



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



Avaluació de la toxicitat reproductiva de rates mascle a través d'exposició materna al dienestrol

TREBALL DE FI DE GRAU

Grau de Biotecnologia

Oscar Alfageme Abelló

Tutora: Mercedes Gómez Arnaiz

Tarragona

Juny, 2018

Agraïments

M'agradaria expressar el meu profund agraïment a totes les persones que han fet possible la realització d'aquest Treball de Fi de Grau.

En primer lloc, a la Mercedes Gómez per haver-me donat l'oportunitat de treballar en aquest projecte quan més ho necessitava, per haver-me donat tot el suport i per tutoritzar-me aquest treball.

En especial, a l'Elga Schreiber, per haver dedicat tant de temps i esforç en el disseny del meu treball experimental, i per supervisar-me i donar-me suficient autonomia.

A la Neus, l'Anabel, l'Elena i a la resta de treballadors dels laboratoris de Toxicologia i Bioquímica; per haver-me fet sentir tan a gust durant la meva estada al laboratori, i per resoldre'm els dubtes que em sorgien.

Finalment agrair a la meva família i als meus amics, que m'han donat molt de suport i ànims per a concloure aquesta etapa formativa.

Índex

Agraïments.....	II
Índex d'abreviatures.....	IV
Dades del centre.....	V
Resum.....	VI
1. Introducció	7
1.1. Sistema reproductiu masculí	7
1.1.1. Testicles.....	7
1.1.2. Conducte eferent i epidídim	9
1.1.3. Òrgans sexuals accessoris: Vesícula seminal i pròstata	9
1.2. Sistema endocrí.....	9
1.2.1. Disruptors endocrins	11
1.3. Dietilestilbestrol (DES) i dienestrol (DIES).....	12
1.3.1. Metabòlits del dietilestilbestrol	13
1.3.2. Estat actual del dienestrol.....	14
1.3.3. Dienestrol en el medi ambient	15
2. Hipòtesi i objectius	16
3. Metodologia.....	17
3.1. Compost químic	17
3.2. Animals i disseny experimental	17
3.3. Paràmetres espermàtics	18
3.3.1. Recompte d'espermatozoides i espermàtides resistents	18
3.3.2. Mobilitat de l'esperma	20
3.3.3. Viabilitat i morfologia	20
3.4. Histopatologia	21
3.5. Anàlisis bioquímiques	22
3.6. Estadística.....	22
4. Resultats	23
4.1. Paràmetres espermàtics	23
4.1.1. Recompte d'espermàtides i espermatozoides.....	23
4.1.2. Mobilitat, morfologia i viabilitat	24
4.2. Paràmetres histopatològics	26
4.1. Anàlisis bioquímiques	29
5. Discussió.....	31
6. Conclusions	33
7. Limitacions de l'estudi i perspectives de futur.....	33
8. Bibliografia	34
9. Autoavaluació.....	37

Índex d'abreviatures

ALT	Alanina transaminasa
AST	Aspartat transaminasa
CDE	Compost Disruptor Endocrí
COL	Colesterol
DE	Desviació estàndard
DES	Dietilestilbestrol
DG	Dia de gestació
DIES	Dienestrol
DPP	Dia de postpart
EI	Espermatozoide immòbil
EMNP	Espermatozoide mòbil no-progressiu
EMP	Espermatozoide mòbil progressiu
FA	Fosfatasa alcalina
FSH	Hormona estimuladora de fol·licle
GnRH	Hormona alliberadora de gonadotropina
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
HPG	Eix hipotalàmic-pituïtari-gonadal
HPP	Hidroxipropifenona
LH	Hormona luteïnitzant
PT	Proteïnes totals
REα/β	Receptor d'estrògens alfa/beta

Dades del centre

Durant el període de pràctiques que m'han permès desenvolupar el Treball de Fi de Grau he tingut l'oportunitat de formar part del grup d'investigació TecnATox (Centre de Tecnologia en l'àmbit Alimentari, Ambiental i Toxicològic), dirigit pel Dr. Josep Lluís Domingo. TecnATox és un centre adscrit des del 2008 a la Xarxa IT (Innovació i Tecnologia) d'ACC1Ó amb la missió de dur a terme una recerca i desenvolupament en l'àrea de protecció ambiental i alimentària a nivell europeu. Per tant, es centra en el camp dels contaminants mediambientals i alimentaris, i dels possibles riscos i/o beneficis sobre la salut de la població i l'ecosistema. El centre neix a partir de l'experiència del Laboratori de Toxicologia i Salut Ambiental (LTSM) de la URV, creat el 1985 i està integrat per tres àrees: l'Ambiental i d'Avaluació de Risc, l'Alimentària i l'àrea de Toxicologia (on hi vaig formar part), dirigit per la Dra. Mercedes Gómez ([TecnATox, 2018](#)). La meua activitat va estar ubicada als laboratoris de toxicologia situats a les instal·lacions de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la URV (Reus).

El projecte que actualment s'està portant a terme és un projecte europeu anomenat "*European Test and Risk assessment Strategies for Mixtures*" (EuroMix)¹, finançat públicament amb gairebé 8 milions d'euros. És un projecte que integra un gran nombre de institucions de diferents països, la majoria d'Europa, sent la URV l'única institució espanyola que participa. L'objectiu d'EuroMix és la de fer una avaluació de l'exposició a diferents compostos químics relacionats amb l'alimentació. A diferència d'altres projectes, aquesta avaluació del risc no es fa únicament d'un compost on es compta únicament una sola via d'exposició, sinó que s'adreçarà l'exposició de múltiples substàncies i el risc que comporta aquesta combinació de tòxics. Per tant, és un projecte complex que requereix de diferents disciplines (modelització *in silico*, assajos bioquímics, assajos *in vitro* i assajos *in vivo*) per a poder abordar els objectius que es plantegen.

La funció de la URV és la de testar l'efecte de 3 disruptors endocrins: dienestrol, flutamida i linuron en rates gestants, així com avaluar diferents paràmetres (feminitzants) en el desenvolupament de les cries. Els efectes d'aquests disruptors s'avaluaran tant a nivell individual com en combinacions binàries. Un d'aquests compostos (dienestrol) s'utilitzarà per a un projecte paral·lel, en el que s'avaluaran els seus efectes sobre la toxicitat reproductiva en rates mascle joves. A partir d'aquest projecte realitzaré el Treball de Fi de Grau.

¹ L'identificador d'aquest projecte és el 6333172 (CORDIS - Comissió Europea), amb una durada prevista del 15/05/2015 fins al 14/05/2019

Resum

El dienestrol és un compost abortiu que va ser utilitzat per tractar símptomes de la menopausa i com a anabolitzant en bestiar. També és un metabòlit del dietilestilbestrol, un derivat de l'estilbè amb activitat estrogènica comparable a la de l'estrogen natural, l'estradiol 17- β . El dienestrol s'ha classificat com a disruptor endocrí, alterant funcions de l'organisme i causant possibles efectes perjudicials en la descendència. Actualment s'han trobat traces d'aquest compost en aliments làctics i en el medi ambient. L'objectiu d'aquest estudi és determinar si el dienestrol afecta a la reproducció masculina degut a la seva activitat agonista d'estrògens. S'han utilitzat rates femella Sprague-Dawley tractades diàriament per *gavage* a partir del 6è dia de gestació fins al 21è dia de postpart. Els cadells de les rates tractades es van sacrificar als 90 dies i es van dividir en quatre grups, segons la dosi administrada (1.5, 3 i 6.25 $\mu\text{g/kg pes/dia}$) i un control. S'ha realitzat un recompte d'espermatozoides i espermàtides, i avaluat la mobilitat, viabilitat i morfologia de l'esperma. També s'ha examinat la histopatologia de testicle i epidídim i analitzat paràmetres bioquímics del sèrum. Els resultats indiquen que hi ha una disminució significativa en el recompte i en la viabilitat i mobilitat dels espermatozoides després de l'exposició materna al dienestrol. També s'observen afectacions histopatològiques moderades en els túbuls seminífers del testicle, i apoptosi en l'epiteli del conducte epididimari. A més, hi ha una disminució significativa dels nivells de proteïnes totals i de l'activitat dels enzims fosfatasa alcalina i alanina transaminasa i un augment significatiu de glucosa i HDL. Aquests resultats indiquen que l'exposició al dienestrol en rates gestants té efectes tòxics sobre la capacitat reproductiva en rates mascle joves de la descendència.

Paraules clau: dienestrol, disruptor endocrí, toxicitat reproductiva, rates mascles, exposició materna

Abstract

Dienestrol is an abortive compound that was used to treat menopausal symptoms and as an anabolic in cattle. It is also a diethylstilbestrol metabolite, which is a stilbene derivative with an estrogenic activity comparable to that of the natural estrogen, estradiol-17 β . Dienestrol has been classified as an endocrine disruptor, altering the functions of the organism and causing possible harmful effects on offspring. At present, traces of this compound have been found in dairy foods and in the environment. The objective of this study is to determine if dienestrol affects men's reproduction due to its estrogen agonistic activity. Female Sprague-Dawley rats were treated daily with gavage from gestational day 6 until postnatal day 21. Pups of the treated rats were sacrificed at 90 days and were divided into different groups according to the administered dose (1.5, 3 and 6.25 $\text{kg/body weight/day}$). Sperm and spermatid count, sperm motility, viability and morphology were examined. Histopathology of the testicle and epididymis was evaluated, and serum biochemical parameters were analyzed. The results indicate that there is a significant decrease in the count, viability and mobility of sperm after maternal exposure to dienestrol. Moderate histopathological affectations were observed in the seminiferous tubules in the testicle sections, and apoptosis of the epididymal duct epithelium was also seen. In addition, there is a significant decrease in the levels of total proteins and in the activity of alkaline phosphatase and alanine transaminase enzymes, and a significant increase in glucose and HDL. These results indicate that exposure to dienestrol in pregnant rats has toxic effects on reproductive capacity in the young male offspring.

Keywords: dienestrol, endocrine disruptor, reproductive toxicity, male rats, maternal exposure

1. Introducció

Cada dia ens exposem a gran quantitat de productes químics a través de diferents vies: per inhalació, contacte dèrmic, intramuscular, oral (a través de la dieta), etc. Aquests productes químics poden tenir un efecte tòxic, pel que és necessària una avaluació dels riscos que comporta per controlar possibles efectes adversos en la salut humana.

Una substància es considera tòxica quan pot produir efectes nocius o perjudicials a un organisme. Els efectes tòxics poden manifestar-se en poques hores, o pot tardar diversos mesos en aparèixer. Per tot això es necessiten estudis, tan en models *in vivo* com *in vitro*, on es descriuen quins són els efectes tòxics que succeeixen i quins són els mecanismes d'acció involucrats. Aquests efectes adversos poden produir-se en diferents teixits de l'organisme, sent les afectacions relacionades amb el sistema reproductiu una de les més greus perquè poden afectar a la descendència. Generalment, aquests efectes es refereixen a canvis en la fertilitat i alteracions en l'espermatogènesi o ovogènesi. L'exposició prenatal a agents tòxics pot estar associada a problemes en el naixement, a canvis en el desenvolupament dels nounats, sent els efectes més greus els que resulten en malformacions i retard en el creixement o inclús en avortaments espontanis. Això és degut a que la gestació és un període crític en el qual un organisme s'està formant, i on encara tenen immadures moltes vies, com les d'eliminació dels tòxics ([Linares Vidal, 2006](#); [Ünüvar i Büyükgebiz, 2012](#)).

Molts d'aquests compostos químics tòxics als que estem exposats són disruptors endocrins, és a dir, químics que interfereixen en el sistema endocrí del cos produint efectes adversos a diferents nivells: reproductiu, neurològic, immunitari i en el desenvolupament, entre d'altres.

1.1. [Sistema reproductiu masculí](#)

El sistema reproductiu masculí està format per testicles, epidídim i conductes eferents, pròstata i vesícula seminal.

1.1.1. Testicles

Els testicles tenen dues funcions principals, produir hormones per mantenir i regular les funcions mediades per andrògens a través del cos i realitzar l'espermatogènesi. L'espermatogènesi succeeix als túbuls seminífers i és un procés en el que els espermatogonis (cèl·lules mare

diploides) donen lloc als espermatozoides (cèl·lules diferenciades haploides). Als túbuls seminífers del testicle, després d'una sèrie de divisions mitòtiques de l'espermatogoni es produeix l'espermatòcit, el qual pateix un llarg procés de meiosi fins a convertir-se en espermàtida. Aquest procés de diferenciació morfològica fins a l'espermàtida està dividida en 19 etapes ([Figura 1](#)).

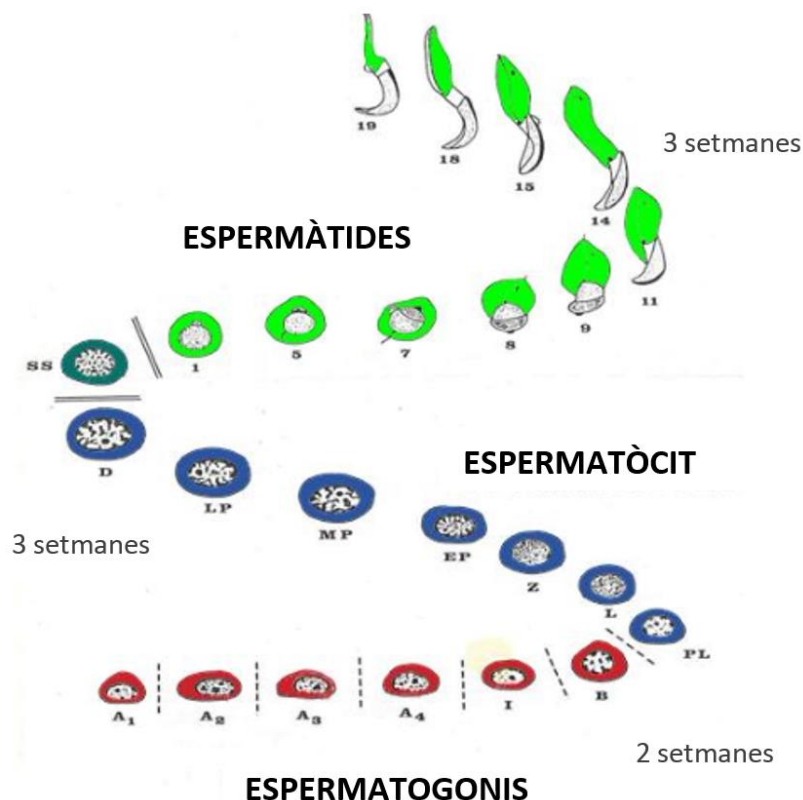


Figura 1 | Etapes del procés d'espermatogènesi des dels espermatogonis fins a la formació d'espermàtides ([OECD, 2008](#))

L'altra funció principal dels testicles és la producció d'un dels andrògens més importants, la testosterona, un esteroide produït en les cèl·lules de Leydig que té efectes intratesticulars (en l'espermatogènesi) i també efectes perifèrics (en altres òrgans com múscul, os, pell, etc). Tot i que la testosterona també és sintetitzada en altres teixits perifèrics, la concentració d'aquesta en els testicles és molt major que en el sistema circulatori (fins a 100 vegades més). La testosterona no és emmagatzemada per les cèl·lules de Leydig, sinó que es secreta als fluids intersticials. A partir d'aquí pot ser absorbida per les cèl·lules de Sertoli i unir-se al receptor d'andrògens, fet que provocarà que la cèl·lula de Sertoli secreti més testosterona i sigui transportada a través dels tubs seminífers cap a l'epidídim. També pot difondre cap als capil·lars

intersticials i unir-se a una albúmina pel transport perifèric, on té altres efectes en tots els teixits de l'organisme (OECD, 2008; Kumar, et al., 2018)

La funció principal de la testosterona és la del manteniment de l'espermatogènesi, concretament en regular l'alliberament d'espermàtides des de la cèl·lula de Sertoli (espermiació) i permetre el desenvolupament dels altres estadis de l'espermatogènesi (OECD, 2008).

1.1.2. Conducte eferent i epidídim

Les funcions principals dels conductes eferents i l'epidídim són la reabsorció del fluid dels tubs seminífers i modificació, maduració i emmagatzematge del esperma. Quan els espermatozoides s'alliberen dels testicles no són ni mòbils ni capaços de fecundar un oòcit. Quan arriben a la cua de l'epidídim (*cauda*) ja han adquirit aquesta mobilitat i capacitat de fertilitzar, propietats conferides per secrecions de les cèl·lules epitelials (OECD, 2008).

1.1.3. Òrgans sexuals accessoris: Vesícula seminal i pròstata

Estan localitzats en la ruta de la uretra, ja que transfereixen l'esperma dels vasos deferents cap a l'exterior a través del penis. La pròstata secreta un fluid transparent (líquid prostàtic) a la uretra, mentre que la vesícula seminal secreta un líquid viscos groguenc (líquid seminal). Aquests fluids tenen la funció de transportar l'esperma, neutralitzar l'ambient àcid del tracte vaginal i proporcionen substrats metabòlics per a l'esperma. Constitueixen el 65-90% de l'ejaculat (OECD, 2008).

1.2. Sistema endocrí

El sistema endocrí és un dels principals sistemes de control homeostàtic que té l'objectiu de mantenir unes funcions normals en el desenvolupament en un entorn de canvi constant. Funciona conjuntament amb el sistema nerviós, responsable de les respostes ràpides i immediates. El sistema endocrí està conformat per aproximadament 30 glàndules que tendeixen a actuar d'una forma més lenta i prolongada, regulant processos com el cicle reproductiu femení, creixement ossi, etc.

L'eix hipotalàmic-pituïtari-gonadal és un sistema de tres glàndules que controla la funció reproductora. Concretament, l'hormona alliberadora de gonadotropina (*GnRH*) s'allibera de l'hipotàlem i viatja fins a la glàndula pituïtària. Aquesta estimula l'alliberament de hormona

estimuladora de fol·licle (*FSH*) i hormona luteïnitzant (*LH*). La *FSH* actua en les cèl·lules de Sertoli modulant l'espermatogènesi, mentre que la *LH* actua en les cèl·lules de Leydig estimulants la biosíntesi de testosterona (*T*). Hi ha una retroalimentació negativa (*feedback negatiu*) per part de la testosterona i la inhibina secretada per les cèl·lules de Sertoli que fa disminuir la producció de *GnRH* de l'hipotàlem i també de *FSH* i *LH* de la glàndula pituïtària. A més, algunes cèl·lules dels testicles es regulen mútuament amb mecanismes paracrins (secreció de pèptids i factors de creixement) que proporcionen un control local de la funció cel·lular entre cèl·lules de Sertoli (*SC*), cèl·lules germinals (*GC*), cèl·lules mieloides peritubulars (*M*), cèl·lules de Leydig (*LC*) i cèl·lules de l'endoteli dels vasos sanguinis (*BV*). (Figura 1) (OECD, 2008).

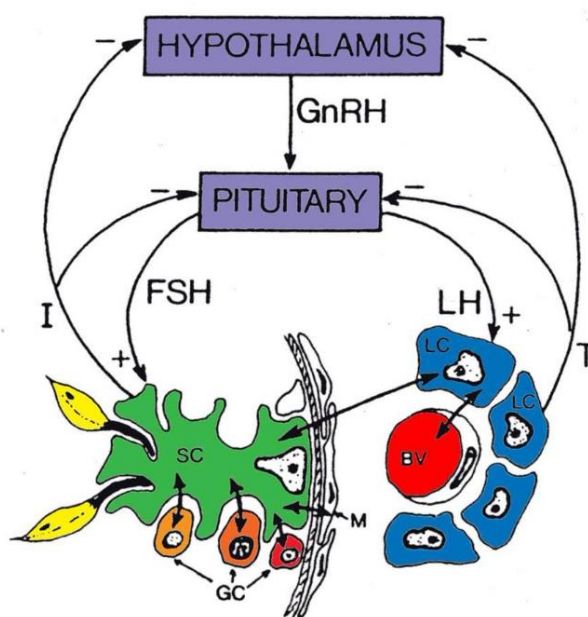


Figura 2 | Diagrama del eix hipotalàmic-pituitari-gonadal en que es representen les interaccions entre les diferents cèl·lules i glàndules (OECD, 2008)

Una altra hormona involucrada en el desenvolupament de l'organisme és l'estradiol, una hormona femenina que s'uneix als receptors d'estrògens α i β (RE α i RE β) d'algunes cèl·lules, activant la transcripció gènica. Té múltiples funcions en la reproducció femenina, relacionades amb el desenvolupament dels òrgans reproductors femenins, regular el cicle menstrual (induint la ovulació a través de l'alliberament de *LH*) i els seus nivells s'augmenten durant l'embaràs (Simpson i Santen, 2015). A més, es sospita que **alts nivells d'estradiol 17 β durant el tercer dia d'embaràs estan relacionats amb avortaments espontanis** (Trout i Seifer, 2000). En mascles,

l'estradiol es produeix en les cèl·lules de Leydig per acció de l'aromatasa². S'ha demostrat que uns nivells elevats d'estrògens augmenten la incidència de disfunció erèctil, i una proporció anormal de testosterona i estrògens està associat amb uns paràmetres seminals baixos (Schulster, et al., 2016).

1.2.1. Disruptors endocrins

Quan hi ha una exposició a productes químics, fàrmacs, o factors d'estrès, aquest equilibri hormonal es pot veure afectat i tenir greus conseqüències sobre l'organisme (Marty, et al., 2011). Quan aquestes substàncies tenen efectes sobre el cos s'anomenen disruptors endocrins (*CDE compostos disruptors endocrins*) i poden ser absorbides pel cos humà de diverses formes: per consum oral d'aigua o menjar, per contacte i/o inhalació, per via intravenosa i **per transferència des de la placenta i la llet materna** (Kabir, et al., 2015). Els mecanismes pels quals els disruptors endocrins poden interrompre el sistema endocrí i alterar les funcions hormonals són els següents (Kabir, et al., 2015):

- Imitar hormones naturals del cos (**agonista**) com els estrògens, els andrògens i hormones de la tiroides, que poden produir una sobre-estimulació. En aquesta categoria es troben els disruptors estrogènics i androgènics.
- Actuar com **antagonistes**, unint-se a receptors d'hormones endògenes impedit la unió d'aquestes hormones i la seva posterior senyal. En aquesta categoria es troben els anti-estrògens i anti-andrògens.

S'ha demostrat que l'exposició de disruptors endocrins durant l'embaràs ha afectat a la salut de generacions posteriors (WHO, 2012). Tot i conèixer els mecanismes d'actuació dels disruptors endocrins en sistemes biològics, no es pot dir que un CDE està implicat en una malaltia en concret, ja que hi ha moltes variables que hi intervenen, com els temps d'exposició, les diferències individuals en el metabolisme i la composició corporal (persistència i degradació del CDE), polimorfismes genètics, etc. Els efectes nocius associats als disruptors endocrins tenen a veure amb afectació al sistema reproductiu, pròstata, fetge, pulmó, fetge, tiroides, metabolisme i amb l'obesitat (Polyzos, et al., 2012).

² Aromatasa: complex enzimàtic que catalitza la transformació d'andrògens a estrògens (p. ex. testosterona → estradiol-17β)

En el sistema reproductiu humà, se sap que els estrògens i els andrògens intervenen en la diferenciació sexual masculina, mentre que en la femenina és pràcticament independent d'aquests dos. Per tant, és d'esperar que els CDEs puguin produir desordres diferents en homes que en dones ([Diamanti-Kandarakis, et al., 2009](#)):

- Dones: disminució de la edat de pubertat, insuficiència ovàrica prematura, irregularitats en el cicle menstrual i síndrome de l'ovari poliquístic.
- Homes: anomalies en l'espermatozoide, hipospadias, criptorquidisme i problemes de fertilitat.

1.3. [Dietilestilbestrol \(DES\) i dienestrol \(DIES\)](#)

El dietilestilbestrol (DES) és un derivat de l'estilbè amb capacitat estrogènica comparable a la de l'estradiol-17 β , l'estrogen natural. Va ser sintetitzat per primer cop el 1938 amb l'objectiu de trobar un estrogen econòmic i efectiu per via oral. Com el DES complia amb aquests objectius, va entrar en ús clínic a finals de l'any 1938, a Estats Units i Europa, en casos de malalties per deficiències d'estrògens. El 1948, es va descobrir que podria tenir un **ús en la prevenció de avortaments espontanis** —fet que va ser durament qüestionat ([Ferguson, 1953](#))—, estimant-se el tractament de més de 500.000 dones embarassades amb DES als Estats Units, i afectant entre 5 i 10 milions de persones en total ([Metzler i Fischer, 1981](#); [Giusti, et al., 1995](#)). L'any 1971 va sorgir una gran preocupació degut a un possible risc per la salut, ja que es va observar que hi havia una possible associació del DES amb una forma rara de càncer vaginal i cervical (adenocarcinoma de cèl·lules clares d'ovari, vist en dones d'edat avançada) en filles de dones tractades amb DES durant l'embaràs, fet que es va acabar confirmant al llarg de diversos estudis ([Greenwald, et al., 1971](#); [Herbst, et al., 1971](#)). Aquestes anormalitats en el tracte genital semblaven ocórrer amb major freqüència en les anomenades “filles del DES”, però en la descendència masculina també es van veure efectes teratogènics, com quists epididimaris, testiculars, anormalitats de l'esperma i criptorquidisme. **Això va a portar a la prohibició del DES** com a medicament receptat per a dones amb embaràs d'alt risc el 1971 als Estats Units i el 1978 a Europa ([Giusti, et al., 1995](#)). Arran d'això es van impulsar una sèrie d'estudis de cohort³ sent el més important el “*Diethylstilbestrol Adenosis Project*” (DESAD), iniciat el 1974 i que pretenia

³ Estudi de cohort: Tipus de recerca que recluta un grup particular de persones que presenten certes característiques comunes i les observa durant un període de temps determinat

comparar els efectes del DES a llarg termini entre un grup de filles del DES amb un grup de dones no exposades, centrant-se en la forma de càncer que les caracteritzava. Aquest monitoreig va evidenciar encara més les anormalitats que, tant les filles i els fills de dones exposades amb DES durant l'embaràs, patien anys després. A més, es va detectar un risc 3 vegades major a patir càncer de mama a partir dels 40 anys per les filles del DES, mentre que les mares tractades amb DES mai van desenvolupar l'adenocarcinoma vaginal i només tenien una lleugera major probabilitat de desenvolupar càncer de mama. També es va observar que alguns efectes es seguien transmetent a generacions posteriors (*néts i nétes del DES*) (Fénichel, et al., 2015).

Curiosament, el DES va guanyar molta popularitat degut a **l'eficàcia com anticonceptiu postcoital**, a partir d'un estudi en el que s'havien tractat a 1.000 dones que havien mantingut relacions sexuals sense profilaxis, sense que es produís cap embaràs i cap efecte secundari advers a curt termini (Kuchera, 1971). També en alguns casos encara s'utilitza com a **teràpia contra el càncer de pròstata** resistent a la castració (CPRC), una forma agressiva del càncer de pròstata. El mecanisme d'acció del DES sobre el CPRC és el de la inhibició per retroalimentació (*feedback*) de l'eix hipotàlamic-pituitari-gonadal (HPG), reduint els nivells de testosterona que estimulen la progressió del càncer (Turo, et al., 2014).

A part de l'ús clínic, el DES va ser **àmpliament utilitzat en el sector agrícola**, ja que el 1943 es va demostrar que el DES tenia un efecte engreixant en pollastres, però el seu ús es va detenir el 1959 quan es va detectar residus de DES en el fetge dels pollastres. Tot i això, el seu ús es va seguir permetent en bestiar boví i oví, on el DES **promovia el creixement de l'animal**, fins el 1979, any en què es va trobar que hi havia contaminació transplacentària, i va ser retirat de l'ús agrícola. Aquesta prohibició va significar una important disminució de la presència del DES al medi ambient, després de que s'estimés que en la dècada del 1970 el 80% del bestiar boví criat als Estats Units hagués rebut DES —més de 27.000 kg— administrats per alimentació (Metzler i Fischer, 1981).

1.3.1. Metabòlits del dietilestilbestrol

L'interès per conèixer el metabolisme del DES va sorgir amb l'esperança de que donés una pista de perquè aquest estrogen sintètic pogués ser més efectiu que els estrògens naturals després d'una administració oral, i per entendre quins eren els mecanismes subjacents dels efectes nocius del DES.

Es va trobar, a través de diferents estudis, que el DES té diverses rutes en el seu metabolisme oxidatiu (Figura 3). Es va concloure a través d'anàlisis d'orina i bilis que hi ha tres possibles rutes en les que el DES es pot oxidar:

- Hidroxilació de l'anell aromàtic del DES conduint al 3'-hidroxi-DES, i posteriorment al 3'-methoxy-DES.
- Escissió del DES conduint a 4'-hidroxipropifenona (HPP)
- Deshidrogenació del DES an Z,Z-dienestrol (Z,Z-DIES) i en menor mesura E,E-dienestrol (E,E-DIES)

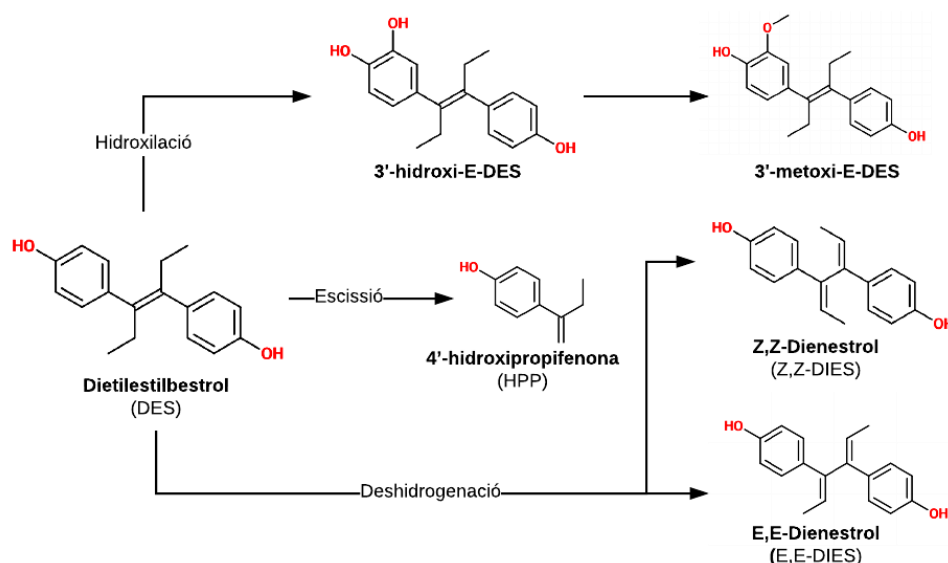


Figura 3 | Rutes metabòliques principals del dietilestilbestrol (DES) fins als diferents metabòlits finals. Adaptat de Metzler i Fischer, 1981

El dienestrol té tres isòmers diferents, el Z,Z-DIES, el E,E-DIES i el E,Z-DIES. L'isòmer que es troba en major quantitat després de metabolitzar el DES és el Z,Z-DIES. Tot i això, també es troben però en menor quantitat el E,Z-DIES i el E,E-DIES. En quant a la activitat estrogènica, el metabòlit majoritari (Z,Z-DIES) no té estrogenicitat (Inano, et al., 1993), mentre que l'estereoisòmer E,E-DIES és 400 vegades més potent pel receptor d'estrògens RE β i 200 vegades més potent pel receptor RE α que l'estrogen natural E2. A més, el E,E-DIES és més potent que el DES pel receptor RE β , tot i no ser-ho pel RE α (Kuiper, et al., 1997).

1.3.2. Estat actual del dienestrol

En el curs natural de la vida de les dones, aquestes experimenten una disminució de la producció d'estrògens, entre les edats 45 i 55. Quan això passa, moltes dones poden desenvolupar símptomes típics: episodis de calor intensa, així com canvis en la vagina (vaginitis atrofica) que

poden resultar molt incòmodes. El **dienestrol es va fer servir** per a tractar aquest símptoma de la menopausa, aplicat **com a crema vaginal**. Actualment no té cap utilitat clínica, tot i que en alguns països no està retirat del mercat ([Universidad de Navarra, sense data](#)).

Segons l'Agència Europea de Productes Químics ([ECHA, 2018](#)), actualment el dienestrol està classificat com a **carcinogen** i com a **possible tòxic per a la reproducció de categoria 2** (es sospita que afecta a la fertilitat o danya al fetus). Tot i això, encara hi ha moltes incògnites que envolten als efectes a nivell bioquímic i als òrgans reproductius. Segons les dades més recents de les Nacions Unides sobre els fàrmacs que han estat prohibits o retirats es troba el dienestrol, oficialment retirat a Àustria, Itàlia, Kuwait, Aràbia Saudita i Veneçuela ([UN, 2005](#)).

1.3.3. Dienestrol en el medi ambient

Al igual que el DES, el **DIES va ser també utilitzat com a esteroide anabolitzant** per a ús agrícola, en bestiar boví, oví i aviar. L'administració oral provocava un increment de la taxa de creixement, augmentava l'eficiència alimentària i estimulava la producció de llet ([CAN, 1959](#)). Investigacions recents demostren que malgrat la prohibició de l'ús d'aquests esteroides en bestiar, actualment **encara es troben traces de dienestrol** (del rang de µg/L) **en productes làctics** com llets, formatges, iogurts, i kèfir ([Socas-Rodríguez, et al., 2013](#); [Hu, et al., 2014](#); [Stypuła-Trębas, et al., 2015](#); [Gao, et al., 2015](#); [D'Orazio, et al., 2016](#); [Socas-Rodríguez, et al., 2017](#)). **Això representa un elevat risc**, especialment per a individus en fase de desenvolupament (com nens, nadons i fetus). Els productes làctics —predominantment la llet— són un dels principals aliments consumits pels infants. Tot i que els nadons i els fetus no estan en contacte directe amb aquests aliments, les seves mares sí poden haver estat exposades al DES o DIES, principalment a través de la dieta. En aquest cas, elles podrien ser una potencial font de contaminació cap als nounats a través de la llet materna, i als fetus per via placentària ([Stefanidou, et al., 2009](#)).

També s'ha trobat dienestrol **en aigua de mar** ([He, et al., 2016](#)) i en **múscul boví** ([Malone, et al., 2009](#)). Aquestes dades suggereixen que **el dienestrol encara segueix en ús**, representant un perill per a la salut pública, concretament en grups de població en situació de risc, on petites dosis de tòxics poden tenir efectes adversos sobre el desenvolupament ([Stefanidou, et al., 2009](#)).

Malauradament, no s'han trobat estudis sobre els possibles efectes tòxics del dienestrol en mamífers (ni en mascles ni en femelles).

2. Hipòtesi i objectius

El dienestrol és un metabòlit estrogènic derivat del conegut disruptor endocrí dietilestilbestrol que encara està present en alguns aliments i al medi ambient. Per tant, una exposició materna de dienestrol, per via placentària i a través de la lactància, podria tenir un efecte tòxic sobre el sistema reproductor masculí de la descendència.

L'objectiu principal de l'estudi és avaluar els efectes que el dienestrol té sobre la toxicitat reproductiva de rates mascle joves. Es plantejaran aquests objectius específics:

- Estudiar els diferents paràmetres seminals per tal de veure si hi ha una alteració en la capacitat reproductora.
- Avaluar si es produeix algun efecte sobre la histopatologia del testicle i l'epidídim.
- Analitzar i avaluar diferents paràmetres bioquímics en sèrum per tal de mirar si l'animal té alguna afectació a nivell clínic.

3. Metodologia

3.1. Compost químic

El dienestrol (Sigma-Aldrich) va ser dissolt en etanol absolut a una concentració final del 2% i després diluït amb oli comercial (oli de girasol) per obtenir unes concentracions finals de 0, 1.5, 3 i 6.25µg per kg de pes i per dia (µg/kg/dia). Les dosis van ser escollides segons dades bibliogràfiques (Kledal, et al., 2000; Yamamoto, et al., 2005; Simon, et al., 2012; Mahawong, et al., 2014; Mitchell, et al., 2015) i després d'assegurar que no provocaven avortaments a les rates gestants. Els reactius utilitzats van ser de grau analític.

3.2. Animals i disseny experimental

Es van utilitzar rates femella Sprague-Dawley (Charles River Laboratories) de 90 dies d'edat i es van mantenir en una habitació amb cicles de llum automàtics (cicles de 12h de llum/foscor) a una temperatura de 22±2°C amb una humitat entre el 40 i 60%. Es van alimentar amb menjar i aigua *ad libitum*. L'experiment va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEA) de la URV.

Abans del tractament, cada femella es va aparellar amb un mascle de 90 dies (mateixes condicions esmentades anteriorment) i es van anar controlant fins a la visualització d'espermatozoides en la vagina. Un cop detectats, les rates femella es van marcar com a positives, i es van dividir en 4 grups amb 4 animals per grup: control i tractats amb dosis de 1.5, 3 i 6.25µg/kg/dia. El dienestrol es va administrar diàriament per *gavage*⁴ a partir del 6è dia de gestació (DG6), per assegurar no tenir pèrdues post-implantacionals (els fetus s'implanten fins al dia 6 a l'úter) fins al 21è dia de postpart (DPP21).

A partir del DPP21 les cries de rata mascle es van deixar vives fins als 90 dies d'edat completant així un cicle d'espermatogènesi i assegurant la maduresa sexual. Durant aquest període van rebre menjar i aigua *ad libitum*⁵. Es va mesurar el pes corporal setmanalment i es van anestesiar als 90 dies amb 0.5mg/kg rata de metedomidina i 75mg/kg rata de ketamina a través de via intraperitoneal. Es van recollir mostres de sang a través de la vena porta per realitzar les proves bioquímiques corresponents. Immediatament es van obtenir i pesar el fetge i els òrgans sexuals

⁴ *Gavage*: introducció d'aliments líquuts amb una sonda que passa de la boca fins l'estómac

⁵ *Ad libitum*: gestió d'aliment de forma que els animals sempre disposen de menjar i aigua

(testicles, epidídims, vesícula seminal i pròstata). Un epidídim es va fer servir per obtenir difusió d'espermatozoides els quals van ser utilitzats per determinar la mobilitat, viabilitat i morfologia espermàtica. D'altra banda, un altre testicle i epidídim es va conservar a -20°C per un posterior recompte d'espermàtides i espermatozoides respectivament. A més, es van conservar mostres de fetge a -80°C per posteriors anàlisis. Per l'estudi histopatològic, es van agafar mostres d'epidídim i testicle i es van netejar i posar en formaldehid al 4% durant 24h (Figura 4).

3.3. Paràmetres espermàtics

3.3.1. Recompte d'espermatozoides i espermàtides resistents

Els espermatozoides van ser obtinguts de l'epidídim dret. Es va tallar una petita part de l'epidídim, aproximadament uns 0.03g i es va homogeneïtzar amb 5ml de solució Tritó (0.01% *Triton X-100* + 0,9% clorur sòdic) amb un homogeneïtzador manual. Després es va diluir amb 4.5ml de solució de Tritó (per obtenir una solució 1/10) de la qual es van obtenir dilucions 1/100 i 1/20. Les dilucions 1/10 i 1/20 es van fer servir com a reserva i es van conservar a -20°C mentre que la dilució 1/100 es va fer servir pel recompte en la cambra de Neubauer.

Les espermàtides es van obtenir del testicle dret. Abans de realitzar el tall es va retirar la túnica albugínia del testicle dret, el qual havia sigut pesat prèviament. Per a la homogeneïtzació, es va pesar aproximadament 0,2g de testicle i es va afegir 1ml de solució de Tritó. Es van fer dues dilucions 1/10 i 1/20 respectivament. Les dilucions mare i 1:20 es van fer servir com a reserva i es van conservar a -20°C i les dilucions 1/10 es van fer servir pel recompte en l'hemocitòmetre. Únicament es van comptar espermàtides de les etapes 9-19 de l'espermatogènesi (Figura 1) (OECD, 2008).

Pel recompte es van fer servir 10 μL de mostra dispensats a la vora del cobre-objectes, a l'extrem de la cambra de Neubauer, i es va situar sota el microscopi òptic convencional Olympus CX31 (Olympus) a una magnificació de 400 augments.

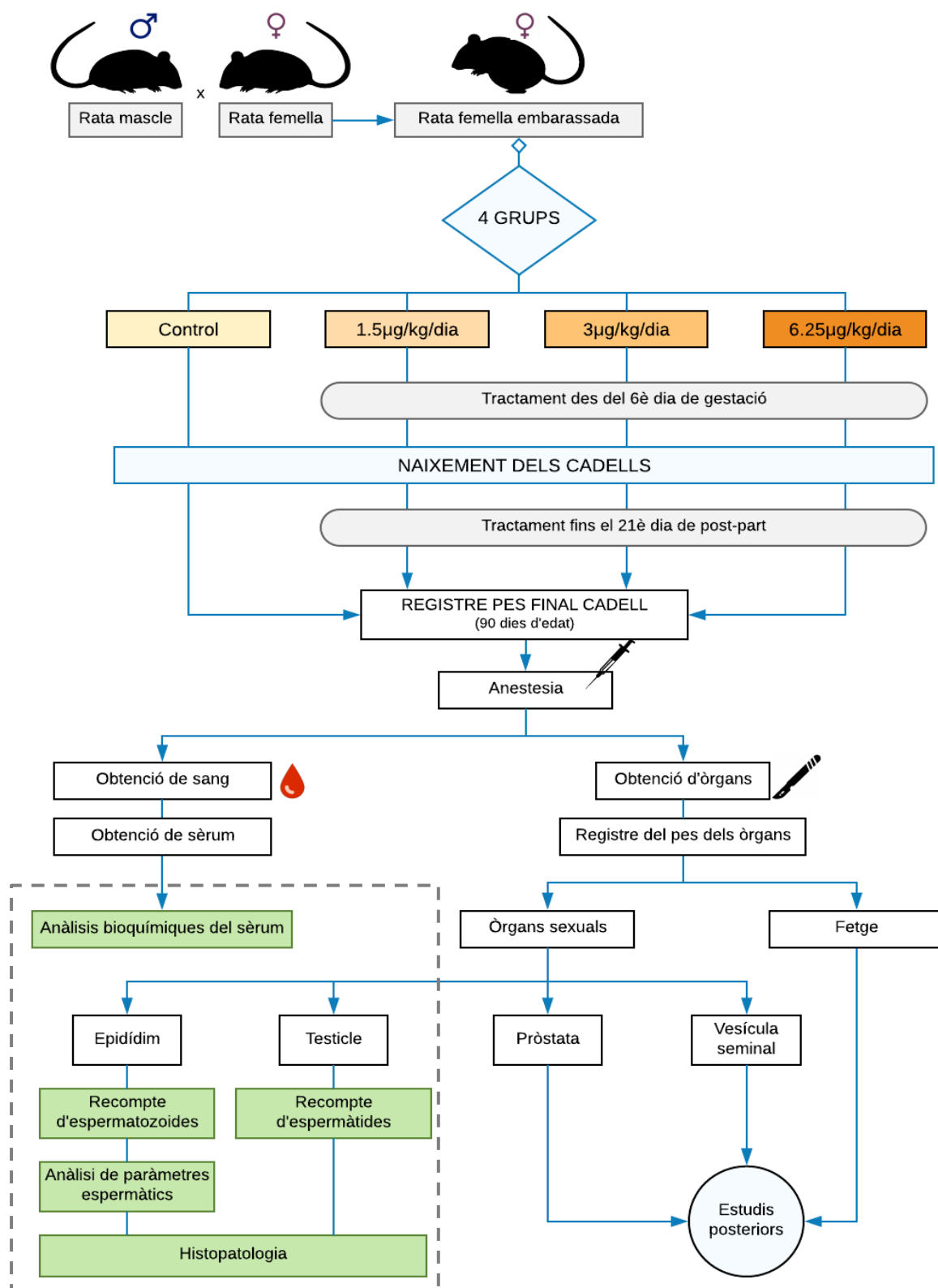


Figura 4 | Representació esquemàtica del disseny experimental del projecte. En un requadre puntejat es troben els anàlisis que vaig dur a terme (de color verd)

3.3.2. Mobilitat de l'esperma

Els espermatozoides es van obtenir de l'epidídim esquerra el qual va ser extret, netejat i pesat, i immediatament col·locat en una placa de Petri de 60mm pre-calentada a 37°C amb 5ml de medi HBSS (Sigma-Aldrich) suplementat amb 0.5% de BSA (Sigma-Aldrich). Es va tallar en petits trossos i es va deixar incubar durant 10 min a 37°C per assegurar una bona difusió dels espermatozoides. Després de la incubació, es van posar 20µL de la suspensió en un porta-objectes i es va cobrir amb un cobre-objectes, ambdós pre-calentats a 37°C per a la observació en microscopi òptic. La mobilitat dels espermatozoides es va enregistrar amb una càmera muntada a un microscopi òptic estàndard, a una magnificació de 400 augments. Es van comptar almenys 200 espermatozoides de rata en 10 camps d'observació diferents, i es van fer tres comptatges per mostra.

Els paràmetres analitzats van ser en percentatge de espermatozoides mòbils progressius (EMP), espermatozoides mòbils no-progressius (EMNP) i espermatozoides immòbils (EI). La determinació de cada paràmetre es va fer seguint els protocols de comptatge d'espermatozoide de la OMS ([WHO, 2010](#)).

3.3.3. Viabilitat i morfologia

Després dels 10 min de difusió de l'esperma es van col·locar 10µL en un porta-objectes pre-calentat. Després es van afegir 10 µL de solució tenyidora d'eosina/nigrosina (1,67% Eosina Y + 10% Nigrosina) (Sigma-Aldrich) i es va mesclar amb suavitat. A continuació es va realitzar un frotis de la suspensió i es va deixar assecar a temperatura ambient. Finalment, es va afegir medi de muntatge DPX (Sigma-Aldrich) per a la posterior observació de la mostra en un microscopi òptic.

Les mostres van ser analitzades sota el microscopi òptic estàndard (Olympus CX31) a una magnificació de 1000 augments. Es van comptar 200 espermes per rata per determinar la viabilitat i la morfologia de l'espermatozoide, respectivament. Els espermatozoides viables no eren tenyits (blancs) mentre que els espermatozoides no viables si eren tenyits (rosats). Els espermatozoides que no eren completament blancs (amb un lleuger color rosat), es van considerar com a espermes vius, per tant, comptats com a viables. Les dades de viabilitat es van expressar com a percentatge d'espermatozoides viables i no viables, i les de morfologia es van expressar com a percentatge de formes normals i anòmals. Dins dels espermatozoides anòmals es va fer un percentatge de les anomalies en el cap, el coll i la cua de l'espermatozoide, que es poden veure en la [Figura 5](#).

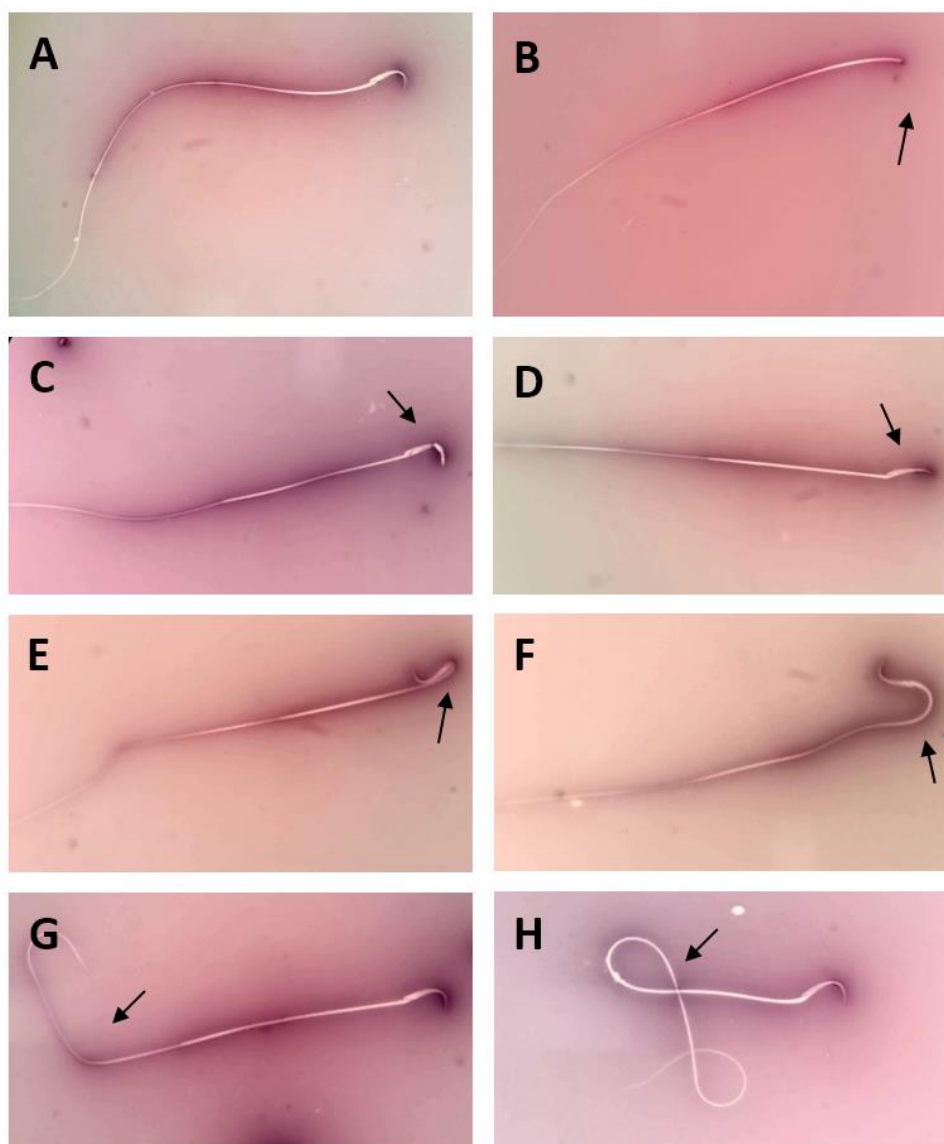


Figura 5 | Diferents anomalies en la morfologia de l'espermatozoide de rata. (A) Espermatozoide viable i normal; (B, C i D) Anomalies en el cap; (E i F) Anomalies en el coll; (G i H) Anomalies en la cua. Les fletxes indiquen les anomalies.

3.4. [Histopatologia](#)

El testicle i epidídim esquerra de 4 rates per grup es van fixar formaldehid al 4% a pH 7.4 durant 24h. Els teixits van ser tallats i es van incloure amb parafina. Es van tallar seccions de 4µm de gruix i es va procedir a la tinció amb hematoxilina-eosina per fer una posterior avaluació de la morfologia del teixit. Les imatges van ser captades amb càmera acoblada a un microscopi òptic. En les seccions de testicle es va examinar si presentava algun tipus d'anormalitat a l'interior dels túbuls seminífers (degeneració, exfoliació, residus atípics), atròfia de les cèl·lules de Leydig, retenció espermàtica, infiltració de macròfags, estat de cèl·lules de Sertoli i augment de la taxa de cèl·lules mitòtiques. En les seccions d'epidídim es van avaluar anormalitats en intratubulars

(degeneració, exfoliació de cèl·lules germinals), atròfia del conducte, contingut d'espermatozoides, hiperplàsia d'epiteli i presència de cèl·lules apoptòtiques, amb l'ús de guies histopatològiques (OECD, 2008; NTP, 2018). El sistema de classificació utilitzat va ser el següent: 0 per cap anormalitat, i 1, 2 i 3 per lleugera, moderada i severa anormalitat, respectivament (a criteri de l'autor).

3.5. Anàlisis bioquímiques

Per les anàlisis bioquímiques del sèrum es va recol·lectar sang en tubs de 10mL i es van deixar a temperatura ambient durant 30 min. El sèrum es va centrifugar a 1300 g durant 10 minuts a 4°C i es va separar i emmagatzemar immediatament en alíquotes de 50µL a -80°C o 4 °C segons l'assaig a realitzar. Es van analitzar proteïnes totals, albúmina, glucosa, aspartat transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), triacilglicèrids, colesterol, HDL, urea i creatinina. Es va utilitzar l'analitzador automàtic Cobas Mira (Roche) seguint les instruccions proveïdes pel fabricant amb diversos kits de la casa comercial QCA (Química Clínica Aplicada).

3.6. Estadística

L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant el software del programa estadístic GraphPad Prism 7. Es va assumir que les dades segueixen una distribució normal i a continuació es va fer un anàlisi de variàncies (ANOVA). Després es va fer una anàlisi *post hoc* amb un test de Bonferroni. La significació estadística es va establir amb una $p < 0.05$.

4. Resultats

4.1. Paràmetres espermàtics

4.1.1. Recompte d'espermàtides i espermatozoides

L'exposició materna al dienestrol no ha afectat de manera significativa els nivells d'espermàtides. Sí que hi ha hagut diferències significatives en quant al recompte d'espermatozoides, on s'han vist disminuïts en els grups de dosis de 3 i 6µg/kg/dia respecte el grup control (Taula 1). Tot i això, s'observa una tendència a la disminució dels nivells d'espermatozoides de tots els grups tractats respecte al grup control (Figura 6).

Taula 1 | Efectes de l'exposició materna al dienestrol en el nombre d'espermàtides i espermatozoides de rates joves

	Control	1.5 µg/kg/dia	3 µg/kg/dia	6µg/kg/dia
Nombre d'animals observat	3	2	4	4
Recompte d'espermàtides (x10 ⁴ /testicle/g animal)	35.43 ± 7.35	65.10 ± 16.97	35.60 ± 12.66	53.10 ± 15.82
Recompte d'espermatozoides (x10 ¹⁰ /epidídim/g animal)	51.27 ± 10.87	31.50 ± 0.00	27.03 ± 5.23*	28.87 ± 5.75*

Els valors s'expressen amb la mitjana ± desviació estàndard (DE)

*Significativament diferent del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

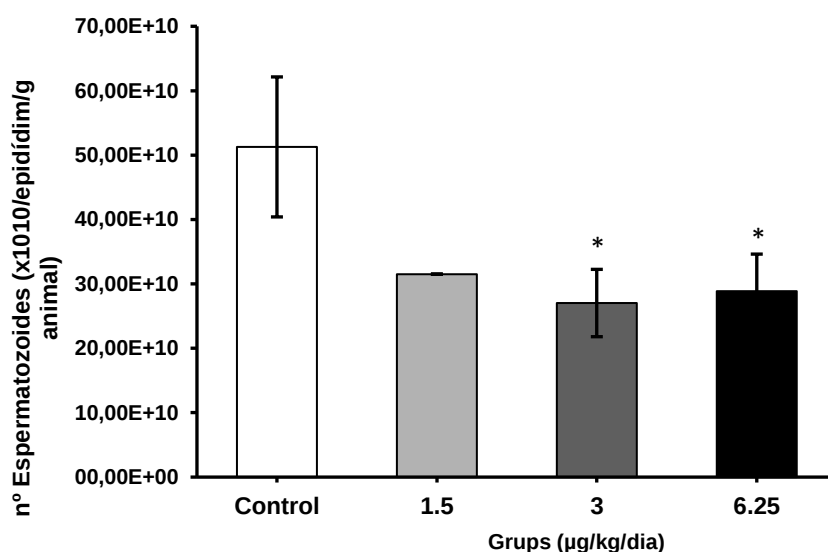


Figura 6 | Representació gràfica dels resultats del recompte d'espermatozoides.

Les barres d'error indiquen la DE

*Significativament diferent del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

4.1.2. Mobilitat, morfologia i viabilitat

Els efectes del dienestrol també es poden observar en la mobilitat espermàtica. En quant als espermatozoides mòbils progressius (EMP), tots els grups tractats amb dienestrol tenen diferències significatives respecte el grup control (Taula 2, Figura 7). No hi ha diferències significatives entre els percentatges de espermatozoides mòbils no progressius (EMNP) dels diferents grups. Finalment, els nivells d'espermatozoides immòbils (EI) presenten diferències significatives entre el grup control i el grup tractat amb 6.25µg/kg/dia, però no n'hi ha entre els altres grups.

Taula 2 | Efectes de l'exposició materna al dienestrol en la mobilitat, viabilitat i morfologia espermàtica de rates joves (n=3)

	Control	1.5 µg/kg/dia	3 µg/kg/dia	6 µg/kg/dia
Mobilitat espermàtica (%)				
EMP	59.33 ± 2.84	38.23 ± 3.86**	41.67 ± 0.51**	37.77 ± 7.35**
EMNP	14.23 ± 6.87	21.63 ± 16.03	16.03 ± 3.78	15.23 ± 4.14
EI	26.47 ± 4.12	40.13 ± 8.84	42.30 ± 4.23	47.00 ± 5.51*
Viabilitat espermàtica (%)				
	69.10 ± 4.75	43.83 ± 1.17***	35.00 ± 6.07***	34.20 ± 3.16***
Morfologia espermàtica (%)				
Normal	50.47 ± 10.71	45.27 ± 8.45	44.70 ± 6.71	41.13 ± 3.90
Anòmala	49.53 ± 10.71	54.73 ± 8.45	55.30 ± 6.71	58.87 ± 3.90
Percentatge de morfologies anòmales				
Cap	27.13 ± 4.30	41.40 ± 5.60	37.90 ± 6.01	41.40 ± 4.05
Coll	18.17 ± 5.87	23.83 ± 2.08	18.73 ± 3.19	21.20 ± 4.85
Cua	54.67 ± 1.94	34.73 ± 4.74***	43.4 ± 4.26*	37.40 ± 2.34**

EMP, espermatozoides mòbils progressius; EMNP, espermatozoides mòbils no progressius; EI, espermatozoides immòbils.

Els valors s'expressen amb la mitjana ± DE

*Significativament diferent del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

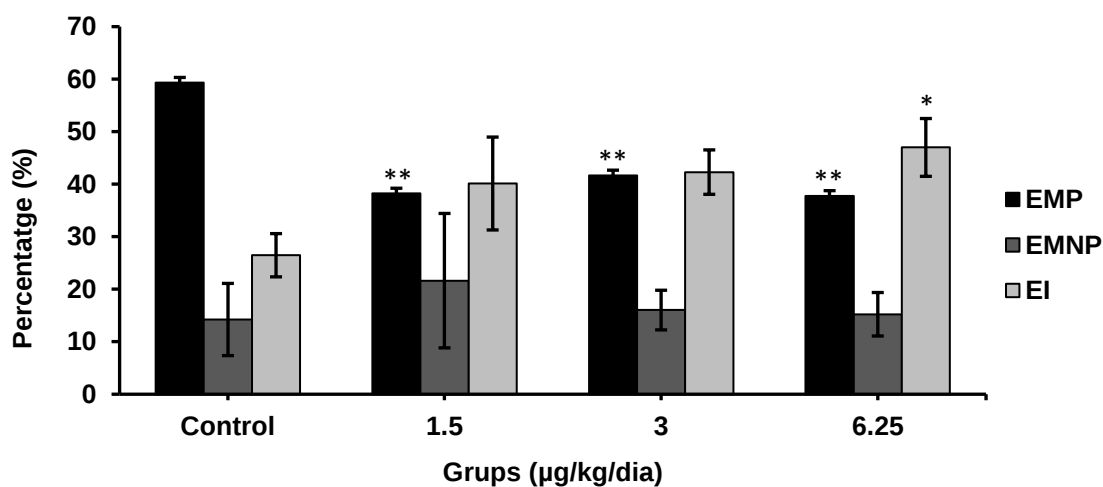


Figura 7 | Representació gràfica del percentatge d'espermatozoides mòbils progressius (EMP), no mòbils progressius (EMNP) i immòbils (EI) dels grups tractats i control. Les barres d'error indiquen la DE.

*Significativament diferent del respectiu paràmetre del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

La viabilitat dels espermatozoides presenta uns resultat similars. Hi ha una clara disminució de la viabilitat entre els grups tractats amb dienestrol i el grup control (Taula 2, Figura 8).

En quant a la morfologia, no hi ha diferències significatives entre el percentatge d'espermatozoides normals i anòmals, tot i que es veu una tendència en els de morfologia anòmala a mesura que augmenta la dosi. Entre els diferents tipus d'anomalies, només es troben diferències significatives en les anomalies de la cua, observant-se una disminució en tots els grups tractats respecte al control (Taula 2). S'observa però, una tendència a l'augment d'anomalies en el cap en els grups tractats (Figura 9).

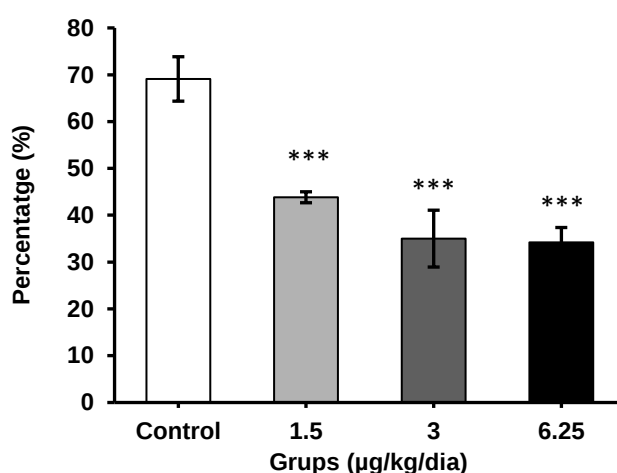


Figura 8 | Representació gràfica dels percentatges de viabilitat espermàtica. Les barres d'error indiquen la DE.

Significativament diferent del respectiu paràmetre del grup control ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$)

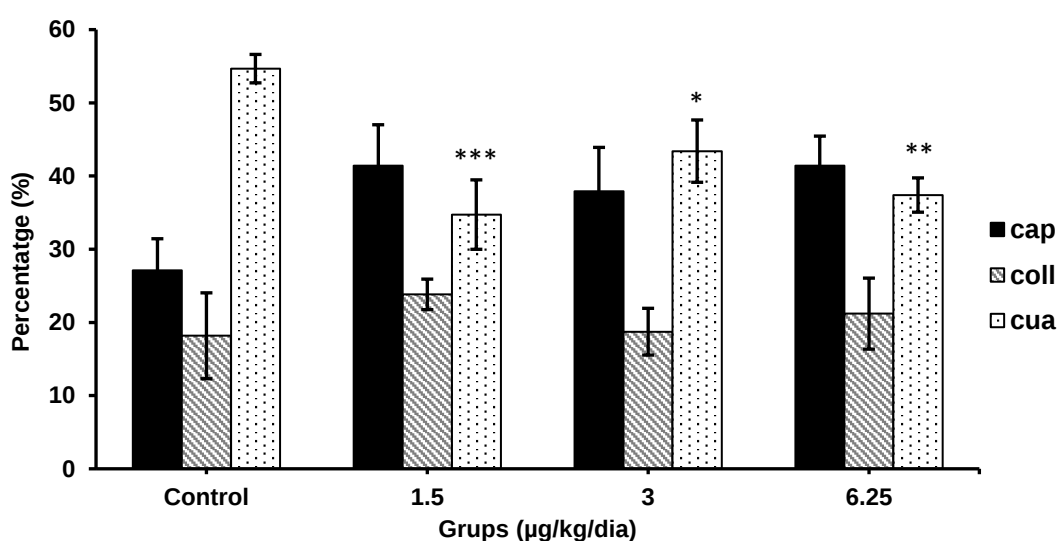


Figura 9 | Representació gràfica dels percentatges d'anomalies en el cap, el coll i la cua de l'espermatozoide dels grups tractats i control. Les barres d'error indiquen la DE.

Significativament diferent del respectiu paràmetre del grup control ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$)

4.2. Paràmetres histopatològics

Es va dur a terme una avaluació histopatològica del testicle i l'epidídim tan en els grups tractats amb 1.5, 3 i 6.25 µg/kg/dia com en el grup control. Els detalls de cada paràmetre es poden observar en la [Taula 3](#). S'ha utilitzat el següent sistema de qualificació: 0 per cap anormalitat, 1 per anormalitat lleugera, 2 per anormalitat moderada i 3 per anormalitat severa, a criteri de l'autor.

Als testicles, en quant a les anormalitats en el lumen dels túbuls seminífers, no es van observar diferències notables entre els grups control, i les dosis d'1.5 i 3 µg/kg/dia. En el grup tractat amb la dosi de 6.25 µg/kg/dia es va poder apreciar un lleuger augment en el nombre residus atípics a l'interior dels túbuls ([Figura 10B](#)). Uns resultats similars es van obtenir amb l'avaluació de la retenció espermàtica, destacant que el grup de 6.25 µg/kg/dia presentava notablement major nombre de túbuls amb aquesta afectació ([Figura 10F](#)), i en general tendia a incrementar segons la dosi. També es va detectar un increment notable en la presència de cèl·lules mitòtiques en el grup d'alta dosi, cosa que no es va repetir de forma tan significativa en els grups amb dosis baixa i mitjana, i no es va detectar en el grup control ([Figura 10D](#)). També es va avaluar l'estat de les cèl·lules de Leydig, que no presentaven alteracions en cap grup, i les de Sertoli, que es van veure lleugerament anormals solament en el grup amb dosi de 6.25 µg/kg/dia.

Taula 3 | Detalls de les troballes de l'avaluació histopatològica del testicle i l'epidídim de ratolins joves exposats de forma materna al dienestrol

Teixit	Paràmetre	Control	1.5 µg/kg/dia	3 µg/kg/dia	6 µg/kg/dia
Testicle	Anormalitats al lumen	0	0	0	1
	Retenció espermàtica	0	0	0-1	1-2
	Infiltració	0	0	0	0
	Cèl·lules de Sertoli	0	0	0	1
	Cèl·lules de Leydig	0	0	0	0
	Presència de cèl·lules mitòtiques	0	1	1	2
Epidídim	Anormalitats al lumen	0	0	1	2
	Atròfia dels túbuls	0	0	0	1-2
	Contingut d'espermatozoides	0	0	0	0
	Hiperplàsia de l'epiteli	0	0	0	0
	Presència de cèl·lules apoptòtiques	0	0-1	1	2

Els resultats qualitatius s'expressen de la següent manera: 0, cap anormalitat; 1, 2 i 3 lleugera, moderada i severa anormalitat, respectivament.

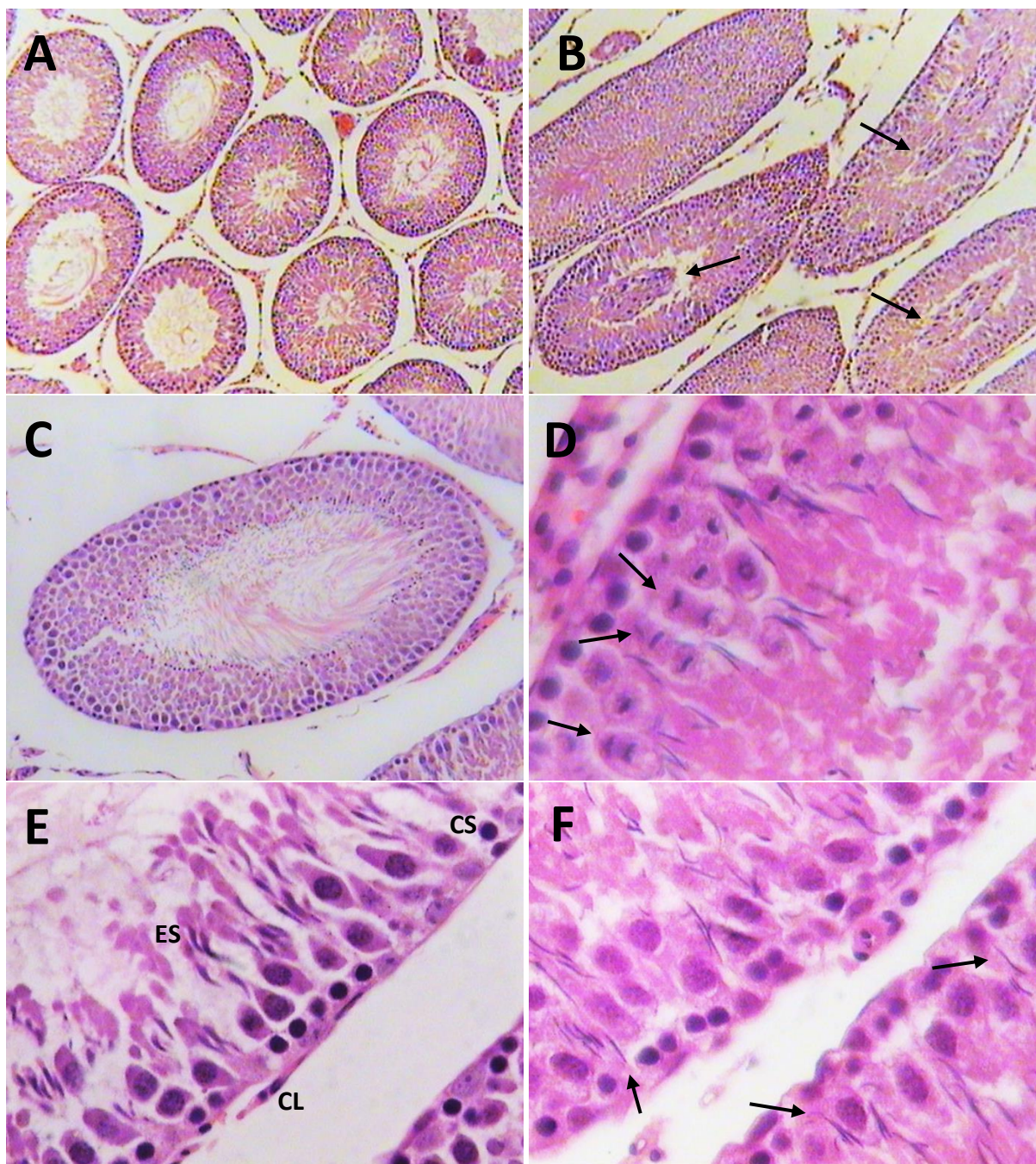


Figura 10 | Histopatologia de testicle de rata. (A) Visió general dels túbuls seminífers no afectats a 40x; (B) Túbuls de rates amb anomalies a l'interior del lumen a 40x; (C) Túbul de rata no afectat a 100x; (D) Detall de cèl·lules del túbul en divisió mitòtica a 400x; (E) Detall d'un túbul sense retenció espermàtica a 400x on CS, cèl·lula de Sertoli; CL, cèl·lula de Leydig; ES, espermatida; (F) Detall del túbul amb retenció espermàtica a 400x. Les fletxes indiquen les anomalies més notables.

Als epidídims, no es van detectar alteracions en el contingut d'esperma ni hiperplàsies en l'epiteli. Només es van veure cossos atípics en el lumen i atròfia en els conductes dels grups exposats a dosi de 6.25µg/kg/dia, de forma moderada en algunes zones de l'epidídim (Figura 11B-C). També es va avaluar la presència de cèl·lules apoptòtiques, aquestes tendien a augmentar de forma significativa a mesura que s'incrementava la dosi (Figura 11E i G).

No es va observar infiltració de macròfags en cap dels dos òrgans.

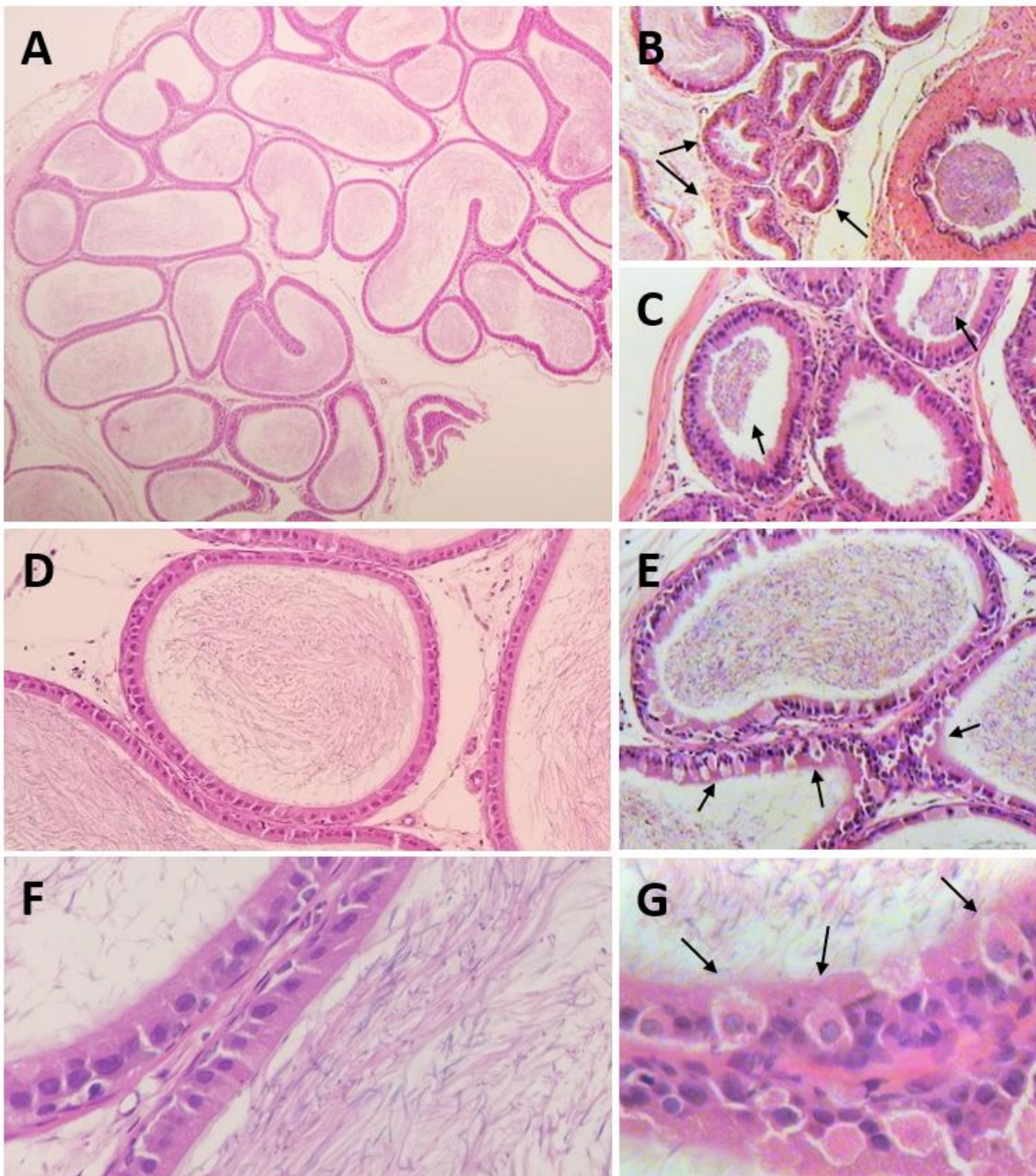


Figura 11 | Histopatologia de l'epidídim de rata. (A) Visió general dels conductes de l'epidídim a 40x; (B i C) Atròfia i anormalitats dins en el lumen dels conductes a 40 i 100x respectivament; (D) Conducte sense cap afectació a 100x; (E) Conducte amb l'epiteli epididimari amb gran nombre de cèl·lules apoptòtiques a x100; (F) Detall de l'epiteli epididimari no afectat a x400; (G) Detall de l'epiteli epididimari amb algunes apoptosis a 400x. Les fletxes indiquen les anormalitats més notables.

4.1. Anàlisis bioquímiques

Els resultats de l'anàlisi dels paràmetres bioquímics es poden trobar en la (Taula 4). Les proteïnes totals (PT) va disminuir significativament en els grups tractats respecte al grup control (Figura 12A). En quant als nivells d'albumina, aquests només van disminuir significativament entre el grup de dosi mitjana i alta. La glucosa va patir un augment significatiu en el grup de 3µg/kg/dia, tot i que es pot observar una tendència a l'augment en tots els grups tractats (Figura 12B).

Taula 4 | Perfil bioquímic del sèrum de les rates mascles exposades al dienestrol de forma materna (n=8)

	Control	1.5 µg/kg/dia	3 µg/kg/dia	6.25µg/kg/dia
PT (g/dL)	6.31 ± 0.40	5.47 ± 0.32***	5.35 ± 0.39***	5.53 ± 0.28***
Albumina (g/dL)	4.46 ± 0.18	4.32 ± 0.14 ^{ab}	4.57 ± 0.22 ^a	4.16 ± 0.18 ^b
Glucosa (mg/dL)	177.80 ± 33.69	201.60 ± 22.11	244.90 ± 48.40**	212.60 ± 34.65
AST (U/dL)	114.90 ± 16.77	92.78 ± 13.85	99.96 ± 21.17	99.66 ± 23.62
FA (U/dL)	122.10 ± 12.13	161.80 ± 47.96 ^a	280.80 ± 88.98***, ^{bd}	390.90 ± 50.93***, ^{cd}
ALT (U/dL)	31.71 ± 5.39	37.44 ± 7.02	35.46 ± 7.40	44.63 ± 8.27**
TAG (mg/dL)	79.00 ± 11.87	117.00 ± 22.60	89.28 ± 29.86	109.80 ± 50.80
COL (mg/dL)	54.11 ± 10.04	63.11 ± 5.20	53.69 ± 6.18	58.09 ± 9.76
HDL (mg/dL)	35.29 ± 6.58	42.84 ± 4.38*, ^{ab}	38.45 ± 4.02 ^a	46.33 ± 5.58***, ^b
Creatinina (mg/dL)	0.50 ± 0.07	0.51 ± 0.03	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.06
Urea (mg/dL)	30.03 ± 4.06	25.05 ± 2.15 ^a	33.34 ± 6.12 ^b	27.85 ± 4.25 ^{ab}

PT, proteïnes totals; AST, aspartat transaminasa; FA, fosfatasa alcalina; ALT, alanina transaminasa; TAG, triacilglicèrids; COL, colesterol; HDL, lipoproteïna d'alta densitat. Els valors s'expressen com a la mitjana ± DE.

*Significativament diferent del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

^{abcd} Diferents superíndex en la mateixa fila indiquen diferències significatives entre grups a p<0.05

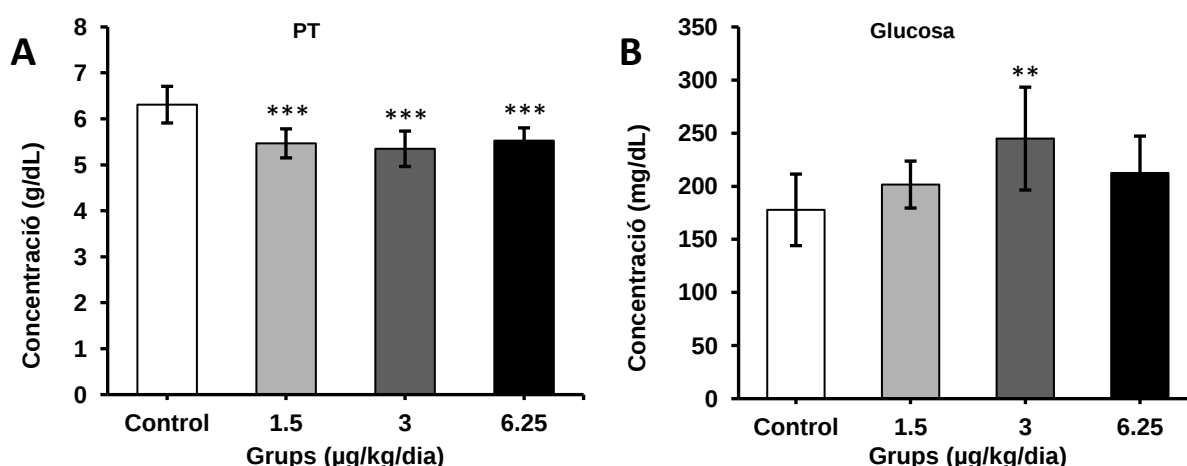


Figura 12 | Representació gràfica dels paràmetres bioquímics de (A) proteïnes totals i (B) glucosa. Les barres d'error indiquen la DE.

*Significativament diferent del grup control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005)

L'alanina transaminasa (ALT), aspartat transaminasa (AST) i fosfatasa alcalina (FA) van ser utilitzades com a indicadors de la funció hepàtica. Els nivells d'activitat de la FA, a les dosis de 3 i 6.25 µg/kg/dia van augmentar significativament respecte el grup control i el grup d'1.5µg/kg/dia. Els nivells d'ALT només van mostrar variació significativa respecte els control en la dosi de 6.25µg/kg/dia. En aquests dos paràmetres, s'observa una tendència general cap a l'augment (Figura 13).

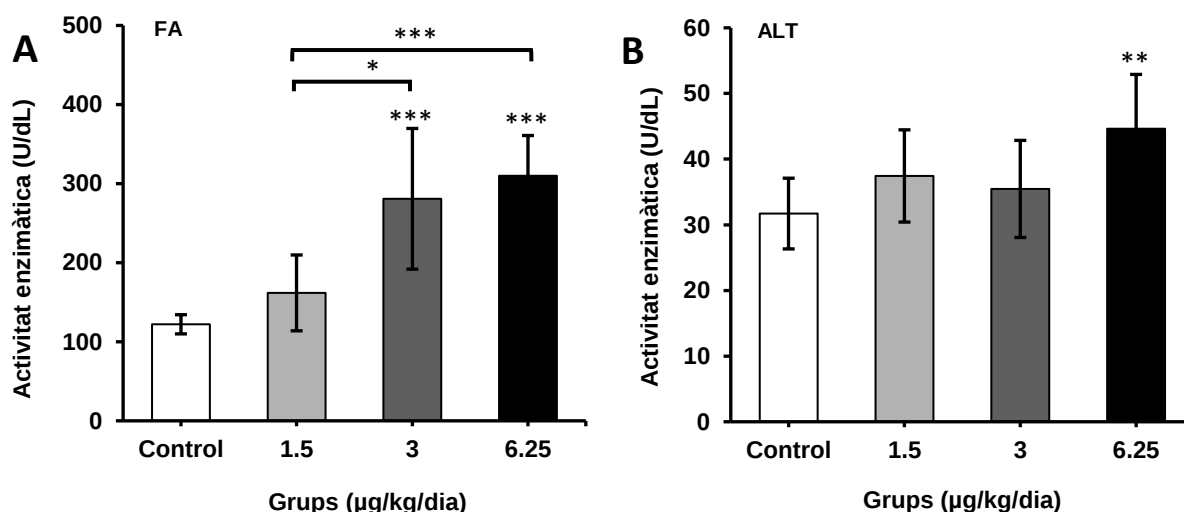


Figura 13 | Representació gràfica dels paràmetres bioquímics de (A) FA, fosfatasa alcalina i (B) ALT, alanina transaminasa. Les barres d'error indiquen la DE.

Significativament diferent del grup control ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). Els claudàtors indiquen les diferències significatives entre grups.

D'altra banda, els nivells de triacilglicèrids (TAG), les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i colesterol (COL) també van ser analitzats. Només van haver diferències significatives en els nivells d'HDL en els grups de 1.5 i 6.25µg/kg/dia respecte al grup control, i també entre els grups de 3 i 6.25µg/kg/dia (Figura 14).

La creatinina i la urea van ser utilitzats com a indicadors de la funció renal. No es van veure canvis significatius respecte els grups control. La urea, però, va tenir diferències significatives entre el grup d'1.5 i 3µg/kg/dia, on es va veure augmentada amb la dosi.

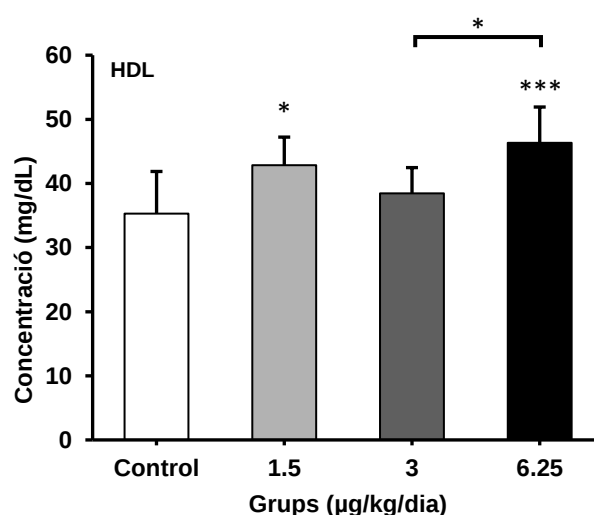


Figura 14 | Representació gràfica dels nivells d'HDL. Les barres d'error indiquen la DE.

Significativament diferent del grup control ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). Els claudàtors indiquen les diferències significatives entre grups.

5. Discussió

Se sap que l'administració de disruptors estrogènics (com el DES o el DIES) provoca una supressió de la secreció de FSH ([Lamon-Fava, 2010](#)) la qual està estretament relacionada amb l'espermatogènesi, ja que actua sobre les cèl·lules de Sertoli, fent que aquestes afavoreixin la síntesi d'espermatozoides ([OECD, 2008](#)). Els resultats d'aquest estudi mostren certs paràmetres espermàtics afectats. La viabilitat, la mobilitat i el nombre d'espermatozoides presenten una disminució significativa en els grups exposats al dienestrol respecte al grup control. Respecte a la morfologia, només es va detectar que hi havia una lleugera tendència a augmentar en el percentatge d'espermatozoides anòmals en els grups tractats, però els resultats no van ser significatius. Amb aquests resultats es conclou que l'exposició a dienestrol a través de la mare pot derivar a una afectació general de diferents paràmetres espermàtics i, com a tal, una possible afectació en la capacitat reproductora de les rates mascle.

En estudis recents s'ha demostrat que el DES causa estrès oxidatiu sobre les gàmetes masculines, cosa que pot portar a un dany de l'ADN de les cèl·lules dels òrgans sexuals ([Habas, et al., 2017](#)). Aquest dany pot provocar un increment de cèl·lules apoptòtiques i/o un augment de cèl·lules mitòtiques ([Creasy, et al., 2012](#); [Habas, et al., 2017](#)). Aquests efectes poden tenir relació amb els resultats qualitius obtinguts de les anàlisis histopatològiques realitzades, en les que es va observar un increment d'espermatogonis en estat mitòtic en els testicles, i un augment de cèl·lules apoptòtiques en l'epiteli de l'epidídim en els grups tractats amb 3 i 6µg/kg/dia. Les diferents anormalitats en el lumen, com la presència de cèl·lules germinals, i la retenció espermàtica en els testicles poden ser degudes a l'efecte que tenen els disruptors endocrins que actuen com a estrògens, tot alterant l'equilibri hormonal i fent disminuir la biosíntesi de testosterona i, com a tal, al procés d'espermatogènesi ([OECD, 2008](#)). A més, a l'epidídim es van observar alguns túbuls atròfics en el grup de 6.25µg/kg/dia, que també podria ser degut amb la disminució de biosíntesi de testosterona ([OECD, 2008](#)).

Els enzims hepàtics AST, ALT i FA tenen una funció crucial en el metabolisme proteic i dels carbohidrats, i són àmpliament utilitzats com a biomarcadors de la salut hepàtica ([Shirdel, et al., 2016](#)). Un augment en la FA i la AST sol ser degut a una resposta a l'estrès a una substància tòxica, com un disruptor endocrí ([Shirdel, et al., 2016](#)). En aquests resultats, els nivells de FA augmenten després de l'exposició al dienestrol, el que indicaria una probable afectació en el fetge. Tot i això,

s'esperava que els nivells d'AST també augmentessin, però no han variat significativament. Aquests resultats poden estar relacionats amb la disminució de les proteïnes totals (hipoproteïnèmia), així com en l'augment de glucosa. L'augment de glucosa (hiperglicèmia) també és usat com a biomarcador, concretament d'una resposta d'estrès secundària ja que hi ha una mobilització de reserves energètiques per proporcionar la glucosa necessària als diferents òrgans ([Shirdel, et al., 2016](#)). D'altra banda, una destrucció dels hepatòcits pot portar a una alliberament d'aminotransferases a la circulació ([Shirdel, et al., 2016](#)). En els nostres resultats, aquest augment significatiu dels nivells d'ALT en la dosi més elevada suggereix una possible lesió histopatològica del fetge que hauria de ser revisada més profundament. L'administració oral d'estrògens incrementa els nivells d'HDL del plasma, ja que regula l'expressió de proteïnes involucrades en el metabolisme de l'HDL ([Lamon-Fava, 2010](#)). Els nostres resultats indiquen que va haver un augment significatiu d'HDL en alguns grups respecte al control. Això pot ser degut que les rates van ser exposades a través de les seves mares, les quals havien sigut tractades amb disruptors estrogènics per *gavage*, fet que hagi pogut desregular l'expressió de proteïnes del metabolisme de l'HDL. Respecte als paràmetres relatius als nivells d'urea i de creatinina, no podem afirmar que hi hagi cap afectació al ronyó ja que no s'ha vist una variació significativa. Tampoc es van obtenir diferències significatives en els nivells de colesterol i triglicèrids, tot i que s'ha vist que els disruptors estrogènics en contacte durant l'embaràs tenen efectes en els nivells de àcids grassos i triglicèrids hepàtics ([Helsley i Zhou, 2017](#)).

6. Conclusions

Podem concloure que l'exposició al dienestrol en rates gestants té efectes tòxics sobre la capacitat reproductiva en rates mascle joves de la descendència.

- S'ha vist que el dienestrol presenta afectacions en els diferents paràmetres espermàtics, com una disminució de la mobilitat i una disminució de la viabilitat. També s'ha vist que no provoca canvis en els nivells d'espermàtides però presenta una reducció important en el nombre d'espermatozoides.
- L'exposició materna al dienestrol també presenta afectacions en els testicles i en l'epidídim a nivell histopatològic, però en cap cas són severes.
- Pel que fa als paràmetres bioquímics, podem concloure que el dienestrol presenta una afectació en el quadre clínic de les rates mascle, concretament en els nivells dels enzims ALT i FA i de les proteïnes totals que ens indicarien possibles disfuncions hepàtiques.

7. Limitacions de l'estudi i perspectives de futur

Aquest estudi té diverses limitacions. En primer lloc, el nombre d'individus per grup del que vaig disposar va ser baix ($n=4$) i en ocasions, molt baix ($n=2$). Aquest fet fa disminuir la potència estadística (normalment s'utilitza $n=10$) i obtenir resultats dubtosos. D'altra banda, el fet de què la majoria d'articles sobre el dietilestilbestrol i el dienestrol siguin força antics (degut a la seva prohibició) ha dificultat la tasca de recerca bibliogràfica, especialment del dienestrol, on no hi ha gairebé cap estudi. També, la falta de coneixements en histopatologia ha fet que hagi pogut interpretar les afectacions en les seccions de teixit d'una forma poc concisa. Finalment no s'ha d'oblidar que els humans no som "rates de 70 kg", i hi ha enormes diferències entre espècies en quant a la farmaco- i tòxicocinètica.

Com a perspectives de futur, faltaria dur a terme una avaluació més extensa dels efectes del dienestrol sobre l'organisme, com en l'estat histopatològic del fetge com a òrgan destoxificador i del ronyó com a òrgan osmorregulador i d'excreció, ja que s'han detectat variacions en els paràmetres bioquímics analitzats. També seria important fer un anàlisi hormonal que confirmés que hi ha una desregulació de l'homeòstasi hormonal, condició crítica per al correcte desenvolupament del procés d'espermatogènesi.

8. Bibliografia

- CAN, 1959. *Hormonal relationships and applications in the production of meats, milk, and eggs..* s.l.:Committee on Animal Nutrition.
- Creasy, D. et al., 2012. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology*, 40(6), pp. 40-121.
- D'Orazio, G. et al., 2016. Determination of estrogenic compounds in milk and yogurt samples by hollow-fibre liquid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 15(10), pp. 7447-7459.
- Diamanti-Kandarakis, E. et al., 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), pp. 293-342.
- ECHA, 2018. *Dienestrol ECHA sheet*. [En línia] Disponible a: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/notification-details/81612/760933>
- Fénichel, P., Brucker-Davis, F. i Chevalier, N., 2015. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren – the transgenerational effect. *Annales d'Endocrinologie*, Volum 76, pp. 253-259.
- Ferguson, J. H., 1953. Effect of stilbestrol on pregnancy compared to the effect of a placebo. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 3(3), pp. 592-601.
- Gao, Y. et al., 2015. Development and characterization of a nanodendritic silver-based solid-phase extraction sorbent for selective enrichment of endocrine-disrupting chemicals in water and milk samples. *Analytica Chimica Acta*, 511, Volum 900, pp. 76-82.
- Giusti, R. M., Iwamoto, K. i Hatch, E. E., 1995. Diethylstilbestrol Revisited: A Review of the Long-Term Health Effects. *Annals of Internal Medicine*, 122(10), p. 778.
- Greenwald, P., Barlow, J. J., Nasca, P. C. i Burnett, W. S., 1971. Vaginal Cancer after Maternal Treatment with Synthetic Estrogens. *New England Journal of Medicine*, 285(7), pp. 390-392.
- Habas, K., Brinkworth, M. H. i Anderson, D., 2017. Diethylstilbestrol induces oxidative DNA damage, resulting in apoptosis of spermatogonial stem cells in vitro. *Toxicology*, 382, pp. 117-121.
- Helsley, R. N. i Zhou, C., 2017. Epigenetic impact of endocrine disrupting chemicals on lipid homeostasis and atherosclerosis: a pregnane X receptor-centric view. *Environmental Epigenetics*, pp. 1-15.
- Herbst, A. L., Ulfelder, H. i Poskanzer, D. C., 1971. Adenocarcinoma of the Vagina — Association of Maternal Stilbestrol Therapy with Tumor Appearance in Young Women. *New England Journal of Medicine*, 284(16), pp. 878-881.
- He, X.-P., Lian, Z.-R., Tan, L.-J. i Wang, J.-T., 2016. Preparation and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for selective trace extraction of dienestrol in seawater. *Journal of Chromatography A*, 1469, pp. 8-16.
- Hu, W.-Y. et al., 2014. Packed-fiber solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of diethylstilbestrol, hexestrol, and dienestrol residues in milk products. *Journal of Chromatography B*, 957, pp. 7-13.
- Inano, H. et al., 1993. Promotive effects of diethylstilbestrol, its metabolite (Z,Z-dienestrol) and a stereoisomer of the metabolite (E,E-dienestrol) in tumorigenesis of rat mammary glands pregnancy-dependently initiated with radiation. *Carcinogenesis*, 14(10), pp. 2157-2163.

- Kabir, E. R., Rahman, M. S. i Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 40(1), pp. 241-258.
- Kledal, T. J., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E. i Jørgensen, K. D., 2000. A dose-finding study of in utero and lactational exposure to diethylstilboestrol and flutamide in 129/Sv mice.. *Pharmacology i toxicology*, 12, 87(6), pp. 255-7.
- Kuchera, L. K., 1971. Postcoital contraception with diethylstilbestrol.. *JAMA*, 25 10, 218(4), p. 562.
- Kuiper, G. G. J. M. et al., 1997. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology*, 1 3, 138(3), pp. 863-870.
- Kumar, A., Raut, S. i Balasinor, N. H., 2018. Endocrine regulation of sperm release. *Reproduction, Fertility and Development*
- Lamon-Fava, S., 2010. Effects of Estrogen on HDL Metabolism. A: *High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease*. New York, NY: Springer New York, pp. 139-143.
- Linares Vidal, V., 2006. *Estudi dels efectes de l'exposició a l'urani en la reproducció i la conducta. Influència de l'estrès tesi doctoral*, s.l.: s.n.
- Mahawong, P. et al., 2014. Prenatal diethylstilbestrol induces malformation of the external genitalia of male and female mice and persistent second-generation developmental abnormalities of the external genitalia in two mouse strains. *Differentiation*, 9, 88(2-3), pp. 51-69.
- Malone, E., Elliott, C., Kennedy, D. i Regan, L., 2009. Development of a rapid method for the analysis of synthetic growth promoters in bovine muscle using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1 4, 637(1-2), pp. 112-120.
- Marty, M. S., Carney, E. W. i Rowlands, J. C., 2011. Endocrine Disruption: Historical Perspectives and Its Impact on the Future of Toxicology Testing. *Toxicological Sciences*, 1 3, 120(Supplement 1), pp. 93-108.
- Metzler, M. i Fischer, L. J., 1981. The Metabolism Of Diethylstilbestrol. *CRC critical reviews in biochemistry*, 10(3), pp. 171-212.
- Mitchell, R. T. et al., 2015. Anogenital Distance Plasticity in Adulthood: Implications for Its Use as a Biomarker of Fetal Androgen Action. *Endocrinology*, 1, 156(1), pp. 24-31.
- NTP, 2018. *National Toxicology Program*. [En línia] Disponible a: <https://ntp.niehs.nih.gov/>
- OECD, 2008. Male Reproductive System. A: OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), ed. *Endocrine Disruption: A Guidance Document For Histologic Evaluation Of Endocrine And Reproductive Tests*. s.l.:s.n.
- Polyzos, S. et al., 2012. The Emerging Role of Endocrine Disruptors in Pathogenesis of Insulin Resistance: A Concept Implicating Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Current Molecular Medicine*, 1 1, 12(1), pp. 68-82.
- Schulster, M., Bernie, A. i Ramasamy, R., 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*, 18(3), p. 435.
- Shirdel, I. et al., 2016. The response of thyroid hormones, biochemical and enzymological biomarkers to pyrene exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, Volum 130, pp. 207-213.
- Simon, L. et al., 2012. Exposure of neonatal rats to anti-androgens induces penile mal-developments and infertility comparable to those induced by oestrogens. *International Journal of Andrology*, 6, 35(3), pp. 364-376.

- Simpson, E. i Santen, R. J., 2015. Celebrating 75 years of oestradiol. *Journal of Molecular Endocrinology*, 12, 55(3), pp. 1-20.
- Socas-Rodríguez, B., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J. i Rodríguez-Delgado, M. Á., 2013. Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples. *Journal of Chromatography A*, 25 10, Volum 1313, pp. 175-184.
- Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J. i Rodríguez-Delgado, M. Á., 2017. Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 5 5, Volum 1496, pp. 58-67.
- Stefanidou, M., Maravelias, C. i Spiliopoulou, C., 2009. Human exposure to endocrine disruptors and breast milk.. *Endocrine, metabolic i immune disorders drug targets*, 9, 9(3), pp. 269-76.
- Stypuła-Trębas, S., Minta, M., Radko, L. i Żmudzki, J., 2015. Application of the yeast-based reporter gene bioassay for the assessment of estrogenic activity in cow's milk from Poland. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 40(3), pp. 876-885.
- TecnATox, U., 2018. *TecnATox - Centro de Tecnología Ambiental Alimentaria y Toxicológica*. [En línia] Disponible a: <http://www.urv.cat/es/investigacion/estructuras/centros-innovacion/tecnatox/>
- Trout, S. W. i Seifer, D. B., 2000. Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values?. *Fertility and Sterility*, 8, 74(2), pp. 335-337.
- Turo, R. et al., 2014. Diethylstilboestrol for the treatment of prostate cancer: past, present and future. *Scandinavian Journal of Urology*, 21 2, 48(1), pp. 4-14.
- UN, 2005. *Consolidated list of products whose consumption and / or sale have been banned, withdrawn, severely restricted or not approved by Governments*. s.l.:United Nations.
- Universidad de Navarra, sense data *¿Qué es dienestrol?*. [En línia] Disponible a: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/dienestrol>
- Ünüvar, T. i Büyükgöbüz, A., 2012. Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 4(2), pp. 51-60.
- WHO, 2010. *World Health Organization laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. 5 ed. Switzerland: s.n.
- WHO, 2012. *World Health Organization Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health*. A: *Endocrine disruptors and child health* . s.l.:s.n.
- Yamamoto, M. et al., 2005. Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring.. *The Journal of toxicological sciences*, 2, 30(1), pp. 7-18.

9. Autoavaluació

Abans de començar l'estada de pràctiques als laboratoris de toxicologia reconec que vaig tenir una certa inquietud, ja que la toxicologia és un camp que gairebé mai he tingut l'oportunitat de tocar en profunditat. Tot i això, quan vaig començar les pràctiques i vaig conèixer les treballadores i investigadores, aquestes inquietuds van desaparèixer. A més, l'àmbit de la toxicologia reproductiva és especialment rellevant degut a la propietat que tenen aquests compostos tòxics d'interferir en la línia germinal, pel que encara va fer més emocionant el projecte que estava a punt d'emprendre.

La realització d'aquest treball m'ha portat multitud de coses bones, he pogut definir quins han sigut els meus punts dèbils i punts forts durant l'elaboració del treball, i això m'ha permès treballar sobre els primers i enfortir els segons. He après a tractar problemes que s'han plantejat durant el transcurs de les pràctiques, detectar-los i intentar solucionar-los. He guanyat ràpidament autonomia a l'hora de treballar (així com descobrir petits trucs per augmentar l'eficiència) i he obtingut nous coneixements sobre estadística i també en noves tècniques de laboratori, com els talls i tincions de teixits histològics. Sí que és veritat que la majoria del treball estava centrat en l'ús del microscopi òptic, però això també m'ha servit per aprendre a tenir paciència. Tot i això, considero que he tingut una experiència global molt positiva.