid d'urani durant 23 dies (Dygert, 1949) i gossos exposats a 15 mgU/m³ de fluorur d'urani durant 5 setmanes i 16 mgU/m³ de triòxid d'urani durant 4 setmanes (Rothstein, 1949).

En estudis d'inhalació a llarg termini fets amb rates i gossos amb urani soluble i insoluble, en exposicions tan baixes com 0,05 mgU/m³ i tan elevades com 10 mgU/m³ entre 1 i 5 anys, es van veure danys als ronyons. Els efectes nefrotòxics trobats en aquests animals anaven de petites lesions microscòpiques en l'epiteli tubular a necrosis tubulars agudes (Leach i col·ls., 1970; Stokinger i col·ls., 1953).

La toxicitat oral dels compostos d'urani s'ha avaluat en diverses espècies animals. L'LD₅₀ oral de l'AUD s'ha estimat de 114 mg/kg per a rates i de 136 mg/kg per a ratolins (Domingo i col·ls., 1987).

Rates exposades a dosis de 5,6 mg U/kg van patir lleugeres disfuncions renals i petites lesions microscòpiques en l'epiteli tubular (Domingo i col·ls., 1987, 1989a).

En estudis de durada mitjana, exposicions a dosis orals d'urani (fluorur d'urani, octaòxid de triurani, nitrat d'uranil hexahidratat, tetraclor d'urani, peròxid d'urani, diuranat d'amoni) des de 0,05 mg/kg/dia fins a 7.858 mg/kg/dia durant 30 dies van danyar els ronyons. Els efectes nefrotòxics trobats en aquests animals van anar de petites lesions microscòpiques a necrosis extensives en l'epiteli tubular (Maynard i Hodge, 1949).

En rates exposades a nitrat d'urani en l'aigua de beguda durant 91 dies es van trobar lesions renals als túbuls, glomèruls i interstici en el grup d'animals tractats amb la dosi més petita (mascles 0,06 mg U/kg/dia; femelles 0,09 mg U/kg/dia) (Gilman i col·ls., 1998a). Estudis realitzats per McDonald-Taylor i col·ls. (1992, 1997) en conills van produir lesions renals similars (membrana glomerular basal engruixida). En conills, es van observar canvis histopatològics dosi-dependents al ronyó. Aquests canvis eren més evidents en els mascles (Gilman i col·ls., 1998b).

La patogènesi del dany renal en els animals indica que la regeneració de l'epiteli tubular es produeix en els animals supervivents després d'una exposició a urani discontinua (Dygert, 1949; Maynard i Hodge, 1949; Pozzani, 1949; Rothemel, 1949; Rothstein, 1949; Spiegel, 1949; Stokinger i col·ls., 1953; Bentley i col·ls., 1985).

Leggett (1989) esmenta que la tolerància es desenvolupa segons les exposicions repetides a urani, però no preveu el dany crònic al ronyó, com es mostra amb unes cèl·lules regenerades que són força diferents. Canvis persistents en els túbuls proximals de conills s'associen amb la capacitat del ronyó d'emmagatzemar urani (McDonald-Taylor i col·ls., 1997).

En diversos estudis fets amb ratolins als quals s'han subministrat components solubles d'urani (nitrat d'uranil hexahidratat, acetat d'uranil dihidratat) s'han estudiat els efectes teratogènics, embriotòxics i reproductius (Domingo, 1989a, 1989b). Es va observar fetotoxicitat relacionada amb l'exposició, pesos corporals fetals reduïts, malformacions externes i internes, augment d'alteracions del desenvolupament i disminució de la fertilitat. En rates es van detectar canvis degeneratius als testicles després d'administracions cròniques de nitrat d'uranil hexahidratat i de fluorur d'urani a la dieta (Maynard i Hodge, 1949; Maynard i col·ls., 1953; Malenchenko i col·ls., 1978).

Pellmar i col·ls. (1999a) van dur a terme estudis en rates a les quals els van implantar fragments esterilitzats de DU. Els resultats van concloure que en un model animal com les rates, l'urani es podia acumular al sistema nerviós central i als testicles.

En un altre estudi continuació del primer (Pellmar i col·ls., 1999b) es van observar canvis electrofisiològics a l'hipocamp d'aquests animals. Als 12 mesos les amplituds dels potencials sinàptics van ser més grans als teixits derivats de la dosi més elevada d'urani implantada respecte als controls. Tot i això, en el mateix model animal l'activitat motora no va ser afectada, ni van trobar-se diferències d'aprenentatge (Pellmar i col·ls., 1997), la qual cosa fa més difícil interpretar la significació de l'acumulació d'urani al cervell. Tampoc es van trobar signes de nefrotoxicitat en aquests animals, fet que dista molt d'estudis on el tractament era per via oral.

2.6.2 Toxicitat de l'urani en humans

Tot i les evidències que indiquen efectes letals de l'urani sobre els animals, estudis epidemiològics demostren que l'exposició de forma rutinària a urani en l'aire no està associada amb un l'augment de mortalitat (ATSDR, 1999). Diversos estudis epidemiològics no han observat cap augment de la mortalitat en treballadors exposats a urani com a conseqüència d'una patologia renal (Archer i col·ls., 1973a, 1973b; Polednak i Frome, 1981; Brown and Bloom, 1987; Checkoway i col·ls., 1988). A més a més, aquests estudis mostren que els treballadors exposats de forma accidental a nivells elevats d'urani no pateixen dany renal, tot i 38 anys després de l'exposició (Eisenbud i Quigley, 1956; Kathren i Moore, 1986). Cal tenir en

compte, però, que els tests emprats en aquests estudis no eren gaire sensibles.

Una comparació recent de ronyó obtingut d'autòpsies de set treballadors exposats a urani i sis controls va mostrar que patòlegs amb experiència sobre les patologies renals induïdes per urani no podien diferenciar els grups (Russell i col·ls., 1996).

Efectes retardats sobre el ronyó es van veure després que un treballador es va exposar de forma accidental a una elevada concentració de pols de tetrafluorur d'urani durant 5 minuts aproximadament en una habitació tancada (Lu i Zhao, 1990).

En canvi, no es van veure efectes renals en un altra sobreexposició per accident (Fisher i col·ls., 1990) en la qual es va fer un seguiment durant 2 anys a 24 de 31 treballadors. Tot i així, s'ha observat un augment de la mortalitat per nefritis crònica entre 2.514 treballadors que processen urani. Aquest estudi es va basar en sis morts, la qual cosa no presentava diferències estadístiques (Dupree-Ellis i col·ls., 2000).

Dipino i col·ls. (1998) va comparar cinc maneres de funcionament intel·lectual premòrbid entre un grup de pacients danyats per munició de DU en la Guerra del Golf. Desafortunadament només es van realitzar comparacions entre grups i va ser impossible comparar les dades amb aquells que patien danys no associats a l'urani empobrit.

McDiarmid i col·ls. (2000) van estudiar una cohort de veterans de la Guerra del Golf que tenien fragments de DU en teixits tous. Els resultats de la bateria de tests neurocognitius van suggerir una relació estadística entre els elevats nivells urinaris d'urani i una actuació "problemàtica" en els tests. Els tests sobre la funció neurocognitiva no mostren diferències estadístiques entre els veterans de la Guerra i el grup control. Tot i això, tal com es va discutir al Comité sobre els Efectes de la Salut Associats a l'Exposició Durant la Guerra del Golf (Fulco i col·ls., 2000) a causa de problemes metodològics és difícil proporcionar conclusions fermes sobre aquest estudi.

La funció renal en els veterans de la Guerra del Golf amb fragments de DU era normal després d'anys d'exposició, tot i la concentració d'urani en l'orina fins a 30,7µg U/g creatinina (McDiarmid i col·ls., 2000).

2.6.3 Estudis *in vitro*

Estudis *in vitro* en osteoblasts humans han indicat que es poden transformar en el fenotip tumorigènic (canvis morfològics, inducció de tumors quan són implantats en ratolins sans, diferències en l'expressió de l'oncogen ras i fosforilació de pRb) a causa del DU administrat en forma de clorur d'urani (Miller i col·ls., 1998a). Els autors consideren que aquesta transformació és deguda als efectes químics més que als radiològics, tals com la interacció de l'urani amb els grups que contenen fòsfor al DNA, i consideren que la magnitud de l'activitat és similar a l'observada en el cas del sulfat de níquel i acetat de plom.

El nitrat d'uranil és citotòxic i genotòxic en les cèl·lules ovàriques de hámster xinès (CHO). Provoca disminució de la viabilitat de les cèl·lules dosi-dependents, una disminució de la cinètica del cicle cel·lular i un augment de la freqüència de micronuclis, intercanvi entre cromàtides germanes i aberracions cromosòmiques (Lin i col·ls., 1993). Es va pensar que els efectes genotòxics d'aquest estudi es van produir per la unió del nitrat d'uranil als grups fosfat del DNA. Es va suggerir que aquests resultats proporcionaven un possible mecanisme pels efectes teratogènics observats (WHO, 1998). Miller i col·ls. (1998b) també van observar activitat mutagènica en l'orina de rates a les quals s'havia implantat DU (en múscul), tot i que no es va observar mutagenicitat significativa en sèrum.

III. ESTRÈS

3.1 Generalitats

El concepte d'*estrès* va ser introduït per Hans Selye (1907-1982), el qual va contribuir a establir l'endocrinologia moderna. Segons Selye (1955), el terme *estrès* defineix un estat o situació del cos produït per diversos agents nocius i manifestat per una síndrome de canvis que donen a conèixer la presència de l'estrès al cos. Selye va denominar aquests canvis "síndrome general d'adaptació", i es produeixen en tres fases:

- *Reacció d'alarma*: va incloure en aquesta fase la hipertròfia de l'escorça suprarenal, atròfia dels òrgans limfàtics i úlceres sagnants a l'estómac i duodè. A més, el sistema nerviós simpàtic (SNS) i la medul·la suprarenal augmenten la seva activitat.
- *Fase de resistència o adaptació*: en aquesta fase, l'escorça i la medul·la suprarenal retornen al seu ritme normal de secreció hormonal. Els canvis produïts durant la fase d'alarma com a conseqüència de l'augment de secreció de corticoides desapareixen durant aquesta etapa.
- *Fase d'esgotament*: aquesta última fase només apareix quan l'estrès és molt greu o es perllonga durant molt de temps. La secreció de corticoides i l'adaptació acaben per disminuir notablement. (Selye, 1936; Valdés i De Flores, 1986).

Altres definicions d'estrès més recents són:

1. L'estrès és una resposta altament individualitzada d'un organisme davant d'una sèrie de reptes externs i interns que l'individu no pot controlar o ho fa només amb una més o menys dificultat (Vogel, 1993).
2. L'estrès és una amenaça percebuda cap a l'homeòstasi i un estímul que causa increment en l'activitat autònoma i/o secreció hormonal (particularment hormones com cortisol i prolactina). El terme estrès "percebut" emfatitza que cada individu pot reaccionar de forma diferent a un esdeveniment o situació, segons l'estat físic i les experiències anteriors (McEwen, 1994a).

3.2 L'estrès com a resposta fisiològica.

Des del punt de vista fisiològic, l'estrès és una resposta altament individualitzada a un repte extern o intern. Altera el sistema nerviós vegetatiu (SNV) i provoca un desequilibri a favor del sistema nerviós simpàtic (SNS), i en aquestes situacions també s'observa una modificació en l'alliberament de glicocorticoides.

Els glicocorticoides són necessaris perquè el nostre organisme respongui d'una forma eficaç a l'estrès, però l'excés d'una manera mantinguda pot ser perjudicial per a l'individu (McEwen, 1994b; Sapolsky, 1994a; Stout i Nemeroff, 1994). En qualsevol cas, la resposta serà una programada per característiques genètiques, constitucionals o adquirides, i constantment modulada per factors ambientals (Valdés i De Flores, 1986).

Hi ha una evidència considerable que mostra que la resposta de l'eix hipotalamohipofític (HPA), es redueix progressivament després d'exposicions repetides al mateix estressor. L'habitució dependria de molts factors: la intensitat de l'estrès, l'interval de temps intersecció o la variabilitat interindividual (Lachuer i cols, 1994).

L'estrès, biològicament i evolutivament, és una resposta fisiològica que produït de forma puntual és estrès agut però en l'actualitat la majoria de les situacions que ens provoquen estrès són d'origen social o psicològic (relacions personals, promoció en el treball...). Així, activen d'una forma permanent estrès crònic aquest sistema i això augmenta la vulnerabilitat del subjecte a desenvolupar patologies.

Els glicocorticoides poden ser tant un risc afegit com un factor protector, segons els nivells i la durada. Tant el dèficit com l'excés d'aquestes hormones poden engegar mecanismes que facilitin la instauració de patologies tant generals com específicament a l'SNC.

Els glicocorticoides, juntament amb els mineralcorticoides són les principals hormones segregades per la glàndula suprarenal (còrtex suprarenal). Se secreten des de les zones fasciculades i reticulars del còrtex suprarenal, i depenen de la secreció de l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) des de la hipòfisi, que al seu torn és regulada per l'alliberament del factor alliberador d'hormona adrenocorticotropa (CRH) des de l'hipotàlem (nucli paraventricular, NPV). La secreció d'aquests factors segueix un ritme circadiari ben desenvolupat després dels primers anys de vida (Nelson i col·ls., 1980) i el seu patró d'alliberament pot estar modulats per diverses variables, per exemple, l'exposició prèvia a situacions estressants (Curtis i col·ls., 1995), estrès físic o psicològic, exercici (Del Corral i col·ls., 1994), o nivells de glucosa (Dallman i col·ls., 1994); així el dejuni també tindria un efecte inhibidor sobre la secreció del cortisol en determinades situacions.

A més, aquest sistema té un mecanisme d'autoregulació de l'alliberament anomenat *retroalimentació negativa* (feedback negatiu), que l'exerceix principalment l'hipotàlem a través dels dos subtipus de receptors per als glicocorticoides: els receptors mineralcorticoides (MR o subtipus I) i els receptors glicocorticoides (GR o subtipus II).

Els receptors MR tenen una alta afinitat tant per als glicocorticoides com per als mineralcorticoides. Tenen efectes excitadors i són els responsables dels efectes tòncics d'aquestes substàncies. En canvi, els receptors GR tenen una baixa afinitat tant per als mineralcorticoides com per als glicocorticoides, de tal manera que només són ocupats a altes concentracions de glicocorticoides, i els efectes són de tipus inhibitori (efectes fàsics). L'ocupació a l'hipotàlem i a altres estructures centrals provoca que l'hipotàlem no alliberi CRH i per tant, disminueixi l'ACTH i els glicocorticoides (McEwen, 1994b). Per altra part, l'hipotàlem és una estructura que rep inputs de pràcticament totes les estructures del cervell i de la perifèria. Els receptors de tipus II o GR sembla que tenen el rol més important en la regulació de l'estrès fisiològic, i també serien els més afectats per les experiències primerenques (Gunnar i Barr, 1998).

El cortisol és el principal glicocorticoide que secreten els humans i altres primats, mentre que en rosegadors pràcticament no existeix; en el seu lloc es troba la corticosterona. En línies generals, podem considerar-los com les hormones de l'estrès, que permeten a l'organisme respostes ràpides, eficaces i adaptatives. Els efectes generals són:

- Augment dels nivells de glucosa a la sang mitjançant:
 - * La conversió de proteïnes en carbohidrats
 - * El trencament del glucogen

- * Reducció de la glucogènesi
- * Augment de la lipòlisi
- Immunosupressors
- Antiinflamatoris

Els efectes sobre els SNC es donen principalment sobre l'hipotàlem, l'hipocamp, l'amígdala, el còrtex prefrontal i el tronc del cervell. En general, es pot dir que:

- * Introdueixen una resposta perifèrica al cervell
- * Controlen a llarg termini l'excitabilitat d'alguns grups neurals
- * Modulen les funcions cognitives durant l'estrès

A les cèl·lules hi podem observar canvis ràpids (supressió o excitació) o lents (a llarg termini), que modifiquen la resposta a neurotransmissors o les propietats de membrana (Joels, 1997).

3.2.1 Diferències individuals en la resposta a l'estrès

Els organismes difereixen en la seva vulnerabilitat a l'estrès en resposta a estressors físics i sobretot psicològics. Hi ha una variabilitat interindividual més gran en la magnitud i qualitat de les respostes als estressors psicològics. En els estressors psicològics és acceptat que en realitat la interpretació d'un estímul com a nociu o perillós és el que determina la resposta d'estrès, i no necessàriament l'estímul en si.

L'estrès psicològic és un procés que depèn de l'avaluació cognitiva que cada individu fa de la situació, a més de la seva capacitat d'habitució. Situacions d'amenaça són percebudes i avaluades de diferent forma pels individus, i les respostes presenten igualment notables diferències (Buendia, 1993). Les respostes al repte són individualitzades, i per tant hi haurà diferències individuals tant en les respostes endocrines com autonòmiques (McEwen, 1994a).

Alguns investigadors han posat l'èmfasi en el rol de la genètica, i d'altres, en les diferents experiències perinatals pel que fa a l'augment de les diferències en la resposta de l'adult a l'estrès (Sapolsky, 1994b).

La resposta de l'hipotàlem a qualsevol estrès depèn no només de l'estressor específic, sinó també de la durada del patró d'estimulació, dels factors constitucionals, de les experiències prèvies, de l'edat i del sexe de l'individu, de les experiències perinatals i de la posició o no de dominància dins d'un grup social (Lightman, 1994). Així, altres autors existeixen també autors que han estudiat els trets de personalitat com a moduladors de la resposta cardiovascular a l'estrès (Al'Absi i col·ls., 2000).

L'estrès és una resposta altament individualitzada, que està determinada per factors genètics i ambientals, cosa que fa les generalitzacions força difícils. Un organisme se pot suportar l'estrès per un cert temps sense experimentar trastorns significatius. Tanmateix, si existeix vulnerabilitat en algun òrgan, l'estrès hi pot causar canvis patològics (Vogel, 1993).

3.3 Models d'estrès en animals d'experimentació

Els animals poden ser sotmesos a diferents tipus d'estressors, en els quals predominaran segons el tipus, l'estrès físic (calor, injeccions...), psicològic (aïllament) o mixt (immobilització o *restraint*) (Chernoff i col·ls., 1988; Kimmel i col·ls., 1993; Murata i col·ls., 1993; Rasco i Hood, 1994, 1995; Domingo, 1995; Miller i Chernoff, 1995; Grandin, 1997).

També es pot estudiar l'estrès provocant de forma química l'augment de glucocorticoides, per exemple administrant de corticoesterona (Magariños i McEwen, 1995). Això permet estudiar de forma aïllada un dels sistemes involucrats en la resposta a l'estrès.

3.3.1 Estrès per soroll

Està àmpliament acceptat que el soroll pot ser un estressor que causa canvis en les funcions biològiques. S'ha descrit que pot provocar modificacions endocrines tal com provoquen altres models d'estrès (Paparelli i col·ls., 1992; Soldani i col·ls., 1997; Salvetti i col·ls., 2000).

El soroll es considera generalment un factor d'estrès ambiental que les persones troben en el dia a dia (Gesi i col·ls., 1999) i és fàcilment aplicable a l'experimentació en animals. A la vegada, estudiar-lo és força interessant a causa de l'increment que hi ha hagut en les societats industrialitzades, on les persones s'hi poden trobar exposades no només en el lloc de treball, sinó també en el seu ambient familiar i de lleure. Així, molts investigadors han utilitzat el soroll com a model d'estrès en els seus estudis, com un model d'estimulació crònica de l'eix HPA (Alario i col·ls., 1987; Stam i col·ls., 1999). També s'ha utilitzat per avaluar els efectes de l'estrès sobre el desenvolupament (Kimmel i col·ls., 1976; Nawrot i col·ls., 1980) i la interacció amb d'altres tòxics durant el desenvolupament (Murata i col·ls., 1993).

Aquests experiments s'han portat a terme utilitzant diversos paradigmes (diferents tipus de soroll, intensitat, duració, amb intervals etc.), i fins i tot alguns autors han intentat comparar paradigmes de soroll amb possibles diferències en l'efecte estressant de cadascun (Nawrot i col·ls., 1980).

3.3.2 Administració d'hidrocortisona

Els efectes de l'estrès estan relacionats principalment amb els glucocorticoides. La hidrocortisona administrada en animals d'experimentació es pot fer servir com a substitut de condicions estressants, per reduir els efectes indesitjables d'altres condicions d'estrès físic. Per altra banda, estan descrites i es coneixen les dosis d'hidrocortisona que substitueixen situacions d'estrès lleuger-moderat (Magariños i McEwen, 1995).

3.3.3 Estrès per immobilització (*restraint*)

Un dels models més coneguts i utilitzats com a inductor d'estrès en animals és la immobilització. Aquest model s'utilitza en l'actualitat però té una llarga història. Així, el 1936 Selye ja va realitzar un treball sobre la influència de l'estrès per immobilització en animals de laboratori.

L'estrès per immobilització o *restraint*, és un model molt comú perquè és un estressor fàcilment controlable que es considera un model mixt d'estrès físic moderat i psicològic. S'ha utilitzat en moltes àrees de la biologia per avaluar la base dels canvis fisiològics associats a l'estrès (Marcilhac i Siaud, 1996; Colomina i col·ls., 1997, 2000; Alonso i col·ls., 2000).

En els últims anys s'ha utilitzat per avaluar els efectes de l'estrès sobre l'SNC i més concretament els seus efectes en l'aprenentatge i la memòria (per exemple Luine i col·ls., 1994, 1996; Szuran i col·ls., 1994).

3.4 Efectes de l'estrès en el desenvolupament

El desenvolupament de l'SNC està determinat per factors genètics i per l'entorn postnatal, però també per l'entorn matern durant la gestació. En aquest sentit, s'ha trobat una correlació altament significativa entre morbimortalitat infantil i estrès matern (Stott, 1973).

S'han fet estudis en humans utilitzant tests psicològics per determinar els nivells d'estrès. Els resultats indiquen que l'ansietat aguda podria estar associada amb un augment en el nombre de parts prematurs, parts amb menor pes del bebè i probablement parts amb d'altres factors afegits a l'estrès, els quals influeixen sobre la gestació, com són l'hàbit de fumar, una nutrició pobra o un nivell socioeconòmic baix entre d'altres (Scialli, 1988; Wadhwa i col·ls., 1993).

En contrast amb els resultats d'estudis epidemiològics, les investigacions amb animals de laboratori hi aporten dades més concretes, encara que més controvertides (Morishina i col·ls., 1978; Scialli, 1988).

Durant els últims anys diversos estudis han demostrat alteracions primerenques en el desenvolupament motor i anormalitat en el comportament de la descendència de mares estressades, amb increment de l'emocionalitat en les cries durant la seva maduresa, respostes alterades davant una situació nova i desordres en el curs normal de la diferenciació sexual, perdurables fins a la maduresa (Barlow i col·ls., 1978; Fride i col·ls., 1986; Chantal i col·ls., 1994).

En humans, al naixement i durant el període neonatal, neonats i lactants tenen el sistema adrenocortical altament làbil i sensible a l'estimulació (Gunnar, 1998). La investigació en animals mostra clarament que les experiències primerenques "programen" els circuits d'estrès del cervell d'una manera que afectarà la posterior competència cognitiva, la resposta emocional i l'activitat dels sistemes fisiològics que orquestrin les nostres reaccions a l'estrès i al repte (Meaney i col·ls., 1994; Gunnar i Barr, 1998).

El cortisol, igual que altres hormones, és necessari per al desenvolupament normal de l'organisme. Els nivells de cortisol regulen la mort neuronal (apoptosi) i modulen la diferenciació i el creixement neuronal (Koob i col·ls., 1994; Gunnar i Barr, 1998; King i Edwards, 1999).

Les experiències prenatales i postnatales determinen la quantitat de receptors per a glicocorticoides al cervell (Gunnar, 1998). L'exposició prenatal a corticoides induïx una disminució de la neurogènesi al gir dentat de l'hipocamp (Lemaire i col·ls., 2000), disminueix els nivells de receptors, i per tant augmenta i perllonga la resposta de l'eix a l'estrès.

Així, s'ha descrit un augment de la por, disminució de la capacitat d'atenció, disminució de la resposta immune i augment de les catecolamines (Gunnar, 1998). Fins i tot, s'ha suggerit que l'estrès matern podria tenir efectes a llarg termini en els sistemes noradrenèrgic i dopaminèrgic de les cries (Schneider i col·ls., 1998). En aquest sentit, es va comprovar que l'estrès prenatal en rates produeix una descendència que és hipersensible a estímuls que provoquen ansietat, la qual cosa suggereix menor capacitat d'habitució perquè es mostren més vulnerables a estímuls estressants (Peters, 1982; Fride i col·ls., 1986).

Alguns investigadors han proposat que les diferències que es troben durant la maduresa de rates prenatalment exposades a estrès respecte a rates control només es manifestarien si aquestes s'enfrontessin a situacions que constitueixen una novetat o una situació estressant per a l'animal (Fride i col·ls., 1986; Szuran i col·ls., 1991).

Una altra diferència que es va observar en rates prenatalment estressades és el funcionament cognitiu (McGivern i col·ls., 1986). Se sap que l'hipocamp és crític per l'aprenentatge espacial, i que l'estrès fa empitjorar les tasques espacials relacionades amb l'hipocamp (Lemaire i col·ls., 2000). Es va veure que l'estrès prenatal disminuïa el pes de l'hipocamp en ambdós sexes (Morris, 1984; Szuran i col·ls., 1994).

Chantal i col·ls. (1994) van trobar en rates diferents respostes davant un estímul, tant en mascles com en femelles prenatalment estressats. Només els mascles presentaven uns nivells de corticosterona elevats als dies 3 i 21 després de la situació nova. Aquests nivells perduraven fins als 90 dies. També es va observar una disminució dels receptors de corticosteroides I i II de l'hipocamp als dies 21 i 90, però no es va trobar quan es va observar al tercer dia de vida.

Altres estudis constaten que en tots dos sexes, diferents estímuls estressants com la calor, la immobilització, etc. alteren el curs normal de la diferenciació sexual i també comporten alteracions del comportament sociosexual. Els efectes són més a llarg termini i acostumen a ser desmasculinització i feminització. En molts rosegadors, l'estrès prenatal va disminuir la freqüència de copulació i va augmentar les agressions entre mascles i l'infanticidi. En les femelles, es va produir alteració dels cicles, reducció de la sensibilització sexual i reducció del comportament agressiu postpart, alteracions en el comportament matern i reducció de la fertilitat i la fecunditat (Vom Saal, 1983; Anderson i col·ls., 1985).

Una qüestió que està encara per resoldre és si els efectes de l'estrès prenatal són mediats per la reducció de la ingesta i per la disminució del guany de pes dels animals gestants sotmesos a estrès.

Tampoc és clar si aquesta reducció de la ingesta i de l'increment de pes deguts a l'estrès estimulen els canvis hormonals que es donen en el fetus i en les femelles gestants durant situacions d'estrès o hi actuen juntament (Kinsley i Svare, 1986).

S'han observat reduccions agudes en els nivells materns de progesterona i de gonadotropina en rates amb malnutrició durant la gestació, les quals són molt similars a les que s'han descrit per estrès o immobilització (Rhees i Fleming, 1981). Ward i Wainwright (1988), després de sotmetre ratolins a estrès per immobilització sota diverses condicions, van comprovar que la baixa nutrició resultant de l'estrès per immobilització és suficient per produir els dèficits observats en la descendència quant al pes del naixement i pes del cervell als 32 dies de vida. Així doncs, confirmen els resultats obtinguts per Kinsley i Svare (1986) en rates.

En el sentit contrari a l'estrès prenatal, una cura materna adequada postnatal, pot provocar augment dels receptors dels glicocorticoides i, per tant, millor regulació de la resposta als estressors que poden arribar a revertir en els efectes adversos de l'estrès prenatal (Gunnar, 1998).

Els organismes i les psiques difereixen tremendament en la vulnerabilitat a l'estrès en resposta a estressors físics i sobretot psicològics. En aquesta variabilitat interindividual hi tenen a veure la genètica, les experiències perinatals, així com altres experiències al llarg de la vida que augmentaran les diferències en la resposta de l'adult a l'estrès (Sapolsky, 1994b).

3.5 Efectes de l'estrès en l'adult

En un principi, els canvis fisiològics i metabòlics que es produeixen en l'organisme davant una situació estressant ajudarien l'individu a afrontar la situació. Però quan la intensitat i/o durada de l'estímul estressant supera determinats nivells, la resposta desencadenada pot suposar una amenaça per a la salut i el benestar de l'individu, i es poden produir alteracions fisiològiques, metabòliques i psicològiques.

Els trastorns relacionats amb l'estrès que han rebut força atenció són:

a. *Alteracions en el sistema cardiovascular*

Quan els nivells plasmàtics de glucocorticoides són elevats durant un llarg període de temps, les cèl·lules impedeixen l'acció de la insulina sobre la captura de la glucosa de manera que es produeix un increment en els nivells plasmàtics de glucosa.

L'increment dels nivells de glucosa juntament amb l'elevació dels nivells de glucocorticoides produeix un emmagatzematge important de greix i la formació de plaques d'arteriosclerosi. Com a conseqüència es redueix enormement el rec sanguini al cor i es pot arribar a produir una isquèmia coronària.

b. Alteracions en el sistema digestiu i problemes associats

L'augment en els nivells de glucocorticoides que es produeix en situacions d'estrès sembla que és responsable de l'increment en la producció d'àcid clorhídric i en la reducció de les cobertes de protecció de les parets de l'estómac. Aquest procés incrementa la vulnerabilitat de l'estómac al dany, així com la possibilitat que en períodes d'estrès es reactivin o compliquin possibles úlceres pèptiques ja existents.

c. Alteracions sexuals i del sistema reproductor

L'estrès redueix considerablement els nivells de testosterona en mascles, i d'estradiol en femelles. Mentre que en homes la inhibició de la testosterona no produeix greus conseqüències manifestes, la reducció dels estrògens en femelles, a més de reduir la libido, provoca importants alteracions del cicle menstrual (dismenorrees), que causen generalment retards i disminució, i fins i tot pot arribar a desaparèixer completament el procés d'ovulació.

A més l'increment dels nivells de prolactina en femelles interfereix en l'acció de la progesterona. Per tant, en cas de produir-se fecundació, les possibilitats que l'òvul fecundat s'implanti en l'úter es redueixen.

En homes es pot veure inhibida la resposta davant de l'acte sexual, ja que es necessita un predomini simpàtic en la major part de l'organisme, mentre que per a l'erecció es necessita un to parasimpàtic (Sandi i col·ls., 2001).

La CRH inhibeix aspectes fisiològics i conductuals de la funció reproductiva. La reproducció és un estat que requereix un alt cost metabòlic, particularment en les femelles i ha d'estar lògicament ajornada durant l'estressor (Sapolsky i col·ls., 2000).

L'exposició a estressors o a nivells de corticosteroides elevats, inhibeix les conductes reproductives en molts vertebrats. Aquestes respostes conductuals són consistents amb la idea que les funcions "no essencials" són suprimides durant la resposta d'estrès per permetre a l'organisme respondre més efectivament a l'estressor (Orchinik, 1998).

3.6 Estrès i tòxics

La interacció tòxica fa referència a la modificació qualitativa o quantitativa de la toxicitat d'una substància per l'acció d'una altra. Aquest procés apareix principalment en l'organisme animal després de l'exposició, i dona com a resultat una resposta tòxica superior o inferior a la suma dels efectes (Krishnan i Brodeur, 1994).

En general, aquestes interaccions tòxiques poden ser bàsicament de quatre tipus:

1. Additives, quan l'efecte global és la simple suma dels efectes individuals.
2. Sinèrgiques, quan l'efecte de l'exposició a dos agents és més gran que els efectes de cadascun d'ells considerats de forma individual.
3. Potenciadores, quan un agent no provoca efectes tòxics en un determinat òrgan; però si l'exposició es produeix conjuntament amb un altre agent tòxic, la toxicitat d'aquest últim s'incrementa significativament.
4. Antagonistes, quan l'acció dels dos agents alhora resulta menys tòxica que cadascun d'ells per separat (Nelson, 1994).

Independentment del tipus, la interacció és conseqüència d'una alteració en la toxicocinètica i/o toxicodinàmica dels agents implicats. Una alteració de la toxicocinètica suposa una modulació en l'absorció, distribució, metabolització i/o excreció d'un agent per l'efecte d'un altre. Una alteració de la toxicodinàmica suposaria la competència entre dues substàncies per un teixit "diana", o bé que un dels tòxics alteraria la susceptibilitat de cèl·lules "diana" cap als efectes de l'altre tòxic (Krishnan i Brodeur, 1994).

En aquest sentit, les diferències entre organismes estressats i no estressats poden canviar la cinètica i la dinàmica d'un agent químic. S'ha demostrat la capacitat de l'estrès per augmentar la motilitat gastrointestinal a més d'alterar el rec sanguini, circumstàncies que afecten l'absorció, distribució, metabolització i eliminació de tòxics (Vogel, 1987).

L'estrès matern durant la gestació és també capaç d'afectar de forma adversa el desenvolupament embriofetal. S'han investigat les interaccions d'agents químics tòxics amb l'estrès matern i s'ha vist que la teratogenicitat dels tòxics pot veure's incrementada per l'acció de l'estrès (Rasco i Hood, 1994; Colomina i col·ls., 1995, 1997, 1998). Tot i així, en general aquest increment es manifesta quan el tòxic és administrat a dosis que ja són tòxiques per si mateixes per a les mares; és a dir, l'estrès només actuaria sobre els tòxics quan les dosis són prou altes per produir ja toxicitat materna (Chernoff i col·ls., 1988).

I. Materials

1.1 Animals d'experimentació

Es van utilitzar com a animals d'experimentació rates. Aquestes eren albines, mascles i femelles, de la soca Sprague-Dawley (*Charles River*), amb un pes mitjà d'entre 200-250g. Els animals van ser acomodats a l'estabulari en gàbies Makrolon, sota condicions estàndard de temperatura ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), humitat relativa ($50\pm 10\%$) i un cicle de llum-foscor de 12 hores diàries (llum 08:00-20:00). En tot moment els animals van rebre aigua de l'aixeta (excepte els grups tractats) i menjar (dieta estàndard Panlab, A04 per a rosegadors, Barcelona) *ad libitum*. Es deixava sempre als animals un període d'aclimatació de catorze dies abans de començar l'experiment.

En tot moment es van 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

- **Per al tractament**

- Acetat d'uranil dihidratat (AUD), $(\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$
Panreac 131752

- **Per a l'avaluació de la reproducció**

- Solució de Hank's, Sigma-Aldrich, H9269
- Panòptic Ràpid, QCA, solució 1-991681, solució 2-994239, solució 3-992426
- Solució de tritó: 0,01% Tritó X-100; Panreac 212314 amb 0,9% NaCl; Panreac 131659
- Formaldehid al 3,7-4% p/v, QCA, 991005
- Solució de Richardson (Hematoxilina de Harris 50%): QCA, 992232

- **Per a l'estudi anatomopatològic**

- Formaldehid al 3,7-4% p/v, QCA, 991005
- Hematoxilina-Eosina: QCA 992232-Merck 15939)

- **Per a les digestions**

- Àcid nítric al 65% (HNO₃): Merck 100456

- **Per al sacrifici dels animals**

- Ketamina (Ketolar®)/Xylazina (Sigma: X 1251)

- **Per a la valoració de l'estrès oxidatiu**

- Reactiu de Bradford: Sigma B6916
- Albúmina sèrica bovina (BSA): Sigma A9647

- Glutatió oxidat (GSSG): Sigma G4501
- Glutatió reduït (GSH): Sigma G4251
- Epinefrina: Sigma E4375
- Glutatió reductasa (GR): Fluka 49755
- Fosfat potàssic bàsic (K_2HPO_4): Panreac 121512
- Fosfat potàssic àcid (KH_2PO_4): Panreac 131509
- Àcid etildiaminotetracètic (EDTA): Merck 1084180100
- Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït (NADPH):
Sigma N 7505
- T-butilhidroperòxid (T-BuOOH): Sigma T9889
- Àcid tricloroacètic (TCA): Panreac 131067
- Fosfat sòdic bàsic (Na_2HPO_4): Panreac 131679
- Fosfat sòdic àcid (NaH_2PO_4): Panreac 121677
- N-etil-maleïmida (NEM): Merck 101308
- O-phtalaldehid (OPT): Merck 111452
- Hidròxid sòdic (NaOH): Panreac 171561
- Peròxid d'hidrògen (H_2O_2): Merck 8599, 30%

- Carbonat sòdic bàsic (Na_2CO_3): Merck 6392
- Carbonat sòdic àcid (NaHCO_3): Merck 6329
- Àcid clorhídric (HCl): Panreac 131019
- Àcid tiobarbitúric (TBA): Sigma T 5500

1.3 Material específic

a. Gàbies d'immobilització

Per a sotmetre els animals a estrès es van utilitzar gàbies d'immobilització Cepos para Roedores (Panlab SL, Leticia, Barcelona), específics per a rates de fins a 400g, fabricades a partir de cilindres de metacrilat transparent, muntat sobre una base de metacrilat negre amb forats.

b. Aparells per la realització dels diferents tests als animals

- *Mesurador de força*. Per mesurar la força a les extremitats anteriors de les rates 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 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 guarda el valor més alt de força de l'animal.

- *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 24 V – 10 W). 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 xoc elèctric a l'animal quan aquest canvia del compartiment clar al fosc. Les dimensions de l'aparell per a rates són de 40x20x20cm (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'obre la porta, la duració i la intensitat del xoc, a més del temps màxim per a cada intent (*Passive Avoidance Apparatus*, Panlab SL, Ugo Basile, Itàlia).
- *Camp obert (Open field)*. Per a la realització del test del camp obert, el recinte utilitzat per col·locar l'animal és de fusta plastificada, amb una superfície de 80x80cm per a rates amb unes parets d'alçada de 47cm i obert per la part superior.

L'interior podia estar il·luminat de forma indirecta per un llum blanc de 60 W de potència.

- *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 és 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, hi ha dipositada una plataforma cilíndrica de 12 cm de diàmetre i 20 cm d'alçada de plàstic transparent. Les parets que envolten la piscina són de rajola blanca amb senyals geomètrics diferents a cadascuna d'elles. La temperatura de l'aigua durant la prova era de $23 \pm 2^\circ$ C. A 2,5 metres de la base i centrada, es troba col·locada la càmera per al registre d'imatges.

Per al registre de totes les accions es va utilitzar l'equip Ethovision, versió 1.70, de Noldus Technology per a 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.

c. Altres materials i instruments

- Eppendorfs 1.5 ml: DASLAB 17-5508-N
- Cubetes Kartell 1960
- Microcubetes Greiner 613101
- Cubetes Cobas: Roche
- Tubs de vidre 10 ml (Pyrex): Corning 99445-16
- Vidre de rellotge
- Bisturí
- Estufa P-Selecta, mod. 4000602
- Portaobjectes i cobreobjectes
- Microscopi òptic Olympus CX41
- Homogeneïtzador manual Micropotter-Eveljeim
- Homogeneïtzador Politron PCU Kinematica
- Cambra de Neubauer
- Cronòmetre
- Làmina de fullola de 12x25cm
- Sonda per mesurar T^a

- Comptador d'espermatozoides Crison-Leucoesperm 84
- Autoanalitzador Cobas Fara-Mira
- Espectofotòmetre Perkin Elmer Lambda 2, UV/VIS
- Espectofluorímetre Perkin Elmer LS 50 B
- Balança precisió Sartorius Analytic
- Bany termostatizat Selecta, mod. 6000138
- Centrífuga Kokusan H-103N
- Ultracentrífuga Kontron Centrikon T-1045
- Microcentrífuga P-Selecta, mod. Centrolit II
- Mesurador de pH Crison, model micro pH 2001
- Inducció de Plasma Acoblat, Perkin-Elmer, Elan 6000

II. Metodologia

2.1 Aparellament i identificació dels animals

Després d'un període d'aclimatació de catorze dies, les rates mascle es van distribuir de forma aleatòria als vuit grups de tractament: 0 mg/kg/dia (control), 0 mg/kg/dia més estrès (control estrès), 10 mg/kg/dia, 10 mg/kg/dia més estrès, 20 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia més estrès, 40 mg/kg/dia i 40 mg/kg/dia més estrès.

Els animals es van exposar a AUD durant un període de tres mesos. Els grups sotmesos a estrès, durant el mateix període de temps, s'immobilitzaven durant 2h/dia. Després d'aquest període, els mascles es van aparellar amb femelles sense tractar (1:2), durant dues hores al matí (10:00-12:00).

A continuació s'examinava les femelles mitjançant un frotis vaginal, considerant la presència d'espermatozoides com a indicatiu de còpula i assignant aquest dia com a dia 0 de gestació.

El dia 14 de gestació se'ls hi va practicar una cesària a la meitat de les femelles gestants, per tal d'avaluar la toxicitat embriofetal. La resta de les femelles van dur la gestació a terme. A les cries que naixien se'ls hi va valorar el desenvolupament i l'aprenentatge.

D'altra banda, s'han dut a terme valoracions conductuals, avaluació dels paràmetres reproductors i dels òrgans diana del tractament en els mascles tractats.

2.2 Preparació i administració de l'urani

L'urani es va administrar, per via oral, en forma d'acetat d'uranil dihidratat (AUD). Es va dissoldre en aigua de l'aixeta, de manera que els animals rebien 0, 10, 20 i 40 mg/kg/dia. Aquestes dosis es corresponen a 0, 1/20, 1/10 i 1/5 de la DL₅₀ oral per a rates adultes (Domingo i cols., 1987).

Abans de dissoldre l'AUD en aigua es va calcular el que bevien els animals i es van fer les dissolucions en relació amb aquests càlculs. Les concentracions d'AUD s'ajustaven dos cops per setmana, en funció del pes corporal i la beguda que prenen els animals.

2.3 Estudis amb els mascles adults

2.3.1 Tests d'aprenentatge (valoració conductual)

- *Camp obert (Open field)*. Aquesta prova permet estudiar diferents paràmetres de l'activitat motora dels animals. Es valora la distància total recorreguda (activitat horitzontal) i el nombre d'aixecaments realitzats (activitat vertical) en períodes de temps determinats. 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 quinze minuts. En els nostres estudis registrem la distància recorreguda com a índex d'activitat horitzontal i el nombre d'aixecaments com a índex d'activitat vertical durant quinze minuts, que subdividim en períodes de cinc minuts per a la valoració de l'habitació.

- *Evitació passiva (Passive avoidance)*. Amb aquest test es pot valorar la memòria recent dels animals. El rosegador se situa en el compartiment clar o de sortida, i després d'un període variable (60 segons, en què considerem que hi ha habituació, o 30 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 a accedir al compartiment fosc es coneix com a 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 d'1 mA/3s. Transcorregudes 24 hores, se sotmet 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 a accedir al compartiment fosc, latència de record (T2) (Thorne i col·ls., 1987; Roozendaal i McGaugh, 1997; Colomina i col·ls., 2002). El període de latència és més gran en els animals que recorden 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.

- *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 són a certa distància d'aquest objectiu, però que guarden una relació espacial coneguda amb aquest (Morris, 1981). Sembla 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 bàsicament en una piscina on hi ha una plataforma submergida o d'escapament que permet que l'animal deixi de nedar quan hi arriba, però que no pot veure. En el protocol que es fa servir per a 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, les quals l'ajudaran a formar-se un mapa cognitiu que serà el que li permetrà localitzar la plataforma.

Per valorar l'aprenentatge, cada animal té cinc intents o *trials* cada dia durant tres dies consecutius. Al quart dia té un intent sense plataforma (també anomenat *trial probe*), en què valorem el temps que l'animal neda 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 a trobar la plataforma, la velocitat a què neden i la distància recorreguda en cada intent fins que la troben.

Cada trial dura un màxim de 60 segons. Si l'animal no troba la plataforma, se'l col·loca damunt després de cada trial durant 30 segons (perquè pugui situar-la en el seu mapa cognitiu respecte als altres estímuls). Si la troba, es comencen a comptar els 30 segons des del moment que l'animal hi puja. El temps intertrial és de 60 segons (60"màx TRIAL + 30" PLAT + 60" descans) (Nagahara i col·ls., 1995; Almaguer-Melián i col·ls., 1999).

Després del tractament i un cop avaluat el comportament, es van sacrificar els animals mitjançant l'administració de ketamina-xilazina. Es van extreure diferents òrgans (testicles, epidídim, ronyons i cervell) de tots els animals per dur a terme diferents estudis. Es van pesar i es van anotar els diferents pesos corporals.

D'altra banda, dels testicles i epidídim es van valorar diversos paràmetres reproductors. A banda d'aquests paràmetres, es va avaluar l'estat oxidatiu i el contingut d'urani dels testicles, ronyons i diferents fraccions del cervell.

2.3.2 Efectes sobre la reproducció

- *Valoració de la mobilitat de l'esperma*

En una placa de Petri preescalfada a 37° C, amb 5 ml de solució de Hank's, es va dipositar l'epidídim esquerre. Amb un bisturí es va seccionar la cauda i es va deixar incubat 10 minuts a 37° C en una estufa. Després de la incubació, 20 µl de la suspensió es van col·locar en un portaobjectes preescalfat a 37° C, i es va cobrir amb un cobreobjectes de 22x22 mm. Aquesta preparació es va observar al microscopi òptic a 40 x, on es van valorar un mínim de deu camps. De cada camp es van anotar els espermatozoides mòbils, els immòbils i els diferents graus de mobilitat. A partir d'aquestes dades es va calcular el percentatge de mobilitat de l'esperma (Llobet i col·ls., 1991, 1993).

- *Anàlisi morfològica de l'esperma*

Després de la valoració de la mobilitat de l'esperma, de la mateixa mostra es retira el cobreobjectes i es deixa assecat la mostra a temperatura ambient. Posteriorment es tenyeix la preparació amb panòptic ràpid (Gurr, 1971). Un cop sec el portaobjectes s'observa al microscopi a 40x per tal d'examinar la morfologia dels espermatozoides. La classificació morfològica es va realitzar d'acord amb estudis previs realitzats per Wyrobeck i Bruce (1975). A partir

d'aquesta classificació es va calcular el percentatge de formes anormals i el percentatge relatiu de cada anormalitat.

- *Avaluació de la producció d'esperma*

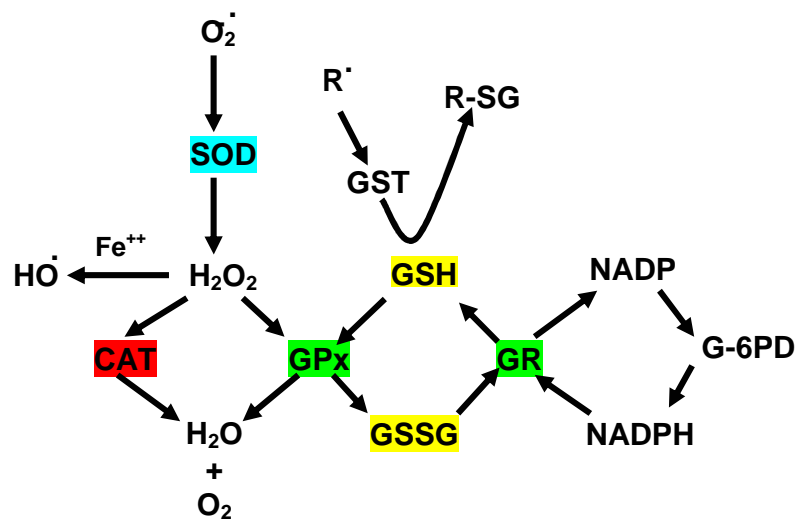
Un cop extrets els epidídim, es va prendre una fracció de l'epidídim dret i, després de pesar-la, immediatament es va congelar a -20° C fins al moment de la observació. Per tal d'avaluar la producció de l'esperma, es va descongelar la mostra a temperatura ambient i es va homogeneïtzar amb 0,5 ml de la solució de tritó mitjançant deu cops de l'homogeneïtzador manual. L'homogenat resultant es va diluir amb 4,5 ml de la mateixa solució i es va observar al microscopi mitjançant una cambra de Neubauer a 40x per tal de fer el recompte del nombre d'espermatozoides. Es van realitzar tres recomptes per a cada mostra.

D'una fracció del testicle dret es va retirar la túnica albugínia, i el parènquima testicular es va homogeneïtzar en 1 ml de la solució de tritó. Una alíquota d'aquesta suspensió es va tenyir amb la solució de Richardson i a continuació es va observar al microscopi mitjançant la cambra de Neubauer per tal de fer un recompte del nombre d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació (Llobet i col·ls., 1991, 1993).

2.3.3 Avaluació de la peroxidació lipídica i sistemes antioxidants

En primer lloc, per a l'estudi dels diferents paràmetres indicadors d'estrès oxidatiu, s'obté la fracció soluble dels diferents òrgans. En el cas del cervell, se separa còrtex, cerebel i hipocamp.

S'homogeneïtzen els diferents òrgans amb tampó fosfat sòdic 200mM pH 6.25, en una proporció 1/10 pes/volum. L'homogenat resultant se centrifuga a 105.000 g durant una hora a 4°C. La fracció soluble obtinguda, se congela a -20°C fins el moment de realitzar les determinacions.



- *Avaluació de la peroxidació lipídica*

La peroxidació dels lípids es determina per la formació de TBARS (substàncies que reaccionen amb TBA) segons el mètode de Buege i Aust (1978), però mesurat amb fluorescència en un espectrofluorímetre a 515 nm de longitud d'ona d'extinció i 548 nm de longitud d'ona d'emissió, segons descriuen Richard i col·laboradors (1992).

Es pren 1 ml de fracció soluble, prèviament diluïda, i es barreja amb 2 ml d'una solució TCA-TBA-HCl: àcid tricloracètic al 15%, àcid tiobarbitúric al 0,375% i àcid clorhídric 0,25 N. Aquesta barreja es posa 15 minuts en un bany a 100°C. Passat aquest temps es refreda amb gel. Després se centrifuga a 1.900 g durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant el passem a cubetes i es llegeix al fluorímetre.

Com a estàndard s'utilitza el bis-dietilacetal malonaldehid ($d=0,92$ Kg/l) en diferents concentracions. La recta que s'obté serveix per determinar la concentració de la mostra.

La peroxidació lipídica s'expressa com a pmols o nmols de TBARS formats per mg de proteïna.

- *Determinació de la concentració de glutatió reduït (GSH)*

Es mesura pel mètode d'Hissin i Hilf (1976).

El GSH reacciona amb l'O-phtalaldehid (OPT) a un pH de 8. Per la qual cosa, la fracció soluble prèviament precipitada amb àcid tricloroacètic es dilueix 1:10 amb tampó fosfat sòdic 100 mM pH 8, EDTA 5 mM. Es fa una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció: 100 µl de la fracció soluble diluïda amb 1,8 ml de tampó fosfat sòdic i 100 µl d'OPT. Es barreja tot i, després d'una incubació de 15 minuts a temperatura ambient, es llegeix al fluorímetre a una longitud d'ona de 350 nm d'extinció i una longitud d'ona de 420 nm d'emissió.

Els resultats es donen com a nmols de GSH/mg de proteïna.

- *Determinació de la concentració de glutatió oxidat (GSSG)*

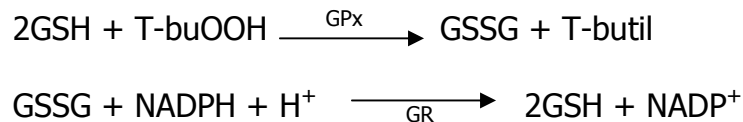
Es mesura amb el mateix mètode que l'apartat anterior (Hissin i Hilf, 1976).

El glutatió oxidat també reacciona amb l'OPT i dóna fluorescència però a pH 12. Per evitar que el GSH es transformi en GSSG, la fracció soluble s'incuba durant 25 minuts amb N-etil-maleïmida, que impedirà la oxidació. Passat el temps d'incubació, la fracció soluble es dilueix 1:10 amb tampó NaOH 0,1 N que aporta el pH d'interès. Ara la mostra es torna a diluir, 1:20, aquest cop a la cubeta, on s'afegeixen 100 µl d'OPT.

S'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i es llegeix la fluorescència sota les mateixes condicions descrites a l'apartat anterior.

Els resultats s'expressen com a nmols de GSSG/mg de proteïna.

- *Determinació de l'activitat enzimàtica de la glutatió peroxidasa (GPx)*



Es mesura segons el descrit per Wheeler i col·laboradors (1990). El fonament d'aquesta tècnica és mesurar la disminució de NADPH a 340 nm durant 2 minuts, produïda per l'acció de la glutatió reductasa, que transforma el GSSG produït per la GPx.

Es prenen 54 µl de la fracció soluble, prèviament diluïda, i es barregen amb 135 µl del reactiu de treball (3,7 ml tampó fosfat potàssic 100 mM EDTA 1 mM pH 7, 0,5 ml NADPH 2,25 mM, 0,1 ml de GR diluïda 1:2,5 en el tampó fosfat potàssic). Aquesta barreja s'incuba durant 5 minuts a 37°C. Passat aquest temps s'afegeixen 36 µl de T-butilhidroperòxid 15 mM prèviament diluït 1:2.

Les determinacions es realitzen a l'analitzador automàtic Cobas Mira, que llegirà l'absorbància a 340 nm a temps 0 i als 5 minuts.

El coeficient d'extinció molar del NADPH és de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Es calcula l'increment de NADPH/minut. Els resultats s'expressen com a mil·liunitats de GPx/mg de proteïna.

- *Determinació de l'activitat enzimàtica de la glutatió reductasa (GR)*

De la mateixa manera que en l'apartat anterior, es mesura segons el descrit per Wheeler i col·laboradors (1990). El fonament d'aquesta tècnica és mesurar la disminució de NADPH a 340 nm durant 10 minuts, conseqüència de l'acció de la GR, que transforma el GSSG en GSH. En aquest cas es veurà la formació del NADP^+ a partir del NADPH durant la reducció del GSSG.

Es prenen 40 μl de la fracció soluble, i es barregen amb 356 μl de tampó fosfat potàssic (0,25 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4) i amb 20 μl de NADPH. Les determinacions es realitzen amb l'analitzador automàtic Cobas Mira.

Els resultats s'expressen com a mil·liunitats de GR/mg de proteïna.

- *Determinació de la catalasa (CAT)*

Amb els 100 μl de fracció soluble, que s'havien guardat al congelador, es fa una dilució addicional amb tampó fosfat potàssic. El mètode de Cohen i col·laboradors és el que s'utilitza (1970).

En un volum final a la cubeta de quars de 3 ml s'ha barrejat el H_2O_2 19 mM (amb tampó fosfat potàssic 100 mM ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$) pH 7,5) amb 20 μl de la mostra diluïda. El que ens interessa és veure el grau de desaparició del peròxid d'hidrogen en els primers 30 segons. Per fer-ho s'utilitza l'espectrofotòmetre que llegeix a 240 nm.

Es calcula el decrement/minut i els resultats s'expressen en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteïna, mmols de H_2O_2 transformats.

- *Determinació de la superòxid dismutasa (SOD)*

L'activitat enzimàtica es mesura mitjançant el mètode de Misra i Fridovich (1972), basat en l'autooxidació de l'epinefrina.

Els superòxids formats oxiden l'epinefrina i formen l'adenocrom. Això es pot seguir espectrofotomètricament a 480 nm. La SOD transforma els superòxids fins a peròxid d'hidrogen i oxigen i així evita la formació d'adenocrom.

El primer pas és avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina. Per això es barregen 2,5 mil·lilitres del tampó $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 10,2 EDTA 0,1 mM amb 300 μl d'aigua bidestil·lada i 200 μl d'epinefrina 6mM en HCl 1mM. La lectura es fa cada 40 segons i durant 23 minuts a 30°C en l'espectrofotòmetre a 480 nm, com s'ha dit abans. A continuació es fan dilucions apropiades de la mostra per tal de trobar la concentració que inhibeix el 50% de la formació de l'adenocrom (I_{50}).

Les lectures es fan amb una barreja de 2,5 ml de tampó, 300 µl de les dilucions corresponents i 200 µl d'epinefrina, en les mateixes condicions d'espectrofotometria descrites anteriorment.

El resultat s'expressa en unitats/mg proteïna, on una unitat és la quantitat de mostra que inhibeix en un 50% la transformació de l'epinefrina en adenocrom a pH alcalí.

- *Determinació de la concentració de proteïnes*

La concentració de proteïnes es mesura mitjançant el reactiu de Bradford (Bradford, 1976). El mètode es basa en la formació d'un complex entre les proteïnes i el colorant Brilliant Blue G. Aquest complex fa que l'absorció màxima del reactiu passi de 465 a 595 nm. L'absorbància és proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra.

Es prenen 50 µl de la fracció soluble, prèviament diluïda, i es barregen amb 1,5 ml del reactiu de Bradford. Aquesta barreja s'incuba 5 minuts a temperatura ambient i es llegeix l'absorbància de la mostra a l'espectrofotòmetre a 595 nm.

Com a estàndard s'utilitza albúmina sèrica bovina (BSA) a diferents concentracions. La recta que s'obté serveix per determinar la concentració de la mostra.

Els resultats s'expressen com a mg proteïna/g de teixit.

2.3.4 Valoració anatomopatològica

Una fracció del testicle esquerre es va fixar en formaldehid durant dos dies i seguidament va ser inclosa en parafina. Es van realitzar seccions de 3 µm, que posteriorment van ser tenyides amb hematoxilina-eosina per tal de ser observades al microscopi. Es van observar els túbuls per estudiar l'espermatogènesi completa, i es van valorar atròfies difuses o focals en funció del nombre de túbuls afectats. Les atròfies es van classificar com a lleugeres, moderades o severes. Les cèl·lules de Sertoli es van classificar com a normals, atròfiques o amb vacuolització citoplasmàtica. També es va valorar l'existència de cèl·lules multinucleades al lumen tubular o entre cèl·lules espermiogèniques, així com la presència de canvis degenerats en les cèl·lules intersticials de Leydig (ex. atròfia nuclear o vacuolització citoplasmàtica).

El ronyó esquerre també va ser processat per tal de fer una valoració anatomopatològica, seguint el mateix procés descrit prèviament. En aquest cas s'ha avaluat la morfologia dels glomèruls (normals o anormals), túbuls (normals i si hi ha alteracions dir quines i en quin grau) i vasos (normals i si hi ha alteracions dir quines i en quin grau).

2.3.5 Anàlisi de la concentració d'urani en els testicles, ronyó i cervell

Es van processar mostres de testicles, ronyó i cervell per determinar la concentració d'urani per espectrofotometria atòmica d'inducció de plasma acoblat.

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 va agafar 0,5 g de teixit per a l'anàlisi. S'apuntava el pes de cada mostra i es col·locaven en tubs de vidre Pyrex, degudament identificats. Es posaven 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, es digeriria el contingut a 80° C, un temps variable (aproximadament 10 hores), fins que el teixit estava dissolt. A continuació, es pujava la temperatura fins a 135° C per facilitar l'evaporació, a fi de deixar aproximadament 0,5 ml de volum de mostra. A continuació, es diluïa fins a un volum total de 10 ml amb aigua bidestil·lada (MQ).

Aquestes mostres s'emmagatzemaven a -20° C fins al moment de la seva lectura (Sánchez i col·ls., 1997; Gómez i col·ls., 1998; Sánchez i col·ls., 2001).

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.

2.4 Estudis amb les cries

2.4.1 Toxicitat embríofetal

El dia 14 de gestació, les rates destinades a l'estudi de la toxicitat embríofetal es van pesar i van ser sacrificades mitjançant ketamina-xilazina (80 mg/kg-10 mg/kg). Es van realitzar cesàries i es van extreure els úters gràvids per avaluar els següents paràmetres:

- Pes de l'úter gràvid (g)
- Canvi del pes corregit del cos (pes corregit del cos – pes en el primer dia de gestació) (g)
- Nombre d'implantacions totals
- Nombre de reabsorcions
- Percentatge de pèrdues postimplantació
- Nombre de fetus vius i morts

2.4.2 Valoració del desenvolupament

Les cries que naixien de forma espontània (el dia 21 de gestació) eren avaluades al primer dia, després del naixement. Vam controlar les següents variables:

- *Nombre de cries que van néixer vives i mortes per ventrada*
- *Nombre de cries vives i mortes (cada dia).*

Amb aquests paràmetres es va calcular l'índex de viabilitat (nombre de cries vives al dia 4/nombre de cries vives al naixement) i l'índex de lactància (nombre de cries vives al dia 21/nombre 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 quatre mascles i quatre femelles. A aquestes vuit cries es va seguir controlant el pes els dies 4, 12 i 21. A banda del control del pes, es va valorar el desenvolupament físic i funcional durant el període postnatal, i es van controlar alguns paràmetres ja descrits per Fox el 1965 i ampliat per altres autors (Altman i Sudarshan, 1975; Suter i Schön, 1985; Draski i col·ls., 1989; Rivera i col·ls., 1990; Hass i col·ls., 1995; Kishi i col·ls., 1995; Bignami, 1996; Colomina i col·ls., 1999; Torrente i col·ls., 2002).

Els paràmetres del desenvolupament físic que van ser avaluats són els següents:

- *Desplegament del pavelló auditiu*: es va controlar des del dia 2 postnatal fins al dia que tots els individus de la ventrada tenien els pavellons auditius desplegats. Es va calcular la mitjana del dia de desplegament en el grup i es va comparar amb les mitjanes dels altres grups.
- *Erupció dels incisius*. Es va controlar des del dia 5 postnatal fins al dia que en tots els individus de la ventrada s'observaven dos ovals blancs sobre la geniva. Es va calcular la mitjana del dia d'erupció dels incisius del grup, i es va comparar amb les mitjanes dels grups de tractament.
- *Obertura d'ulls*. Es van examinar les cries des del dia 13 postnatal fins al dia que tots els animals de la ventrada tenien els ulls oberts. Es va calcular la mitjana del dia d'obertura d'ulls en el grup, i es va comparar amb la resta de grups de tractament.
- *Reflex d'adreçament o Surface righting (girar-se)*. Aquesta prova consisteix a col·locar l'animal en posició dorsal sobre una superfície dura i plana. Es controla el temps que tarda (en segons) a girar-se. Aquest test es va aplicar a partir del dia 4 postnatal fins al dia 6. Es van calcular les mitjanes diàries de cada grup i es van comparar amb els altres grups de tractament.

- *Geotaxi* (girar-se mirant cap amunt en una superfície inclinada). La prova consistia a col·locar l'animal en una superfície amb una inclinació de 30° mirant avall. Es calcula el temps que tarda a girar-se mirant cap amunt. Aquest test es va aplicar dels dies 7 a 9 postnatal. Es va calcular la mitjana per dia de cada grup i es va comparar amb la resta de grups de tractament.
- *Força a les extremitats anteriors*. Aquesta prova es va passar dels dies 10 a 13 postnatal. El dia 10 postnatal es va agafar a l'atzar un animal de la ventrada de cada sexe.

El test consistia a col·locar l'animal en una base plana i, un cop agafat a un triangle metàl·lic, se l'estirava per la cua cap enrere fins que l'animal es deixava. Es repetia 3 vegades i es prenia el valor més alt. Es va calcular la mitjana de cadascun dels dies per grup de tractament i es van fer comparacions de mitjanes entre grups de tractament (Torrente i col·ls., 2002).

2.4.3 Tests d'aprenentatge (valoració conductual)

Un cop finalitzat el període d'alletament, el dia 28 postnatal es van sotmetre els animals a diferents proves conductuals:

- Evitació passiva, on es va valorar l'aprenentatge dels animals i el record, seguint el mateix protocol que amb els mascles adults (2.3.1). En aquest cas, però, la descàrrega que es produeix quan es tanca la porta és de 0,5 mA/3s (Colomina i col·ls., 2002; Torrente i col·ls., 2005).
- Laberint d'aigua, on es va valorar l'aprenentatge espacial dels animals. La prova va seguir el mateix protocol que amb els adults (2.3.1).

2.5 Tractament estadístic de les dades

Per l'anàlisi estadística de les dades es va utilitzar el paquet informàtic estadístic SPSS per a PC, versió 11.0.

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 van calcular, en primer lloc, els descriptius de totes les variables (mitjanes i desviacions estàndard). Quan les dades estudiades seguien una distribució normal, es va aplicar el test de Levene per avaluar si existia homogeneïtat en la variància.

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 una ANOVA (anàlisi de variància). En els casos en què l'ANOVA donava diferències significatives entre els grups, es feien proves de comparacions múltiples entre grups o proves *post-hoc*: Tuckey.

Quan el test de Levene era significatiu, és a dir, no es complia la condició d'homogeneïtat de la variància, es realitzaven tests no paramètrics: Kruskal-Wallis. En els casos en què donava diferències significatives entre els grups, es feien comparacions múltiples mitjançant el test no paramètric de la U de Mann-Whitney.

També es van realitzar correlacions bivariades entre diferents paràmetres. Les correlacions mesuren la relació entre variables, el test ens dóna el coeficient de correlació de Pearson que mesura l'associació lineal entre dues variables. La prova de significació ha estat bilateral ja que no es coneixia prèviament la direcció de l'associació entre variables.

DISCUSSIÓ

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

MATERIALS I MÈTODES

RESULTATS

HIPÒTESI I OBJECTIUS