

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

En aquest experiment es van valorar diferents paràmetres físics i conductuals d'animals adults exposats durant 19 setmanes a Mn, per via oral, i a estrès per immobilització 2 h/dia durant 5 dies a la setmana.

#### *Paràmetres físics*

A la **taula IV.23** es pot veure la ingesta de menjar i aigua, l'increment de pes corporal, el pes corporal, i el pes del cervell en acabar el tractament en els diferents grups d'animals: grup control, grup exposat a Mn a dosi de 1000 mg/kg/dia, grup exposat a Mn a dosi de 2000 mg/kg/dia, grup control estressat, grup exposat a Mn a dosi de 1000 mg/kg/dia i estressat, i grup exposat a Mn a dosi de 2000 mg/kg/dia i estressat.

Hi ha diferències significatives en la ingesta de menjar. El grup control difereix significativament dels grups Mn-2000, Mn-1000 + estrès i Mn-2000 + estrès. El Mn i l'estrès estarien influint de manera significativa en aquestes diferències ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ), no així la interacció (Mn x estrès) que no tindria cap efecte.

En quant al consum d'aigua, el grup control difereix de tots els altres grups excepte del control estressat. Els grups tractats amb Mn bevien significativament menys. L'anàlisi dels efectes del tractament, mostra que el factor Mn i el factor estrès estan afectant significativament els resultats ( $p < 0.001$ ). No té cap efecte en aquest paràmetre la interacció (Mn x estrès).

El grup control difereix de tots els altres pel que fa al pes corporal. El grup control és el que ha tingut un increment més important respecte a tots els altres grups. Per tant, és el que presenta un pes més alt al final del tractament. Aquestes diferències són estadísticament significatives i estan influïdes pel Mn ( $p < 0.001$ ), i per l'estrès ( $p < 0.05$ ), però no per la interacció d'aquests factors.

El pes del cervell dels animals del grup control només difereix significativament dels que rebien Mn a dosi alta, amb o sense estrès, sent el pes del cervell d'aquests significativament més baix. Només es va observar un efecte del Mn ( $p < 0.001$ ).

Taula IV.23. Ingesta de menjar i aigua total, guany de pes, pes corporal, i pes del cervell en rates mascles exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre d'animals	n = 15	n = 15	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14
Ingesta de menjar (g)	3588±259 <sup>a</sup>	3231±140 <sup>ab</sup>	2155±260 <sup>c</sup>	3302±199 <sup>ab</sup>	3125±246 <sup>b</sup>	2016±246 <sup>c</sup>
Consum d'aigua (ml)	4648±613 <sup>a</sup>	2884±306 <sup>b</sup>	1900±268 <sup>c</sup>	5100±732 <sup>a</sup>	2844±165 <sup>b</sup>	1949±193 <sup>c</sup>
Increment de pes corporal (g)	219.3±54.0 <sup>a</sup>	140.9±30.8 <sup>bc</sup>	-72.1±38.2 <sup>d</sup>	163.8±27.3 <sup>b</sup>	120.2±36.5 <sup>c</sup>	-66.1±43.1 <sup>d</sup>
Pes corporal al final del tractament (g)	571.4±62.5 <sup>a</sup>	491.3±41.9 <sup>b</sup>	293.3±48.0 <sup>c</sup>	516.6±34.9 <sup>b</sup>	463.2±53.8 <sup>b</sup>	289.2±49.4 <sup>c</sup>
Pes del cervell al final del tractament (g)	2.15± 0.09 <sup>a</sup>	2.09±0.11 <sup>a</sup>	1.90±0.12 <sup>b</sup>	2.05±0.09 <sup>a</sup>	2.04±0.12 <sup>ac</sup>	1.91±0.07 <sup>bc</sup>
Pes del cervell relatiu (pes cervell / pes corporal) %	0.37±0.04 <sup>a</sup>	0.42±0.04 <sup>a</sup>	0.68±0.06 <sup>b</sup>	0.39±0.03 <sup>a</sup>	0.43±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.12 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c, d</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

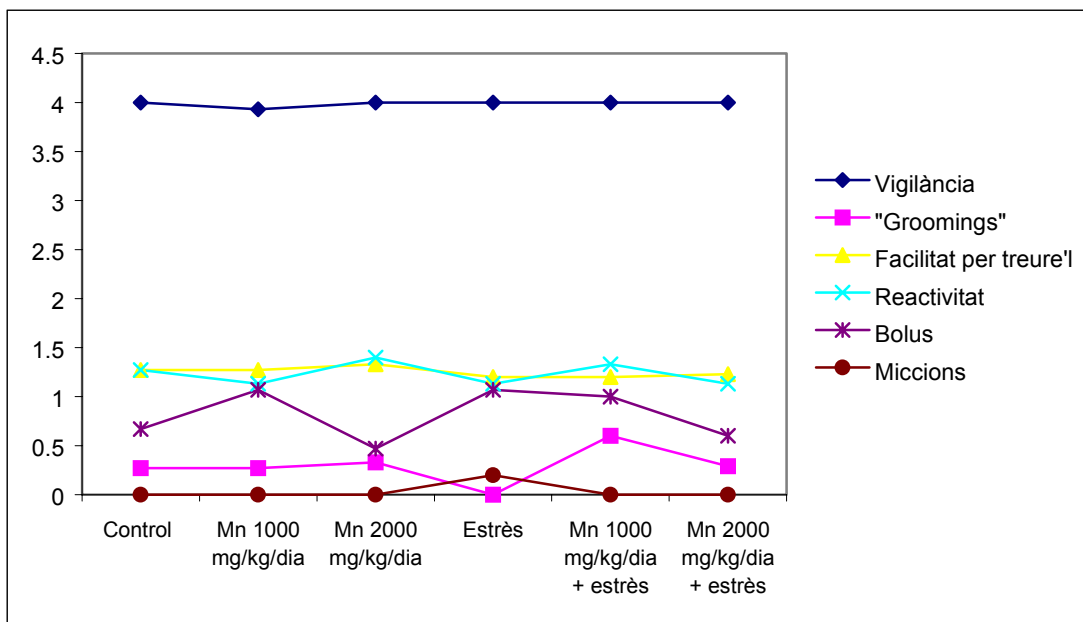


Figura IV.24. Variables de la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 15 de tractament, en les quals la mitjana dels grups diferia.

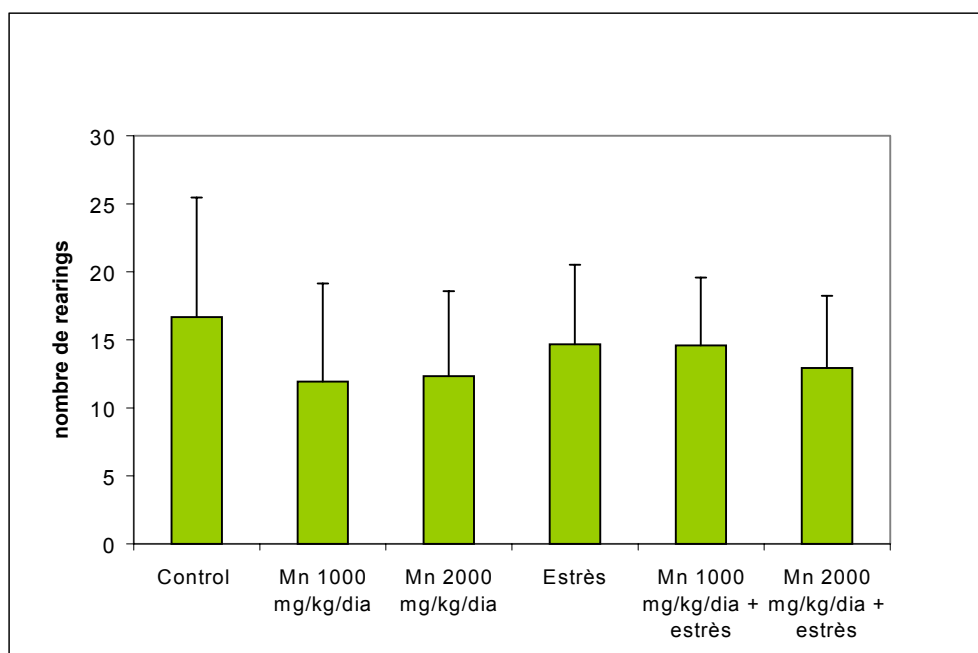


Figura VI.25. Nombre de "rearings" per grup observats en la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 15 de tractament.

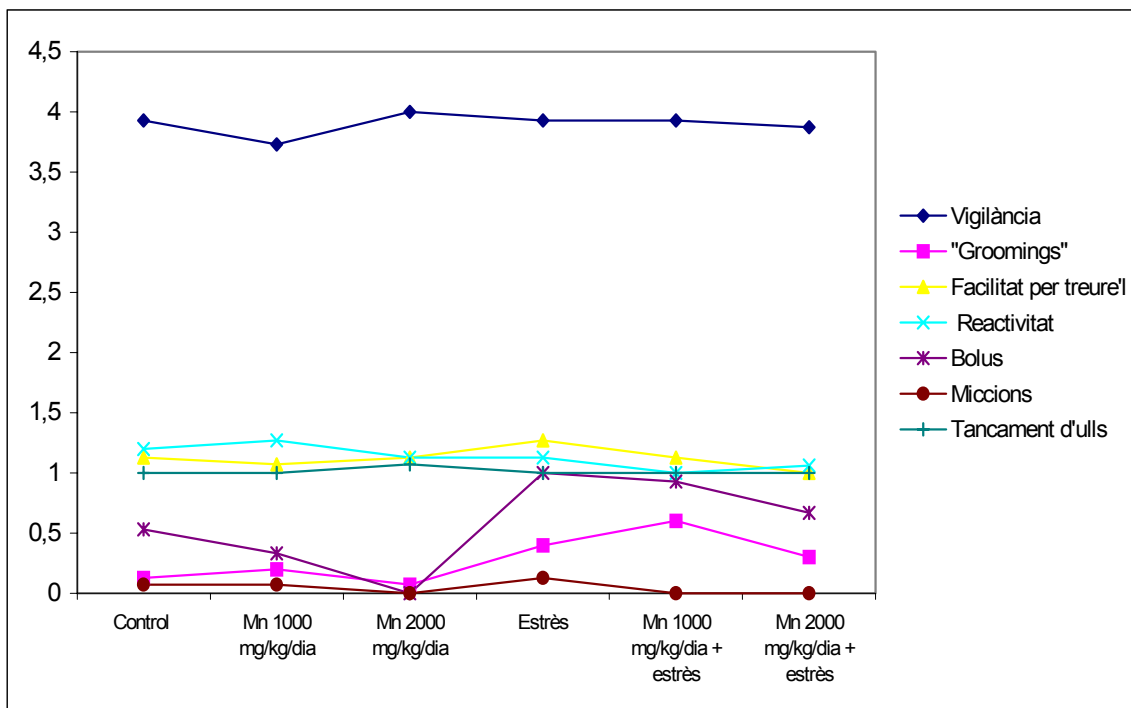


Figura IV.26. Variables de la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 30 de tractament, en les quals la mitjana dels grups diferia.

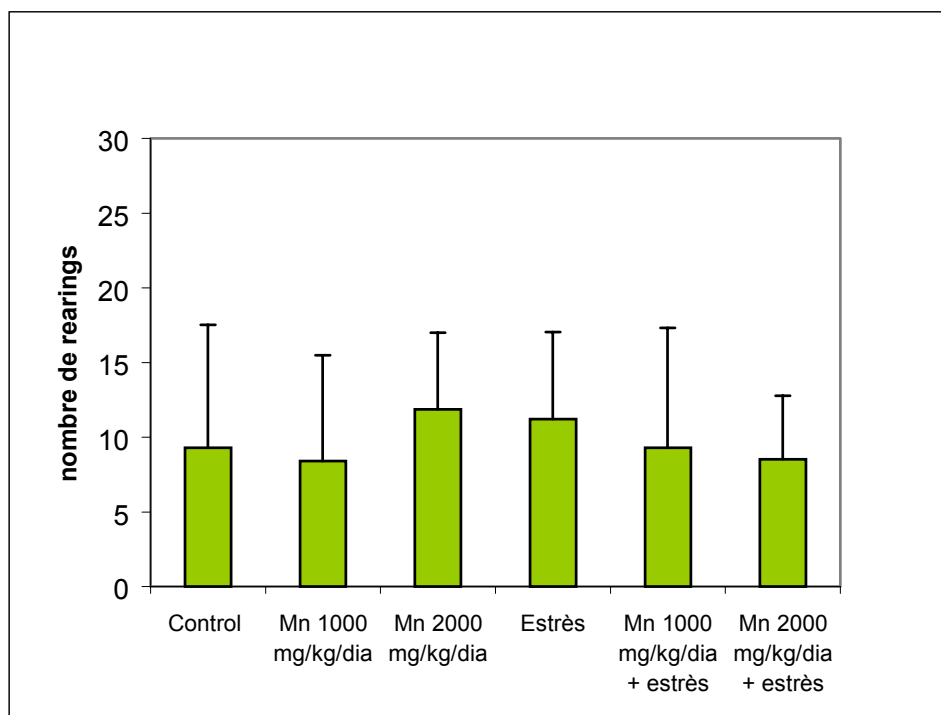


Figura IV.27. Nombre de "rearings" per grup observats en la Bateria d'Observació Funcional "FOB" al dia 30 de tractament.

El pes relatiu del cervell [(pes cervell / pes corporal animal) x 100] mostra les mateixes diferències entre grups. Els animals tractats amb dosi alta de Mn, amb o sense estrès, difereixen de tots els altres grups, sent el seu pes relatiu significativament més alt. Aquestes diferències són degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.01$ ) (*taula IV.23*).

En la *figura IV.24* es mostren les variables avaluades per la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 15 de tractament, en les que les mitjanes dels grups diferien. L'anàlisi de la varianza però no va revelar cap diferència significativa entre els grups de tractament. El recompte de "rearings" durant la "FOB" al dia 15 de tractament es mostra a la *figura VI.25*. No es va observar cap efecte significatiu del tractament.

La *figura IV.26* mostra les variables avaluades en la "FOB" al dia 30 de tractament, en que les mitjanes dels grups diferien. L'anàlisi de la varianza però no va revelar cap diferència significativa entre els grups de tractament. El recompte de "rearings" durant la "FOB" al dia 30 de tractament es mostra a la *figura VI.27*. No es va observar tampoc cap efecte del tractament.

La *figura IV.28* presenta les variables avaluades en la "FOB" al dia 60 de tractament, en que les mitjanes dels grups diferien. L'anàlisi de la varianza va revelar que hi havia diferències significatives entre grups en la piloerecció. A la *figura IV.30* es mostren les mitjanes per grup en aquesta variable. El grup control difereix significativament del grup Mn-2000 + estrès. Mitjançant l'anàlisi de factors es va evidenciar l'efecte del Mn ( $p < 0.05$ ) i de la interacció (Mn x estrès) ( $p < 0.001$ ) en aquestes diferències. Aquests resultats no es modificaven introduint el pes com a covariable. El recompte de "rearings" durant la "FOB" al dia 60 de tractament es mostra a la *figura VI.29*. No es va observar cap efecte del tractament en aquesta variable.

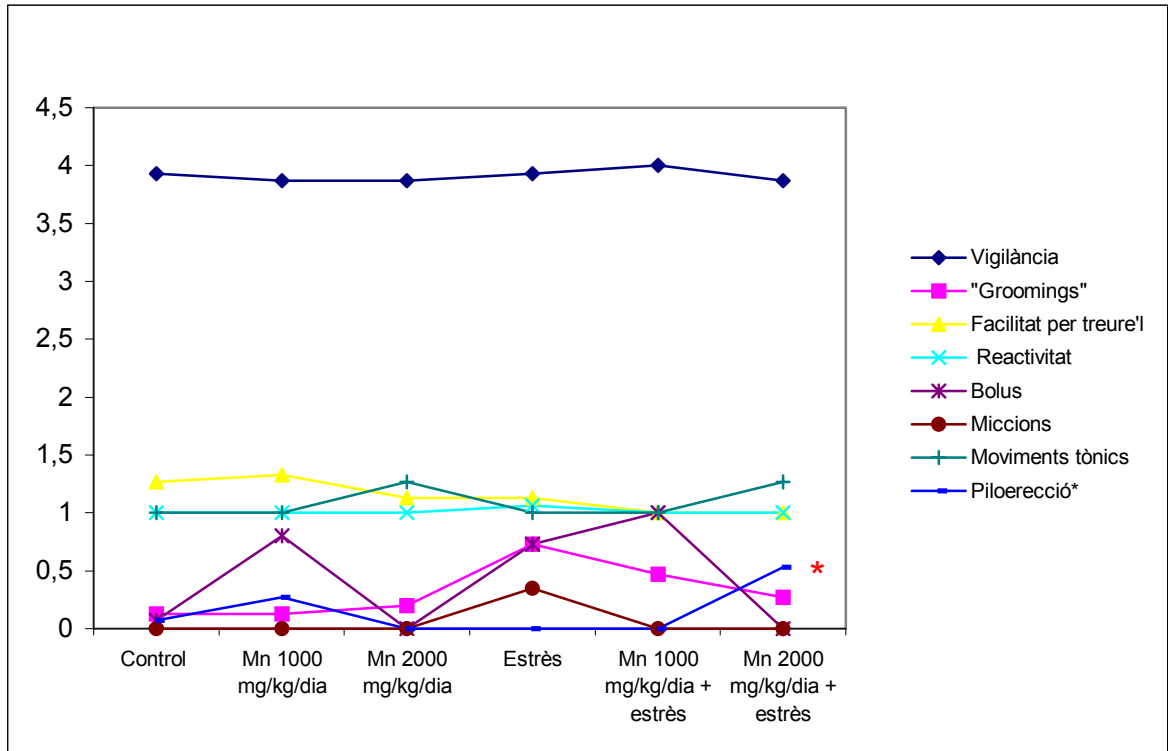


Figura IV.28. Variables de la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 60 de tractament, en les quals la mitjana dels grups diferia. Amb asterisc (\*) les variables en que les diferències entre grups són estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

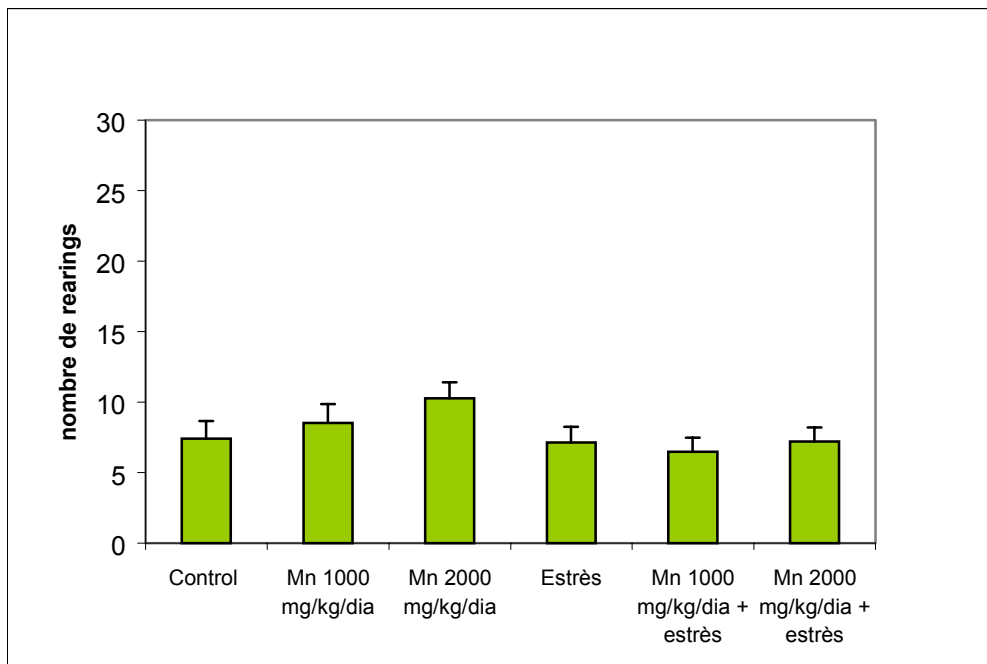


Figura IV.29. Nombre de "rearings" per grup observats en la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 60 de tractament.

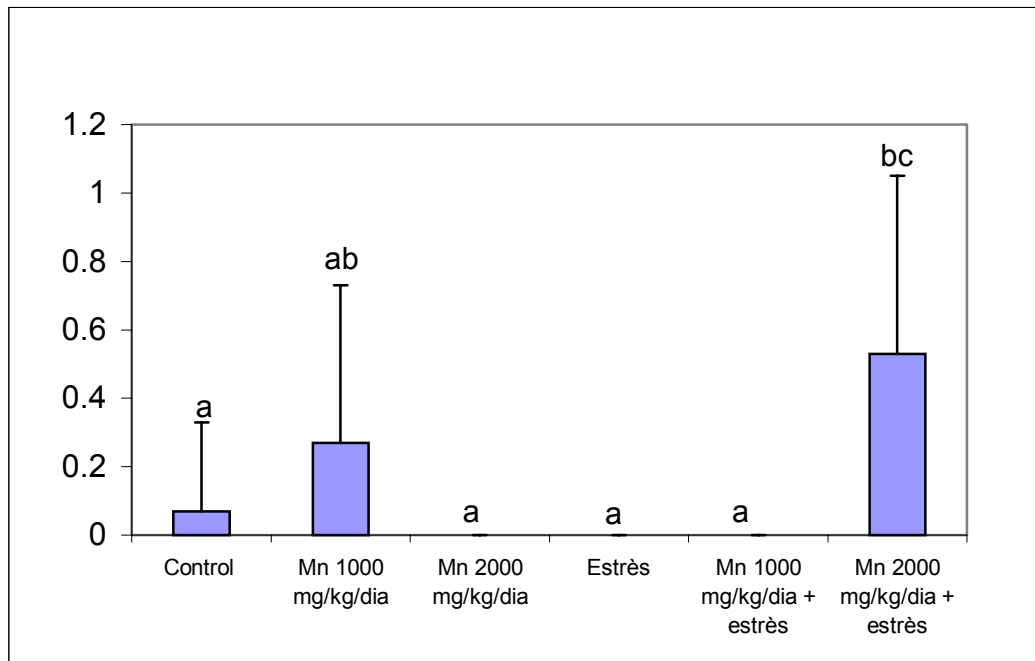


Figura IV.30. Mitjanes per grup en la variable “Piloerecció” en la Bateria d’Observació Funcional (“FOB”) al dia 60 de tractament. Diferents lletres (a, b, c) indiquen diferències estadísticament significatives entre grups ( $p < 0.05$ ).

Per últim, la **figura IV.31** recull les variables avaluades en la “FOB” el dia 90 de tractament, en que les mitjanes dels grups diferien. L’anàlisi de la variança va revelar que existien diferències estadísticament significatives entre grups en les variables (amb asterisc): vigilància, moviments tòncics i piloerecció. En la variable de vigilància, el grup control puntua significativament més baix respecte a la resta dels grups de tractament (**figura IV.33**). En la variable moviments tòncics, el grup control té significativament menys moviments (majoritàriament quan observàvem moviments tòncics es tractava d’esquena arquejada) que els grups tractats amb la dosi alta de Mn, amb o sense estrès (**figura IV.34**). En la piloerecció, el grup Mn-2000 + estrès difereix significativament de tots els restants grups, puntuant més alt en aquesta variable (**figura IV.33**).

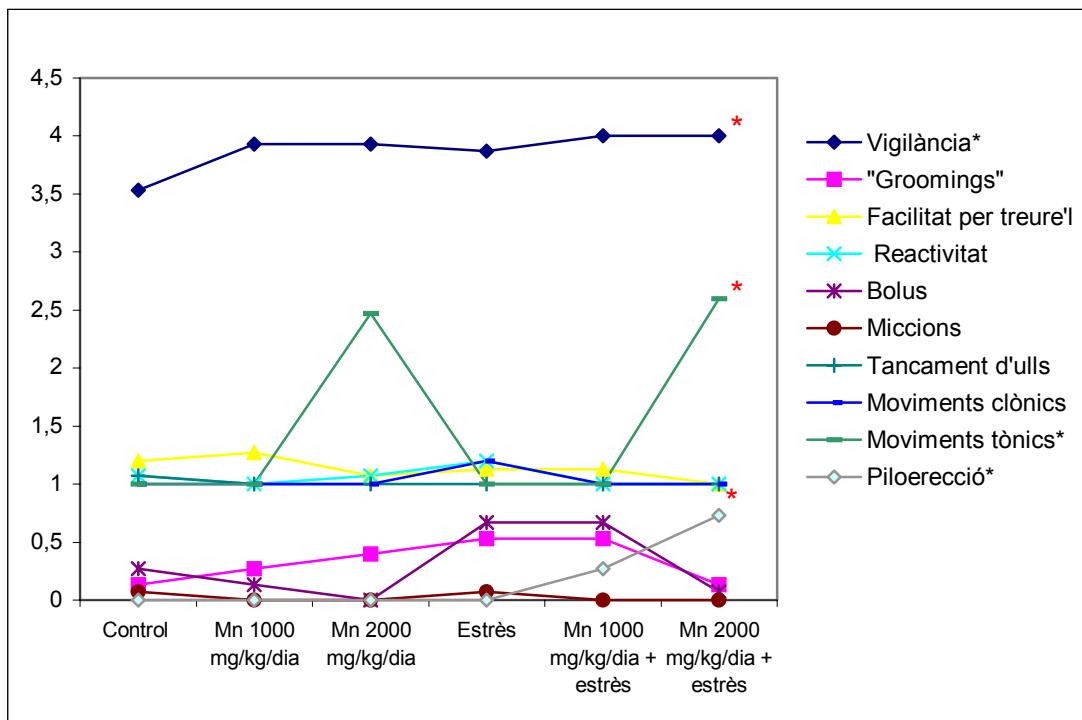


Figura IV.31. Variables de la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 90 de tractament, en les quals la mitjana dels grups diferia. Amb asterisc (\*) les variables en que les diferències entre grups són estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

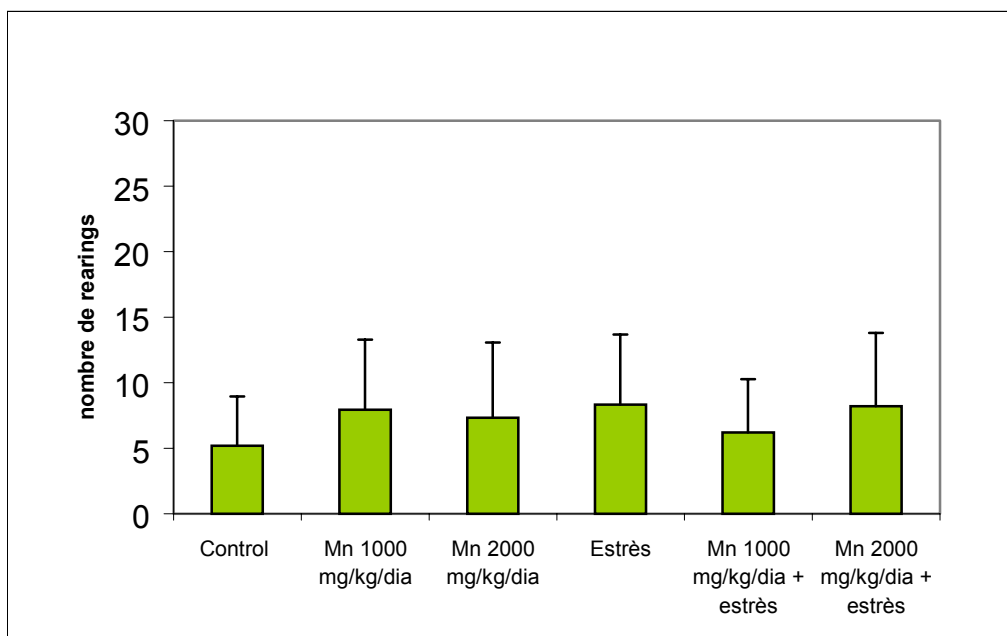


Figura IV.32. Nombre de "rearings" per grup observats en la Bateria d'Observació Funcional ("FOB") al dia 90 de tractament.



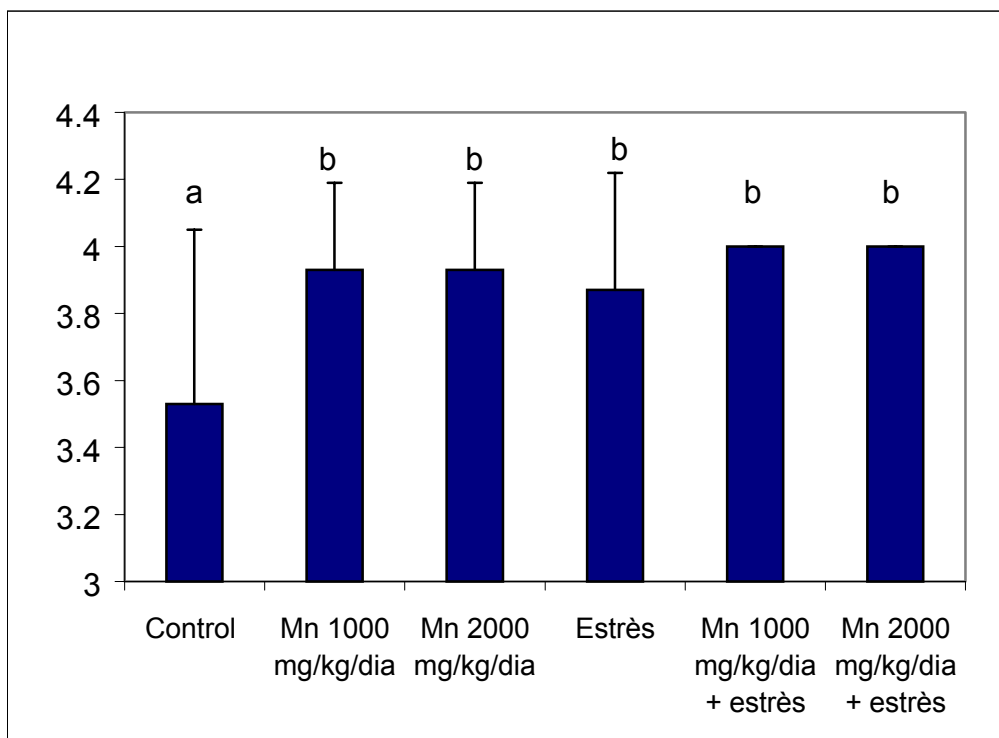


Figura IV.33. Mitjanes per grup en la variable “Vigilància” en la Bateria d’Observació Funcional (“FOB”) al dia 90 de tractament. Diferents lletres (a, b, c) indiquen diferències estadísticament significatives entre grups ( $p < 0.05$ ).

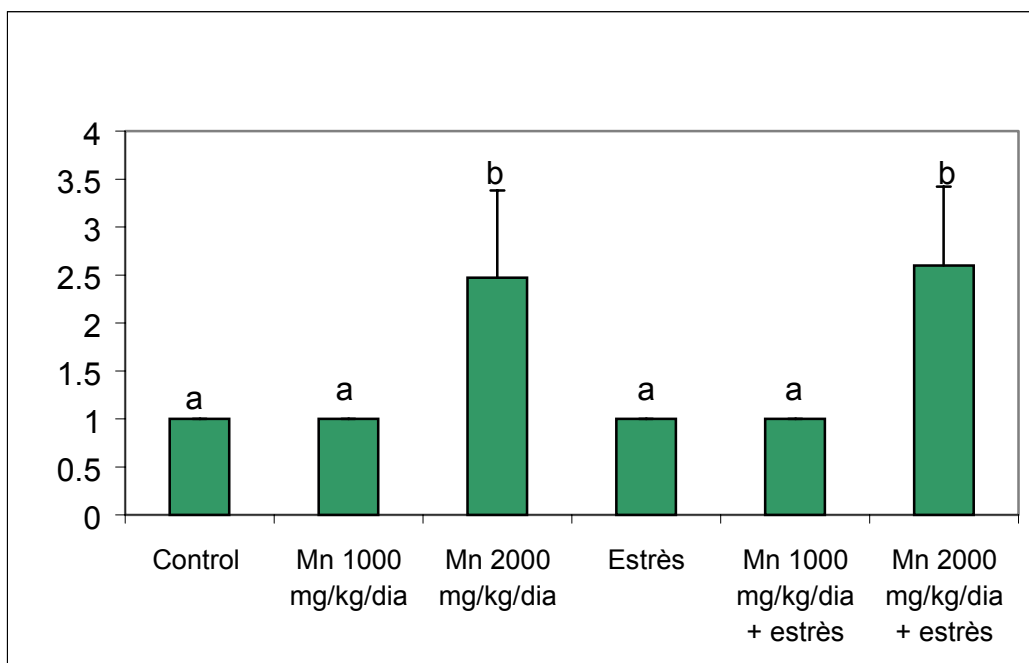


Figura IV.34. Mitjanes per grup en la variable “Moviments tòncics” en la Bateria d’Observació Funcional (“FOB”) al dia 90 de tractament. Diferents lletres (a, b, c) indiquen diferències estadísticament significatives entre grups ( $p < 0.05$ ).

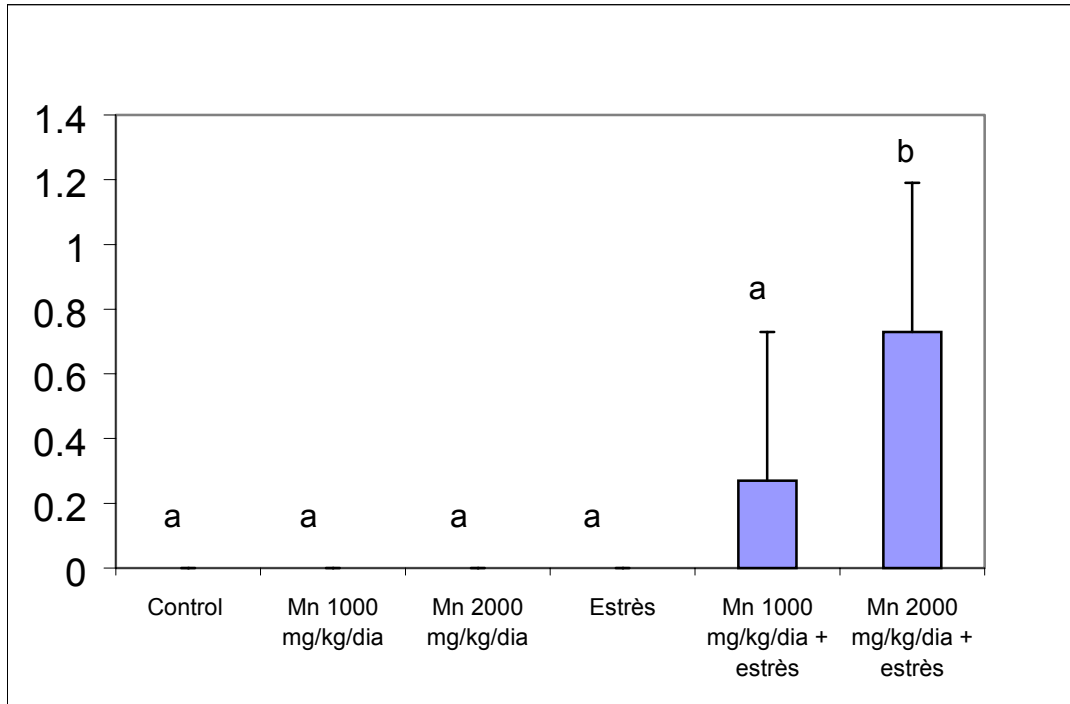


Figura IV.33. Mitjanes per grup en la variable “Piloerecció” en la Bateria d’Observació Funcional (“FOB”) al dia 90 de tractament. Diferents lletres (a, b) indiquen diferències estadísticament significatives entre grups ( $p < 0.05$ ).

El Mn afecta significativament ( $p < 0.001$ ) aquestes tres variables: vigilància, moviments tòncics i piloerecció. L’efecte de l’estrès es troba només en la variable vigilància ( $p < 0.05$ ) i en la piloerecció ( $p < 0.001$ ), mentre que la interacció (Mn x estrès) només afecta a la piloerecció.

El recompte de “rearings” durant la ”FOB” al dia 90 de tractament es mostra a la **figura IV.32**. No s’observen diferències significatives entre grups en aquesta variable.

La introducció del pes com a covariable en els anàlisis comentats no modifica els resultats.

### *Exàmens conductuals*

L'activitat motora dels animals va ser mesurada mitjançant un Camp Obert. Els paràmetres enregistrats es mostren a la **taula IV.34**.

Per a valorar l'habitució al Camp Obert es va efectuar un ANOVA per mesures repetides. Es va trobar un efecte del temps en les variables distància recorreguda i "rearings" a l'arena. També es va observar un efecte de la interacció entre el temps i el grup de tractament en els "rearings" ( $p < 0.05$ ).

Al dividir l'observació de 15 minuts en intervals de 5, es podien observar diferències significatives en la variable distància recorreguda a la zona centre dels 0 als 5 minuts i dels 5 als 10 minuts, i en la variable distància recorreguda a la perifèria dels 0 als 5 minuts, dels 5 als 10 minuts i dels 10 als 15 minuts. Es va observar un efecte general del Mn en les variables del Camp Obert ( $p < 0.05$ ) en conjunt, així com un efecte de l'estrès només en la variable distància recorreguda al centre dels 5 als 10 minuts ( $p < 0.05$ ) i distància recorreguda a la perifèria dels 0 als 5 minuts ( $p < 0.05$ ) (**taula IV.34**).

La variable distància total recorreguda al Camp Obert mostra una diferència significativa en els valors dels grups en l'interval de temps dels 10 als 15 minuts (**figura IV.35**). Aquesta diferència era deguda a l'efecte del Mn ( $p < 0.01$ ).

El pes dels animals en el moment de l'avaluació al Camp Obert, era una variable amb diferències significatives entre grups ( $p < 0.01$ ). A l'introduir el pes com a possible variable predictora juntament amb el grup de tractament, es veia que el pes no influïa en les variables del Camp Obert, mentre sí existia una influència del grup ( $p < 0.05$ ). Aquesta influència del grup, ara només afectava les variables distància recorreguda a la zona centre dels 0 als 5 minuts i distància recorreguda a la zona centre dels 5 als 10 minuts. Aquestes diferències eren degudes a l'estrès ( $p < 0.05$ ).

Taula IV.34. Variables avaluades en el Camp Obert en rates exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Distància recorreguda a la zona centre dels 0 als 5 minuts (cm)	189.94±173.43 <sup>ab</sup>	301.47±190.38 <sup>a</sup>	101.02±71.55 <sup>b</sup>	153.84±102.80 <sup>ab</sup>	178.01±139.02 <sup>ab</sup>	150.77±127.88 <sup>ab</sup>
Distància recorreguda a la zona centre dels 5 als 10 minuts (cm)	170.22±154.42 <sup>ab</sup>	279.02±180.52 <sup>a</sup>	103.69±124.57 <sup>b</sup>	163.24±155.37 <sup>ab</sup>	124.46±147.43 <sup>ab</sup>	82.52±82.86 <sup>b</sup>
Distància recorreguda a la zona centre dels 10 als 15 minuts (cm)	135.05±170.85	113.27±142.27	91.97±121.90	111.48±134.07	76.50±87.53	53.87±68.32
Distància recorreguda a la zona de la perifèria dels 0 als 5 minuts (cm)	2079.12±334.19 <sup>ab</sup>	1983.50±397.77 <sup>ab</sup>	1717.99±690.52 <sup>b</sup>	2468.79±570.31 <sup>a</sup>	2152.38±542.38 <sup>ab</sup>	1961.76±68.54 <sup>ab</sup>
Distància recorreguda a la zona de la perifèria dels 5 als 10 minuts (cm)	1437.13±426.13 <sup>ab</sup>	1455.83±501.79 <sup>ab</sup>	1175.15±515.38 <sup>b</sup>	1848.75±429.63 <sup>a</sup>	1407.57±388.60 <sup>ab</sup>	1293.36±481.53 <sup>ab</sup>
Distància recorreguda a la zona de la perifèria dels 10 als 15 minuts (cm)	1144.87±417.14 <sup>ab</sup>	796.88±375.25 <sup>ab</sup>	800.47±538.11 <sup>ab</sup>	1225.75±353.79 <sup>a</sup>	1060.02±415.83 <sup>ab</sup>	749.35±386.73 <sup>b</sup>
Nombre de “rearings” dels 0 als 5 minuts	26.20±5.36	27.87±5.63	25.53±7.49	29.33±3.27	26.40±7.56	28.67±7.03
Nombre de “rearings” dels 5 als 10 minuts	20.56±6.54	21.40±5.72	20.13±8.77	24.73±4.73	18.53±6.91	20.40±6.20
Nombre de “rearings” dels 10 als 15 minuts	17.87±6.92	11.40±5.74	16.27±10.40	17.40±5.73	14.87±7.55	13.87±6.32
Nombre de defecacions	1.40±1.40	2.20±1.82	0.47±1.36	1.53±2.39	2.13±2.07	0.67±1.29

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

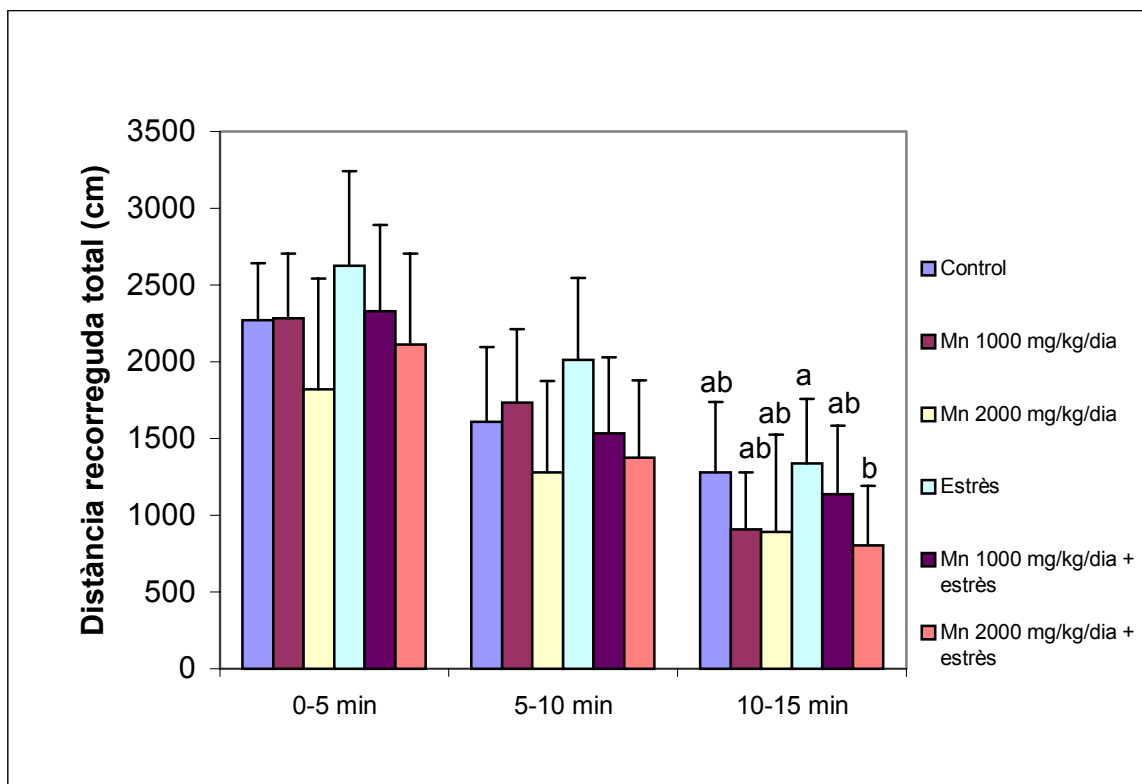


Figura IV.35. Distància total recorreguda al Camp Obert durant 15 minuts, dividida en intervals de 5 minuts. Diferents lletres indiquen diferències estadísticament significatives entre grups ( $p < 0.05$ ).

L'aprenentatge espacial es va mesurar mitjançant la prova del Laberint d'aigua o "Water maze". Aquesta prova consta de 5 dies d'adquisició de l'aprenentatge i un últim "trial" al 5è dia on s'ha avaluat la retenció, fent a l'animal nedar a la piscina ara sense plataforma i observant la seva búsqueda. Durant el període d'aprenentatge (els trials amb la plataforma) es van enregistrar els següents paràmetres: mitjana de la distància recorreguda durant cada dia pels animals, mitjana del temps que trigaven en trobar diàriament la plataforma, nombre de defecacions durant el primer intent de cada dia en el que van passar la prova, i distància

recorreguda. Durant el trial de retenció o trial “probe” es van enregistrar els següents paràmetres: temps al quadrant de la plataforma i nombre de defecacions.

A la *taula IV.36* es presenten els valors per grup respecte a la mitjana de la distància recorreguda per trobar la plataforma en els dies 1, 2, 3, 4 i 5. Hi ha diferències estadísticament significatives entre grups els dies 3, 4 i 5 en aquesta variable. Al dia 3, el grup control difereix significativament del grup tractat amb Mn-2000 i del grup tractat amb Mn-1000 + estrès, la qual cosa és deguda a l'efecte del Mn ( $p < 0.001$ ) i de la interacció (Mn x estrès) ( $p < 0.05$ ). Els dies 4 i 5, el grup control difereix significativament del grup tractat amb Mn a dosi alta, amb o sense estrès. Aquests efectes són deguts al Mn ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). A part dels resultats en el dia 3, no és mantenen, si en l'estadística afegim el pes dels animals com a covariable.

La *taula IV.37* resumeix els valors per grup del paràmetre avaluat: mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma els dies 1, 2, 3, 4, i 5. Existeixen diferències significatives entre grups en tots els dies, les quals són degudes a un efecte del factor Mn ( $p < 0.01$ ). Apart dels resultats en el dia 3, aquests efectes no es mantenen si en l'estadística s'introdueix el pes dels animals com a covariable.

No hi ha efectes del tractament en el nombre de defecacions durant l'adquisició (*taula IV.38*) ni tampoc en el nombre d'aquestes durant el trial “probe” (*taula IV.39*), que ens estarien donant informació sobre les diferències en reactivitat/emocionalitat dels animals.

En el trial “probe” (*taula IV.39*), on els resultats donen informació de la retenció de l'animal de l'aprenentatge de la localització de la plataforma, s'observen diferències significatives entre grups respecte a la distància recorreguda al quadrant de la plataforma, i també respecte al temps que estan nedant en aquest quadrant. L'anàlisi de factors mostra un efecte del Mn ( $p < 0.05$ ) en la distància recorreguda i un efecte del Mn ( $p < 0.01$ ) i de l'estrès ( $p < 0.05$ ) en el temps de permanència dels animals al quadrant. Aquests efectes no es mantenen si en l'estadística s'afegeix com a covariable el pes dels animals.

Taula IV.36. Variables avaluades a la prova del “Water Maze” o Laberint d’aigua de Morris en rates mascle exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes) (I).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14
Distància mitja recorreguda al dia 1 per trobar la plataforma	624.88±241.95	748.11±257.18	724.82±151.39	661.81±231.31	795.58±219.08	715.66±177.68
Distància mitja recorreguda al dia 2 per trobar la plataforma	505.72±315.55	642.45±338.07	763.30±276.31	691.45±196.76	508.70±219.51	683.65±206.28
Distància mitja recorreguda al dia 3 per trobar la plataforma	499.05±299.49 <sup>ac</sup>	618.68±258.85 <sup>abc</sup>	809.69±189.66 <sup>b</sup>	598.19±211.98 <sup>abc</sup>	460.35±192.23 <sup>c</sup>	671.31±161.72 <sup>abc</sup>
Distància mitja recorreguda al dia 4 per trobar la plataforma	337.65±199.04 <sup>a</sup>	470.70±195.71 <sup>ab</sup>	678.95±280.83 <sup>b</sup>	509.49±226.65 <sup>ab</sup>	460.37±272.49 <sup>ab</sup>	618.60±167.09 <sup>b</sup>
Distància mitja recorreguda al dia 5 per trobar la plataforma	370.11±240.77 <sup>a</sup>	534.36±236.10 <sup>ab</sup>	682.22±269.86 <sup>b</sup>	546.59±250.84 <sup>ab</sup>	495.21±313.52 <sup>ab</sup>	653.41±193.08 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).





Taula IV.37. Variables avaluades a la prova del “Water Maze” o Laberint d’aigua de Morris en rates mascle exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes) (II).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 1	31.87±12.68 <sup>a</sup>	37.53±10.37 <sup>abc</sup>	47.00±12.77 <sup>bc</sup>	35.21±9.97 <sup>ab</sup>	42.13±11.10 <sup>abc</sup>	49.11±10.12 <sup>c</sup>
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 2	22.36±12.85 <sup>a</sup>	28.23±14.51 <sup>ab</sup>	39.68±17.55 <sup>b</sup>	32.87±12.65 <sup>ab</sup>	24.21±13.30 <sup>ab</sup>	37.34±15.87 <sup>ab</sup>
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 3	22.88±15.33 <sup>ac</sup>	25.21±12.41 <sup>ac</sup>	44.31±15.48 <sup>b</sup>	25.94±10.29 <sup>ac</sup>	18.32±7.67 <sup>c</sup>	34.41±14.80 <sup>ab</sup>
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 4	16.04±10.26 <sup>a</sup>	20.99±11.53 <sup>ab</sup>	34.53±17.48 <sup>b</sup>	22.87±11.21 <sup>ab</sup>	19.17±12.28 <sup>a</sup>	28.41±12.60 <sup>ab</sup>
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 5	17.72±12.29 <sup>a</sup>	24.05±13.97 <sup>ab</sup>	34.68±16.93 <sup>b</sup>	23.62±10.67 <sup>ab</sup>	20.70±13.92 <sup>ab</sup>	29.57±12.85 <sup>ab</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.38. Variables avaluades a la prova del “Water Maze” o Laberint d’aigua de Morris en rates mascle exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes) (III).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14
Defecacions durant el 1er intent al dia 1	2.1±1.3	2.5±1.4	3.1±1.5	2.2±1.5	3.0±2.4	2.6±1.3
Defecacions durant el 1er intent al dia 2	2.2±1.6	2.1±1.6	2.2±1.4	1.9±1.5	2.1±1.5	1.9±0.9
Defecacions durant el 1er intent al dia 3	3.1±1.6	2.9±1.3	2.4±1.8	2.4±1.8	2.1±1.5	2.2±1.8
Defecacions durant el 1er intent al dia 4	2.2±1.5	2.4±1.4	2.7±1.6	2.0±1.5	2.1±1.5	2.4±1.3
Defecacions durant el 1er intent al dia 5	2.6±2.0	2.6±1.3	2.9±1.4	1.9±1.6	2.2±1.6	2.3±1.4

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.39. Variables avaluades a la prova del “Water Maze” o Laberint d’aigua de Morris en rates mascle exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes) (IV).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14	n = 15	n = 14
Distància recorreguda al quadrant de la plataforma al trial “probe”	682.04±217.25 <sup>ab</sup>	699.34±180.08 <sup>ab</sup>	505.61±192.74 <sup>a</sup>	695.91±154.57 <sup>ab</sup>	718.70±132.21 <sup>b</sup>	675.89±207.57 <sup>ab</sup>
Temps al quadrant de la plataforma al trial “probe”	14.47±4.15 <sup>a</sup>	13.50±4.24 <sup>ab</sup>	10.00±3.98 <sup>b</sup>	15.39±3.50 <sup>a</sup>	15.67±3.80 <sup>a</sup>	13.11±4.21 <sup>ab</sup>
Defecacions durant el trial “probe”	0.07±0.26	0.07±0.27	0.07±0.26	0.50±0.94	0.00±0.00	0.14±0.36

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Finalment, per avaluar l'aprenentatge contextual es va aplicar als animals un test d'Evitació Passiva (*taula IV.40*), basat en el model de condicionament clàssic. L'anàlisi de la variança per mesures repetides, utilitzant el dia del test com a mesura repetida, va avaluar les diferències entre la latència en el dia d'adquisició (T1) i la latència 24 hores després en el dia de retenció (T2). La latència per entrar al compartiment fosc va ser significativament més alta en tots els grups, la qual cosa indica que hi ha hagut aprenentatge. No es van trobar diferències significatives en el nombre d'animals que van arribar al criteri d'aprenentatge de la tasca ( $T2 > 5$  min) 24 hores després de l'adquisició. Tampoc es van observar diferències significatives en els valors absoluts de T1, T2, nombre de defecacions en el dia d'adquisició i defecacions en el dia de retenció. Tot i això, les defecacions van augmentar significativament al 2on dia en tots els grups (*taula IV.40*).

Les concentracions de Mn a cervell i cerebel van ser significativament més altes en els grups tractats amb Mn respecte els grups control i control estressat. Només en cervell es van observar diferències significatives entre els grups tractats amb Mn, on els animals que rebien la dosi més alta mostraven també un augment significatiu de les concentracions respecte al grup tractat amb la dosi baixa (*figura IV.41*).

Taula IV.40. Variables avaluades a la prova d'Evitació Passiva en rates mascle exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes).

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1000	2000	0	1000	2000
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre d'animals	n = 13	n = 12	n = 14	n = 12	n = 13	n = 14
Temps en segons en passar al compartiment fosc el 1er dia (T-1)	29.14±20.68	25.39±38.81	19.76±10.61	38.96±49.31	31.80±21.73	21.08±15.59
Temps en segons en passar al compartiment fosc el 2on dia (T-2)	298.00±0.00	273.63±84.41	298.00±0.00	298.00±0.00	278.07±71.86	298.00±0.00
Percentatge de subjectes que aprenen la tasca	100%	92%	100%	100%	92%	100%
Nombre de defecacions en T-1	1.15±1.21	0.92±1.08	1.35±1.55	0.08±0.29	1.00±2.00	0.71±0.82
Nombre de defecacions en T-2	2.85±2.67	3.33±1.83	3.71±1.49	2.08±2.35	4.77±2.39	2.93±2.43

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

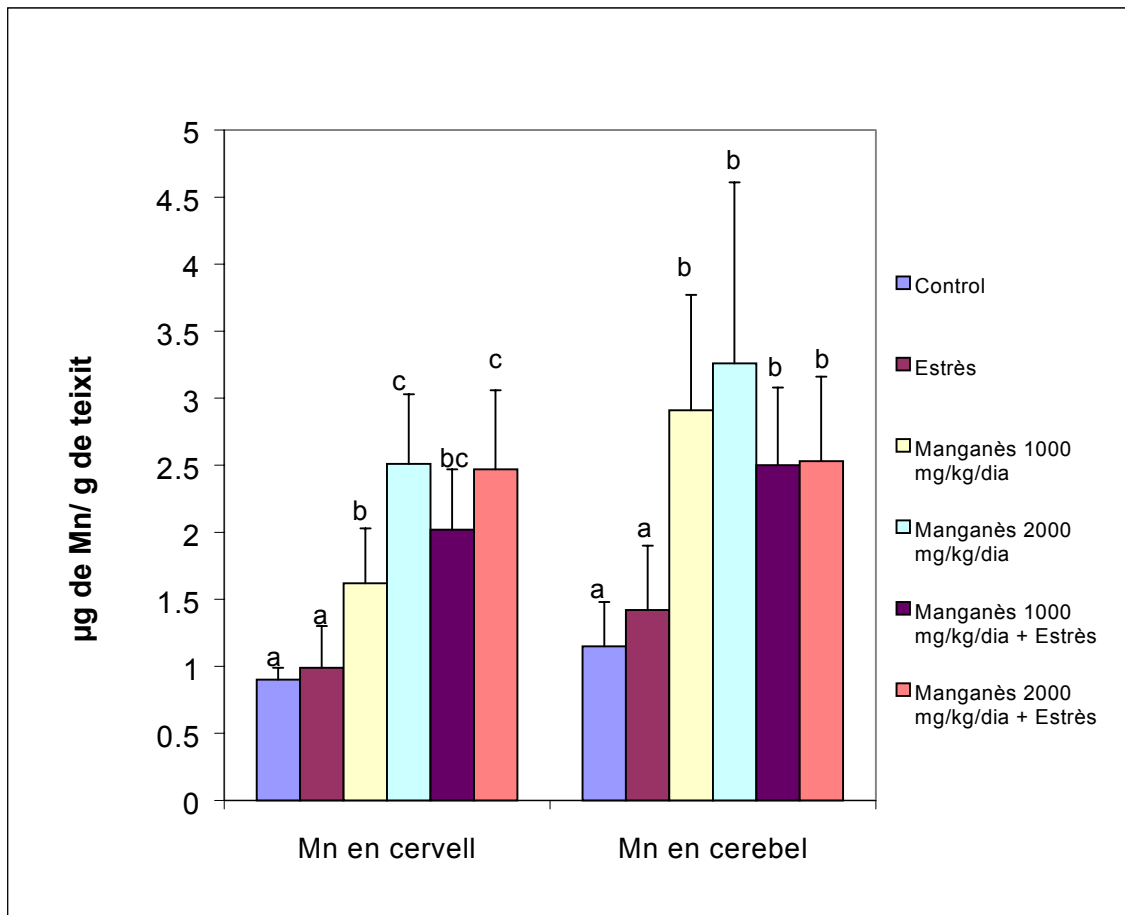


Figura IV.41. Concentracions de Mn en cervell i cerebel de rates mascles exposades crònicament a Mn i estrès (19 setmanes). Diferents lletres (a, b, c) indiquen diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

Es van analitzar les correlacions entre les variables independents Mn i estrès i algunes variables dependents de la prova Camp Obert, Laberint d'aigua de Morris, pes del cervell i de l'animal, i nivells de Mn (*taula IV.42*).

El Mn correlacionava significativament i positivament amb: la mitjana del pes, el temps que els animals trigaven en trobar la plataforma al dia 1, 2, 3, 4 i 5, i amb els nivells de Mn al cervell i cerebel. Significativament però de forma negativa amb: el total de la distància recorreguda al Camp Obert, el total de la distància recorreguda a la zona de la perifèria, temps al quadrant de la plataforma durant el trial "probe" en el Laberint d'aigua, i amb el pes del cervell i el pes de l'animal.

A l'efectuar les correlacions parcials amb les mateixes variables, traient la possible influència del pes de l'animal, es mantien significatives les correlacions entre la dosi de Mn i els nivells de Mn al cervell, així com entre la dosi de Mn i els nivells de Mn al cerebel. L'estrès només correlacionava significativament i positivament amb la variable temps al quadrant de la plataforma al trial "probe". Tanmateix, aquesta correlació desapareixia com a significativa en treure el possible efecte del pes (correlació parcial).

A la *taula IV.43* es mostren les correlacions entre la concentracions de Mn en cervell i la concentració de Mn en cerebel, i algunes variables dependents de la prova Camp Obert, Laberint d'aigua de Morris, pes del cervell i de l'animal i nivells de Mn. Les correlacions que apareixen van en el sentit de que a major concentració de Mn (tant en cervell com en cerebel), els animals aprenen menys que els controls, tot i que quan la correlació és parcial (traient la possible influència del pes), aquestes correlacions no eren significatives.

Finalment, a la *taula IV.44* es mostra una graella de correlacions entre les defecacions comptabilitzades en les proves de comportament.

Taula IV.42. Correlacions totals (r) i parcials (rp) traient la influència del pes entre variables avaluades i tractament amb Mn i estrès.		
	Mn	Estrès
Distància total recorreguda al Camp Obert	r: -0.407** rp: --	r: -- rp: --
Distància total recorreguda a la zona de la perifèria al Camp Obert	r: -0.404** rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 1	r: 0.474** rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 2	r: 0.293** rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 3	r: 0.406** rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 4	r: 0.361** rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 5	r: 0.332** rp: --	r: -- rp: --
Temps al quadrant de la plataforma al trial "probe"	r: -0.324** rp: --	r: 0.245* rp: --
Pes cervell	r: -0.607** rp: --	r: -- rp: --
Pes animal	r: -0.877** rp: --	r: -- rp: --
Nivells de Mn al cervell	r: 0.832** rp: 0.599**	r: -- rp: --
Nivells de Mn al cerebel	r: 0.630** rp: 0.451**	r: -- rp: --
*Correlacions significatives p<0.05		**Correlacions significatives p<0.01



Taula IV.43. Correlacions totals (r) i parcials (rp) traient la influència del pes entre variables avaluades i concentracions de Mn en cervell i cerebel.		
	Concentració de Mn en cervell	Concentració de Mn en cerebel
Distància total recorreguda al Camp Obert	r: -0.348** rp: --	r: -0.280* rp: --
Distància total recorreguda a la zona de la perifèria al Camp Obert	r: -0.349** rp: --	r: -0.295* rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 1	r: -- rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 2	r: -- rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 3	r: -- rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 4	r: 0.306* rp: --	r: -- rp: --
Mitjana del temps que triguen en trobar la plataforma al dia 5	r: 0.257* rp: --	r: -- rp: --
Temps al quadrant de la plataforma al trial "probe"	r: -0.254* rp: --	r: -- rp: --
*Correlacions significatives p<0.05		**Correlacions significatives p<0.01

Taula IV.44. Correlacions de les defecacions de les rates mascles exposades crònicament a Mn i estrès en les diferents proves conductuals. Correlacions totals (r) i parcials (rp) traient la influència del pes.

	Defecacions al Camp Obert	Defecacions a la prova d'Evitació Passiva T-2	Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 1	Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 2	Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 3	Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 4	Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 5	Defecacions a la "FOB", dia 16 de tractament
Defecacions al Camp Obert								
Defecacions a la prova d'Evitació Passiva T-2	r: 0.243* rp: 0.296*							
Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 1	r: -- rp: 0.242*	r: 0.291* rp: 0.265*						
Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 2	r: -- rp: 0.287*	r: -- rp: --	r: 0.340** rp: 0.327**					
Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 3	r: -0.229* rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: 0.218* rp: --				
Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 4	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: 0.307** rp: 0.296**			
Defecacions al Laberint d'aigua intent 1-dia 5	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: 0.238* rp: 0.232*	r: 0.220* rp: 0.240*	r: -- rp: --		
Defecacions a la "FOB", dia 16 de tractament	r: 0.276** rp: 0.299**	r: 0.258* rp: 0.279*	r: 0.275* rp: 0.262*	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	r: -- rp: --	
*Correlacions significatives p<0.05				**Correlacions significatives p<0.01				

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

L'experiment actual tenia com objectiu valorar diferents paràmetres físics i conductuals d'animals sotmesos a tres tipus d'estrès, estrès per immobilització / 5 dies a la setmana, estrès per soroll continu (2 hores diàries de soroll continu / 5 dies a la setmana), i estrès per soroll discontinu (6 hores diàries a intervals del 33% / 5 dies a la setmana) durant un període de 21 dies (3 setmanes).

##### *Paràmetres físics*

La **taula IV.45** mostra la ingesta de menjar durant el període d'estrès (21 dies), en els diferents grups: grup control i grups estressats (per immobilització "restraint", per soroll continu i per soroll discontinu). Es van observar diferències significatives en els períodes: del dia 1 al 5, i del dia 5 al 8. També es van observar diferències significatives entre els grups quan observàvem el període íntegre de tractament.

En el període del dia 1 al 5 de tractament, s'observen diferències significatives entre els grups control i "restraint", i el de soroll continu. En el període del 5 al 8 de tractament s'observen diferències significatives entre els grups control i "restraint".

A l'avaluar la ingesta de menjar durant el període íntegre de tractament, es pot veure que existeixen diferències significatives entre els grups control i tots els demés grups estressats. Els animals del grup control mengen significativament més que tots els dels altres grups estressats, per un o altre mètode.

L'anàlisi per mesures repetides va mostrar un efecte del temps i un efecte del grup de tractament en el menjar consumit.

La *taula IV.46* presenta els valors per grup respecte al pes dels animals i l'increment de pes durant el període de tractament. Només apareixen diferències significatives entre grups en el pes dels animals els dies 5 i 12 de tractament, on el grup control difereix significativament del grup soroll continu. No apareixen diferències entre la resta de grups. Tampoc es van observar diferències en l'increment total de pes dels animals durant el període global de tractament.

L'anàlisi per mesures repetides va mostrar un efecte del temps i un efecte del grup de tractament en el pes dels animals durant el període de tractament.

Taula IV.45. Ingesta de menjar durant el període de tractament de rates estressades durant 21 dies.

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 11	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval n = 12
Menjar consumit del dia 1 al 5 de tractament	104.46± 4.04 <sup>a</sup>	93.25±5.08 <sup>b</sup>	97.34±3.27 <sup>b</sup>	104.12±7.40 <sup>a</sup>
Menjar consumit del dia 5 al 8 de tractament	96.17±30.59 <sup>a</sup>	78.04±2.65 <sup>b</sup>	79.45±4.82 <sup>ab</sup>	81.55±1.98 <sup>ab</sup>
Menjar consumit del dia 8 al 12 de tractament	107.94±7.92	101.92±5.06	105.84±11.57	103.16±1.14
Menjar consumit del dia 12 al 15 de tractament	78.37±2.85	78.40±2.90	78.59±5.86	75.52±1.85
Menjar consumit del dia 15 al 19 de tractament	139.03±49.30	102.22±2.04	103.25±7.24	102.18±3.63
Menjar consumit del dia 19 al 21 de tractament	77.53±1.82	79.21±4.69	77.76±6.21	77.39±4.07
Menjar consumit del dia 1 al 21 de tractament	603.49±50.87 <sup>a</sup>	533.03±12.63 <sup>b</sup>	542.22±35.96 <sup>b</sup>	543.92±17.06 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.46. Pes i increment de pes durant el període de tractament de rates estressades durant 21 dies.

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 11	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a intervals n = 12
Pes al dia 1 de tractament	258.41±24.71	244.71±37.07	234.42±28.26	257.46±13.56
Pes al dia 5 de tractament	285.83±19.42 <sup>a</sup>	266.81±27.72 <sup>ab</sup>	260.10±22.09 <sup>b</sup>	285.66±16.82 <sup>ac</sup>
Pes al dia 12 de tractament	328.45±18.26 <sup>a</sup>	309.65±26.12 <sup>ab</sup>	303.31±20.35 <sup>b</sup>	323.58±20.94 <sup>ab</sup>
Pes al dia 19 de tractament	358.41±17.03	338.27±23.96	333.13±24.91	351.42±26.90
Pes al dia 21 de tractament	373.05±17.05	352.42±26.74	348.06±27.33	371.42±28.87
Increment de pes entre els dies 1 i 5	27.41±7.60	22.10±10.87	25.68±9.50	28.20±4.31
Increment de pes entre els dies 1 i 21	114.63±19.01	107.71±24.68	113.64±30.00	113.96±19.78

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

### *Paràmetres conductuals*

Es va mesurar l'activitat dels animals mitjançant la prova del Camp Obert. Els paràmetres avaluats es troben a les **taules IV.47, 48, 50, 51, 52**. Si s'observen els 15 minuts conjuntament, es veu que existeixen diferències entre grups en quant als "rearings" en tot el Camp Obert, els "rearings" al centre, i la velocitat a la zona centre (**taula IV.51**).

Per avaluar l'habitució en aquesta prova es va efectuar un anàlisi per mesures repetides, el qual va mostrar un efecte del temps en les variables distància recorreguda al Camp Obert o "Open field", distància recorreguda a la zona centre, velocitat, "rearings", temps absolut a la zona centre, i percentatge de temps al centre (**taula IV.50**). A la variable "rearings" també es va observar un efecte del grup en les mesures repetides.

Hi ha diferències significatives entre grups, quan dividim el període d'observació (15 minuts) en intervals de 5 minuts en les variables distància total recorreguda al Camp Obert dels 0 als 5 minuts (**taula IV.47**), velocitat a l'arena dels 0 als 5 minuts (**taula IV.48**), i "rearings" dels 0 als 5 minuts, dels 5 als 10 minuts i dels 10 als 15 minuts (**taula IV.48 i figura IV.49**). En quant als "rearings", el grup control efectua significativament menys "rearings" respecte del grup estressat per soroll discontinu.

Altrament, es pot observar un augment estadísticament significatiu del nombre de defecacions al Camp Obert del grup estressat amb soroll discontinu respecte al grup control (**taula IV.52 i gràfica IV.53**).

Finalment, els animals no diferien en quant al seu pes corporal en el temps en que van passar la prova del Camp Obert (**taula IV.52**).

Taula IV.47. Variables avaluades en la prova del Camp Obert en rates estressades durant 21 dies (I).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control)	Immobilització ("Restraint")	Soroll continu (2h)	Soroll discontinu o a intervals
	n = 10	n = 10	n = 12	n = 12
Distància total recorreguda, dels 0 als 5 minuts (cm)	2174.12±257.39 <sup>ab</sup>	2458.12±390.90 <sup>ab</sup>	2133.92±206.25 <sup>a</sup>	2506.74±437.38 <sup>b</sup>
Distància total recorreguda, dels 5 als 10 minuts (cm)	1534.71±544.06	1456.14±670.84	1436.71±475.42	1505.65±422.65
Distància total recorreguda, a la zona centre, dels 10 als 15 minuts (cm)	930.95±383.50	1211.93±651.28	1012.36±330.38	1019.96±504.20
Distància recorreguda a la zona centre, dels 0 als 5 minuts (cm)	165.17±60.73	218.50±157.68	295.57±164.81	314.99±206.04
Distància recorreguda a la zona centre, dels 5 als 10 minuts (cm)	99.73±107.06	188.91±186.39	220.60±175.51	193.05±125.46
Distància recorreguda a la zona centre, dels 10 als 15 minuts (cm)	74.26±111.61	118.68±154.52	129.21±90.90	100.31±91.79

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).



Taula IV.48. Variables avaluades en la prova del Camp Obert en rates estressades durant 21 dies (II).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a intervals n = 12
Velocitat a l'arena, dels 0 als 5 minuts	7.33±0.87 <sup>ab</sup>	8.27±1.31 <sup>ab</sup>	7.18±0.69 <sup>a</sup>	8.43±1.46 <sup>b</sup>
Velocitat a l'arena, dels 5 als 10 minuts	5.17±1.84	4.91±2.26	4.84±1.61 <sup>a</sup>	5.08±1.42
Velocitat a l'arena, dels 10 als 15 minuts	3.14±1.30	4.09±2.20	3.42±1.12	3.45±1.70
"Rearings", dels 0 als 5 minuts	15.50±5.84 <sup>a</sup>	20.40±5.76 <sup>a</sup>	13.58±6.22 <sup>a</sup>	29.08±10.09 <sup>b</sup>
"Rearings", dels 5 als 10 minuts	12.70±3.40 <sup>a</sup>	15.60±3.87 <sup>ab</sup>	13.33±7.20 <sup>a</sup>	21.92±7.27 <sup>b</sup>
"Rearings", dels 10 als 15 minuts	7.90±4.01 <sup>a</sup>	15.00±8.04 <sup>ab</sup>	12.42±7.91 <sup>ab</sup>	17.58±9.83 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

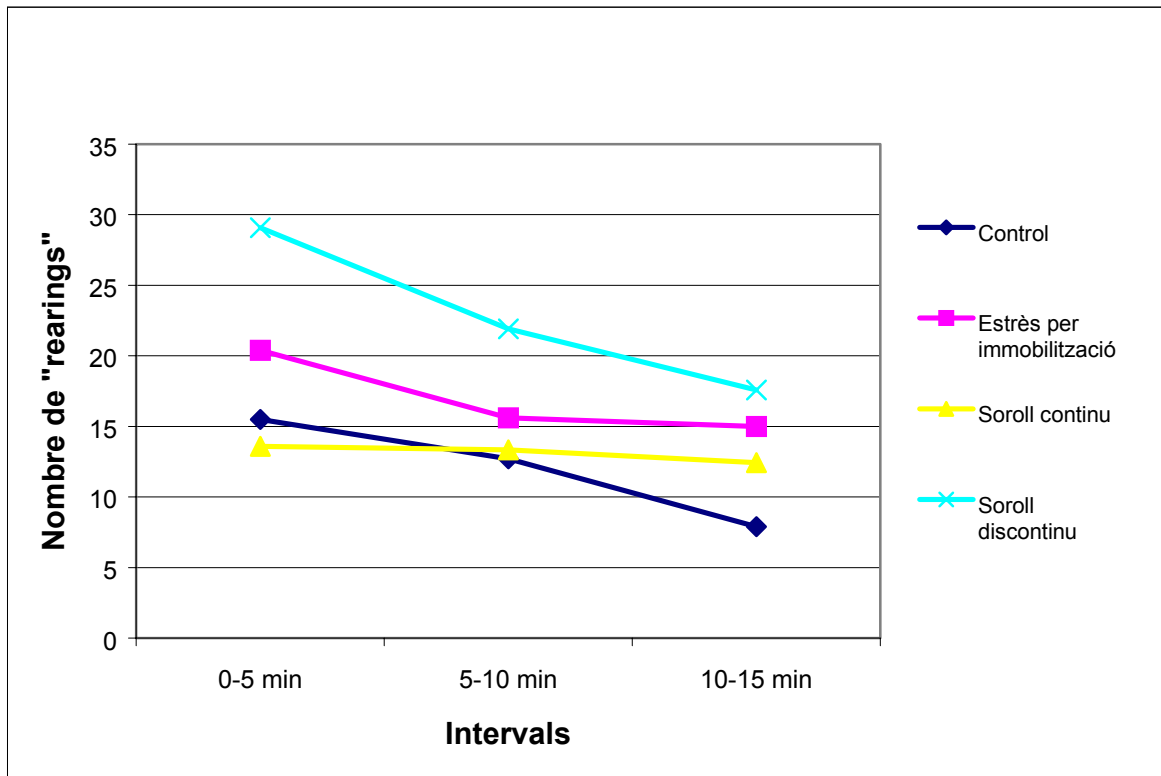


Figura IV.49. Nombre de “rearings” efectuats al Camp Obert per intervals i per cada grup estressat (les significacions estadístiques estan especificades a la taula IV.48).

Taula IV.50. Variables avaluades en la prova del Camp Obert en rates estressades durant 21 dies (III).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval n = 12
Temps a la zona centre dels 0 als 5 minuts (s)	21.50±10.56	21.40±16.63	37.42±19.10	27.50±19.39
Temps a la zona centre dels 5 als 10 minuts (s)	13.50±12.00	22.40±19.89	34.00±27.05	28.25±34.02
Temps a la zona centre dels 10 als 15 minuts (s)	8.30±9.79	15.90±17.22	23.00±17.56	10.92±12.74
Percentatge (%) de temps que passen a la zona centre dels 0 als 5 minuts	7.17±3.52	7.13±5.54	12.47±6.37	9.17±6.46
Percentatge (%) de temps que passen a la zona centre dels 5 als 10 minuts	4.51±4.01	7.49±6.65	11.37±9.05	9.45±11.38
Percentatge (%) de temps que passen a la zona centre dels 10 als 15 minuts	2.78±3.27	5.32±5.76	7.71±5.87	3.65±4.26

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.51. Variables avaluades en la prova del Camp Obert en rates estressades durant 21 dies (IV).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control)	Immobilització ("Restraint")	Soroll continu (2h)	Soroll discontinu o a intervals
	n = 10	n = 10	n = 12	n = 12
Distància total recorreguda a l'arena (cm)	4639.77±924.60	5126.19±1465.52	4582.99±929.93	5032.35±1028.63
Distància total recorreguda a la zona centre (cm)	339.17±184.75	526.09±457.41	645.38±387.58	608.35±350.29
Nombre de "rearings" totals a l'arena	36.10±10.60 <sup>a</sup>	51.00±18.61 <sup>ab</sup>	39.33±19.85 <sup>a</sup>	68.58±22.90 <sup>b</sup>
Nombre de "rearings" totals a la zona centre	2.40±1.17 <sup>a</sup>	4.40±3.95 <sup>ab</sup>	4.67±3.65 <sup>ab</sup>	8.42±7.80 <sup>b</sup>
Velocitat a l'arena	5.22±1.04	5.76±1.65	5.15±1.05	5.66±1.15
Velocitat a la zona centre	8.03±3.18 <sup>ab</sup>	11.02±3.93 <sup>ab</sup>	8.08±2.06 <sup>a</sup>	12.28±2.00 <sup>b</sup>
Temps a la zona centre	43.30±22.22	59.70±48.49	94.42±56.62	66.67±53.55
Percentatge (%) de temps a la zona centre	12.61±5.70	16.40±12.83	26.41±15.56	19.83±17.55

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.52. Variables avaluades en la prova del Camp Obert en rates estressades durant 21 dies (V).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a intervals n = 12
Nombre de defecacions	1.70±2.00 <sup>a</sup>	2.30±3.16 <sup>ab</sup>	2.58±2.54 <sup>ab</sup>	5.17±3.07 <sup>b</sup>
Pes (g)	372.00±17.66	352.50±26.82	348.08±27.37	371.42±28.87

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).



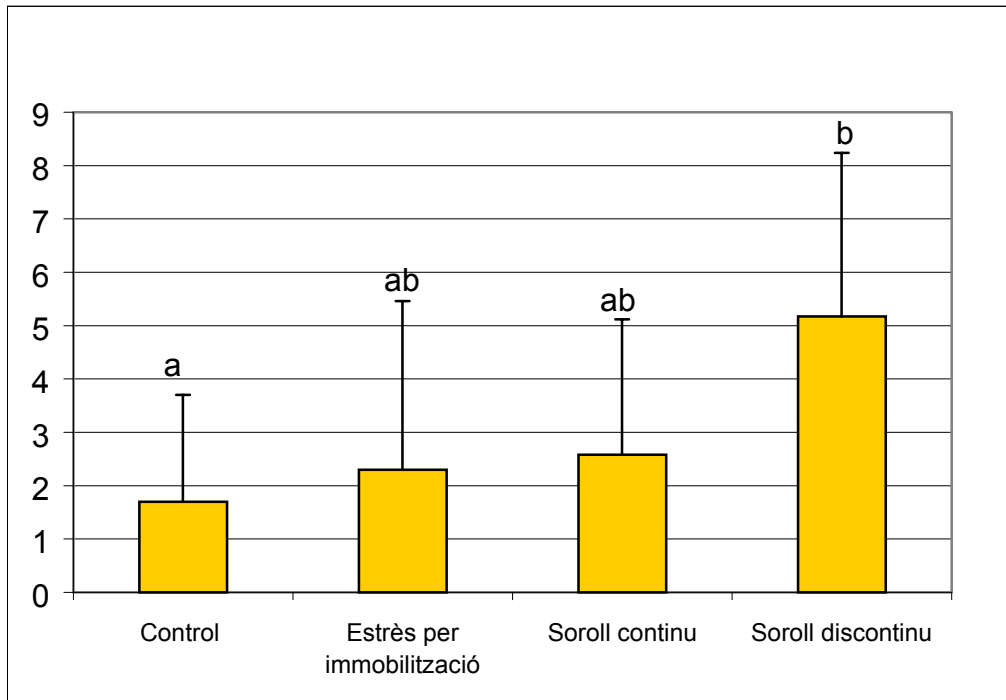


Figura IV.53. Nombre de defecacions efectuades a la prova del Camp Obert.

Els animals no van mostrar diferències significatives en el pes corporal en el moment de passar la prova de l'Evitació Activa, la qual avalua l'aprenentatge dels animals. Observant els paràmetres avaluats en la prova dia a dia, es troben diferències significatives en el nombre de defecacions al 3er dia, en la latència al 4rt dia (*taula IV.54*), en les evitacions al 3er i 4rt dia, i en els escapaments al 3er dia (*taula IV.56*).

L'anàlisi d'aquests paràmetres per mesures repetides indica un efecte del temps en les variables latència, "intercrossings", trials sense moure's, i evitacions. A més, es troba en la variable "intercrossings" un efecte del tractament.

Si s'observa els paràmetres totals (agafant la suma dels valors de cada paràmetre en els 4 dies), es veuen diferències significatives entre grups en les variables nombre de defecacions, evitacions totals, i escapaments totals. Hi ha una disminució significativa de les defecacions en els grups "restraint" i soroll discontinu respecte el control. Hi ha també un augment significatiu de les evitacions totals en el grup de soroll discontinu respecte el control, i un augment significatiu dels escapaments totals en el grup de soroll continu respecte el control (*taula IV.57*).

Taula IV.54. Variables avaluades en la prova d'Evitació Activa en rates estressades durant 21 dies (I).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control)	Immobilització ("Restraint")	Soroll continu (2h)	Soroll discontinu o a intervals
	n = 10	n = 10	n = 12	n = 12
Pes (g)	372.00±17.66	352.50±26.82	348.08±27.37	371.42±28.87
Nombre de defecacions 1er dia	7.00±3.37	4.20±2.82	6.58±3.32	5.58±2.27
Nombre de defecacions al 2on dia	7.00±3.43	3.80±2.53	5.58±3.20	4.92±3.00
Nombre de defecacions al 3er dia	8.30±2.71 <sup>a</sup>	4.80±3.19 <sup>ab</sup>	4.92±4.12 <sup>ab</sup>	3.17±2.21 <sup>b</sup>
Nombre de defecacions al 4rt dia	6.60±3.24	3.10±1.20	6.17±3.27	4.42±3.85
Latència total al 1er dia	474.94±224.37	452.41±179.42	419.10±136.74	385.36±202.82
Latència total al 2on dia	471.40±231.06	443.41±183.11	486.89±187.03	350.02±201.25
Latència total al 3er dia	412.52±254.25	353.85±197.79	367.40±139.73	234.20±73.92
Latència total al 4rt dia	375.56±252.19 <sup>ab</sup>	307.68±149.37 <sup>ab</sup>	342.63±141.44 <sup>a</sup>	216.13±41.58 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a</sup>,<sup>b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).



Taula IV.55. Variables avaluades en la prova d'Evitació Activa en rates estressades durant 21 dies (II).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval·ls n = 12
"Intercrossings" del 1er dia	14.40±11.20	14.70±8.93	21.83±15.10	19.67±16.73
"Intercrossings" del 2on dia	12.90±10.92	16.40±8.00	14.17±12.19	22.58±19.85
"Intercrossings" del 3er dia	21.00±19.78	20.20±13.26	17.42±10.97	28.58±20.30
"Intercrossings" del 4rt dia	22.70±17.21	20.30±12.86	21.33±9.71	37.58±21.89
Trials sense moure's del 1er dia	20.80±20.67	16.90±19.31	12.00±14.92	12.42±18.45
Trials sense moure's del 2on dia	20.50±22.26	16.50±19.56	20.42±19.12	10.17±16.65
Trials sense moure's del 3er dia	17.40±21.17	9.90±17.63	8.17±12.81	0.75±2.30
Trials sense moure's del 4rt dia	14.30±22.39	6.20±12.37	7.08±13.25	8.33±0.29

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.56. Variables avaluades en la prova d'Evitació Activa en rates estressades durant 21 dies (III).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval n = 12
Evitacions del 1er dia	9.80±13.25	4.50±5.08	4.17±9.79	12.25±9.17
Evitacions del 2on dia	9.00±12.50	5.10±5.57	3.83±5.77	16.33±15.19
Evitacions del 3er dia	15.90±16.59 <sup>ab</sup>	11.90±14.03 <sup>ab</sup>	6.17±7.49 <sup>a</sup>	23.25±13.95 <sup>b</sup>
Evitacions del 4rt dia	17.80±18.02 <sup>ab</sup>	15.50±13.85 <sup>ab</sup>	10.08±9.72 <sup>a</sup>	27.03±12.21 <sup>b</sup>
Escapaments del 1er dia	19.40±14.40	28.60±17.82	33.83±12.80	25.33±12.07
Escapaments del 2on dia	20.50±16.39	28.40±17.76	25.75±16.49	23.50±12.58
Escapaments del 3er dia	16.70±11.52 <sup>a</sup>	28.20±16.03 <sup>ab</sup>	35.67±10.90 <sup>b</sup>	26.00±12.92 <sup>ab</sup>
Escapaments del 4rt dia	17.90±16.13	28.30±11.78	32.83±12.82	22.83±12.80

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a</sup>,<sup>b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.57. Variables avaluades en la prova d'Evitació Activa en rates estressades durant 21 dies (IV).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval n = 12
Nombre de defecacions totals	28.90±8.06 <sup>a</sup>	15.90±6.76 <sup>b</sup>	23.25±11.34 <sup>ab</sup>	18.08±8.92 <sup>b</sup>
Latència total	1734.42±935.41	1557.35±674.03	1616.02±469.57	1185.72±484.83
Evitacions totals	52.50±58.06 <sup>ab</sup>	37.00±34.03 <sup>ab</sup>	24.25±21.96 <sup>a</sup>	78.92±47.50 <sup>b</sup>
Escapaments totals	75.50±52.40 <sup>a</sup>	113.50±50.79 <sup>ab</sup>	128.08±37.29 <sup>b</sup>	97.67±33.29 <sup>ab</sup>
"Intercrossings" totals	71.00±55.33	71.60±35.56	74.75±40.10	108.42±73.77
Trials sense moure's totals	73.00±83.81	49.50±65.03	47.67±44.79	23.42±35.67

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a,b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Altrament, no s'han observat diferències significatives entre grups en els nivells de corticosterona, ni tampoc en el pes de les glàndules adrenals dels animals (*taula IV.58*).

Quan es van calcular les correlacions entre els nivells de corticosterona i el pes de les glàndules adrenals amb el nombre de defecacions (índex de reactivitat) en la prova del Camp Obert i en el test d'Evitació Activa (*taula IV.59*), es va observar una correlació positiva i estadísticament significativa entre els nivells de corticosterona dels animals i el pes de les seves glàndules adrenals; així com correlacions negatives entre els nivells de corticosterona i les defecacions en el test d'Evitació Activa al 3er i 4rt dia, i en les defecacions totals en aquest test.

Es van calcular també les correlacions entre els nivells de corticosterona i el pes de les glàndules adrenals amb paràmetres avaluats a les proves de comportament (*taula IV.60*). Només es troben correlacions negatives entre els “intercrossings” al 1er i 3er dia amb el pes de les glàndules adrenals.

Taula IV.58. Nivells de corticosterona i pes de les glàndules adrenals de rates exposades a estrès (durant 21 dies).

Tipus d'estrès	Cap (grup Control) n = 10	Immobilització ("Restraint") n = 10	Soroll continu (2h) n = 12	Soroll discontinu o a interval n = 12
µg de corticosterona / ml de sèrum	389.67±134.90	397.20±100.74	431.63±162.74	470.61±249.21
Pes de les glàndules adrenals (g)	0.026±0.004	0.025±0.004	0.025±0.002	0.028±0.004

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.59. Correlacions entre els nivells de corticosterona en sang i el pes de les glàndules adrenals, i nombre de defecacions durant les proves de comportament.

	Corticosterona	Adrenals
Adrenals	0.344*	--
Defecacions 1er dia en l'Evitació Activa	--	--
Defecacions 2on dia en l'Evitació Activa	--	--
Defecacions 3er dia en l'Evitació Activa	-0.339*	--
Defecacions 4rt dia en l'Evitació Activa	-0.404*	--
Defecacions totals en l'Evitació Activa	-0.362*	--
Defecacions al Camp Obert	--	--
*Correlacions significatives $p < 0.05$		**Correlacions significatives $p < 0.01$



*“Tot succeeix per alguna raó”*

*Gottfried Wilhelm Leibniz*

*“Investigar és veure el que  
tothom ha vist i pensar el que  
ningú més ha pensat”*

*Albert Szent-Györgi*



## V. DISCUSSIÓ

### 1. Efectes materno i fetotòxics de l'exposició prenatal a hidrocortisona (HC) i manganès (Mn).

Tot i que els estudis amb animals suggereixen que una exposició important a Mn produiria efectes en el desenvolupament (Barceloux, 1999), una recent avaluació de la literatura publicada ha mostrat poca evidència de que el Mn s'acumuli a l'organisme fetal o neonatal sota condicions d'exposició a elevades concentracions d'aquest element (Fechter, 1999). Tanmateix, un nombre important d'estudis amb rosegadors (ratolins i rates), ha demostrat que el Mn creua la barrera hematoencefàlica i s'acumula al fetus després d'una sobreexposició durant el període de la gestació (Laskey i cols, 1982; Webster i Valois, 1987; Domingo, 1994; Treinen i cols, 1995; Blasak i cols, 1996).

En ratolins, s'han descrit efectes fetotòxics quan s'administrava via subcutània  $MnCl_2 \times 4H_2O$  a dosi de 8 mg/kg/dia des del dia 6 de gestació fins el dia 15 de gestació. Les principals alteracions ocasionades per l'exposició parenteral a Mn van ser una reducció del pes corporal dels fetus, un increment de la incidència de costelles ondulades, i un retard i una reducció en l'ossificació de l'occipital, parietal i de l'estèrnum (Sánchez i cols, 1993). Aquests resultats anaven en el mateix sentit que altres investigacions prèvies en les quals s'administrava als animals de laboratori dosis altes de Mn durant la gestació (Laskey i cols, 1982; Webster i Valois, 1987). També es va trobar que els dies 9 i 10 de gestació eren els més sensibles per la toxicitat embriofetal induïda pel Mn durant la gestació (Colomina i cols, 1996b).

Per altra banda, en els últims anys diverses investigacions han valorat la influència de l'estrès matern en els efectes embriofetals de varis metalls. Mentre que en alguns estudis l'estrès matern augmentava significativament la toxicitat en el desenvolupament d'elements com l'arsènic, arsenat de sodi, metilmercuri i alumini (Ferm i Kilham, 1977; Rasco i Hood, 1994; Colomina i cols, 1995, 1998), altres estudis no han aconseguit establir una interacció significativa entre l'estrès matern i

---

l'exposició a metalls com el cadmi i l'arsènic durant la gestació (Murata i cols, 1993; Colomina i cols, 1996a).

Per avaluar els efectes de l'estrès matern i l'exposició a Mn durant la gestació, en el present estudi l'HC es va utilitzar com a substitut d'un potencial "estressor". Tot i que l'estrès és difícil de definir ja que es tracta essencialment d'un estímul subjectiu, convencionalment es considera que es dona en els experiments amb animals si apareix un increment en les concentracions de corticosterona (Barlow i cols, 1975; Saito i cols, 1995). Així mateix, molts dels efectes atribuïts a l'estrès estarien mitjançats pels glucocorticoides.

En el present estudi s'ha vist que l'administració de clorur de Mn durant l'organogènesi (dies 6 al 15) i durant el període final de la gestació (dies 16 al 18) causaven toxicitat materna i toxicitat en el desenvolupament a dosi de 4 mg/kg/dia. Investigacions prèvies havien mostrat efectes materno-tòxics del MnCl<sub>2</sub> a dosis de 8 i 16 mg/kg/dia, però no a 4 mg/kg/dia, quan s'administrava durant els dies 6 al 15 de gestació (Sánchez i cols, 1993). En el present estudi, es van observar interaccions significatives entre el Mn i l'HC en l'augment de pes corporal matern (dies 6 al 18 de gestació), en el pes de l'úter gràvid, així com en les pèrdues postimplantació. Malgrat tot, només es va evidenciar en els grups que rebien Mn a 4 mg/kg/dia. Les diferències en la toxicitat materna entre aquests estudis indiquen un risc de l'exposició a Mn durant el període final de gestació.

Altrament, tot i que la toxicitat embriofetal (disminució en el nombre de fetus vius) es va observar en la dosi més alta de Mn (4 mg/kg/dia), no es van trobar malformacions externes, internes o esquelètiques, la qual cosa estaria en la mateixa línia d'estudis previs (Sánchez i cols, 1993; Colomina i cols, 1996b).

D'aquesta manera l'HC (o l'estrès matern) interaccionarien amb el Mn només a dosis on aquest metall és tòxic per la mare. Això, estaria en concordància amb els resultats d'estudis recents amb altres elements (Al, As, Hg) pels quals, la interacció amb l'estrès matern només s'observava en els grups que rebien dosis que ja eren inherentment tòxiques per la mare (Colomina i cols, 1995, 1997, 1998).

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

En una revisió recent de la bibliografia sobre els efectes del Mn en el desenvolupament, es va concloure que aquest creua la placenta i entra al teixit fetal, tot i que la quantitat sembla que és limitada (Fechter, 1999). Mentre que no es van evidenciar malformacions estructurals en les cries de rates i ratolins als quals se'ls hi havia donat altes dosis de Mn durant la gestació (Laskey i cols, 1982; Webster i Valois, 1987; Sánchez i cols, 1993; Domingo, 1994), sí s'ha observat fetotoxicitat, evidenciada per una disminució del pes corporal dels fetus i per algunes variacions esquelètiques quan els ratolins gestants rebien clorur de Mn a dosi de 8 mg/kg/dia durant els dies 6 al 15 de gestació.

En aquest experiment, l'administració de clorur de Mn tetrahidratat a ratolins gestants a dosis de 0, 1 ó 2 mg/kg/dia durant els dies 6 al 18 de gestació no va causar toxicitat materna. Tal com en l'estudi anterior, no es va observar toxicitat materna o embriofetal en els ratolins tractats amb Mn per via subcutània a dosi de 1 ó 2 mg/kg/dia, sol o combinat amb HC a dosi de 5 mg/kg/dia. Aquests resultats no són sorprenents si es té en compte que en una investigació prèvia el NOAEL per la toxicitat materna del clorur de Mn per via subcutània administrat durant la gestació durant els dies 6 al 15 va ser de 4 mg/kg/dia (Sánchez i cols, 1993).

Pel que fa al desenvolupament postnatal de les cries, l'índex de viabilitat estava significativament disminuït en els grups exposats a 2 mg/kg/dia de Mn, sol o combinat amb estrès per immobilització, la qual cosa estaria indicant un efecte perinatal advers del Mn. No es van observar efectes relacionats amb el Mn, l'estrès, o el Mn més estrès en el desplegament del pavelló auditiu ni en l'erupció d'incisius. Sí es va observar un retard en l'obertura d'ulls en les cries femelles dels grups exposats a 1 mg/kg/dia de Mn, així com en les cries mascles i femelles del grup que rebia 2 mg/kg/dia de Mn juntament amb estrès.

No s'han trobat a la bibliografia avaluacions de la cura materna, entenent com a cura materna la conducta de cura de la mare envers les cries i, per tant, cap avaluació

d'algun paràmetre objectiu d'aquesta conducta, en els estudis que avaluen la toxicitat del Mn administrat de forma prenatal. Però si s'han descrit alteracions en la cura materna, entre d'altres alteracions en el comportament matern, quan s'ha estudiat l'efecte de l'estrès (Vom Saal, 1983; Anderson i cols, 1985). D'aquí el nostre interès per descartar que els efectes detectats no fossin deguts a una alteració en la cura materna en lloc d'un efecte directe de l'exposició prenatal a Mn i/o estrès. Per tant, al no observar diferències en la cura materna entre grups, es pot descartar qualsevol influència en els resultats deguda a aquesta variable.

Les diferències entre grups observades en el pes corporal de les cries en els dies 4 i 8 són aïllades i no es poden atribuir directament als tractaments. Això difereix d'altres estudis on el pes de les cries tractades amb una dosi elevada de Mn es veia disminuït (Pappas i cols, 1997; Iszard i cols, 2001).

En quant a la maduració neuromotora de les cries, només s'han observat efectes significatius en el temps que tarden els animals en efectuar el reflex de geotaxi. Es va tractar d'una reducció en les femelles dels grups de 1 mg/kg/dia de clorur de Mn, amb o sense estrès. Per altra banda, no es van observar diferències significatives entre grups en el test de coordinació psicomotora del rotarod, i en la força a les extremitats anteriors.

Durant la prova del Camp Obert es va observar en femelles un augment de la distància recorreguda en el grup tractat amb 1 mg/kg/dia de clorur de Mn, amb o sense estrès, si s'observaven els primers 15 minuts, dividint l'observació en intervals de 5 minuts. El nivell d'activitat disminueix durant els primers 10 minuts en els mascles prenatalment estressats. Tot i que l'estrès prenatal s'ha suggerit que modifica els nivells d'activitat, els resultats d'alguns estudis mostren un increment d'aquesta mentre en altres investigacions s'ha descrit una disminució de l'activitat (Vallée i cols, 1997; Alonso i cols, 2000).

Les femelles estarien principalment afectades pel tractament amb Mn. Les cries en els grups prenatalment exposats a 1 mg/kg/dia de Mn incrementaven la seva activitat al Camp Obert durant els primers 5 minuts. Durant els 10 primers minuts,

---

les cries femelles tractades amb 1 mg/kg/dia de Mn, amb o sense estrès, mostraven un increment de l'activitat.

L'absència d'efectes a llarg termini en el període de l'adulthood dels ratolins prenatalment exposats a Mn, tant sol com combinat amb estrès per immobilització, podria indicar diferències individuals.

En estudis previs en ratolins, l'exposició postnatal de les cries a pols de diòxid de Mn no va causar canvis en l'activitat locomotora, aprenentatge en l'Evitació Passiva, conducta exploratòria o en la seva execució en el rotarod. Tanmateix, l'exposició pre- i postnatal al Mn en l'aigua de beguda s'ha associat a un increment de l'activitat espontània als dies 60 i 90 postnats (Lown i cols, 1984). Nosaltres, no vam poder observar diferències en l'activitat vertical o nombre d'aixecaments ("rearings") en cap dels grups. Això es diferencia d'altres investigacions on s'ha observat una disminució en els animals prenatalment tractats amb Mn (Lown i cols, 1984), i en femelles prenatalment estressades (Darnaüdery i cols, 2000).

En rates, l'administració de clorur de Mn a l'aigua de beguda a 0, 2 ó 10 mg/ml des de la concepció fins el dia 30 postnatal no va donar cap efecte apreciable en el part, ni tampoc cap anormalitat detectada en l'aprenentatge ni en la memòria espacial (Pappas i cols, 1997). Així doncs, en general els resultats previs estan d'acord amb els resultats d'aquest experiment.

No es van observar diferències significatives en quan al nombre de defecacions efectuades durant la prova del Camp Obert en cap dels dos sexes. No s'han trobat en la bibliografia descripcions sobre aquest paràmetre avaluat en animals prenatalment exposats a Mn, ni tampoc en les defecacions efectuades pels animals en la prova de l'Evitació Passiva.

Tot i que no es van observar diferències significatives entre grups, aquesta prova va servir per evidenciar l'efecte diferencial que tenia el tractament amb Mn, de manera prenatal, en els animals segons el sexe. Mentre que en mascles hi havia una tendència a l'empitjorament en l'execució de la tasca en els grups tractats, en femelles hi havia una tendència a la millora en l'execució en aquests grups. Aquests resultats semblen anar en la mateixa direcció que els obtinguts en humans, on els

---

homes es mostraven més sensibles als efectes tòxics del Mn que les dones (Mergler i cols, 1999).

Referent als efectes combinats de l'estrès per immobilització i el Mn, existeixen recents estudis que han avaluat els efectes d'aquest estrès sobre la toxicitat embriofetal de l'alumini, metilmercuri i arsènic (Colomina i cols, 1995, 1996a, 1998). La influència de l'estrès matern en la toxicitat induïda pel metilmercuri i arsènic en el desenvolupament postnatal i la conducta han estat també examinats (Colomina i cols, 1996a, 1997). Els resultats d'aquests estudis suggereixen que la immobilització materna pot augmentar la toxicitat materna i embriofetal induïda pel metall i afectar el desenvolupament postnatal i la conducta de les cries a elevades dosis d'aquests metalls; especialment a aquelles per les quals són també tòxiques per les mares. En el present estudi, no s'han observat influències evidents de l'estrès per immobilització en cap dels paràmetres examinats. Les diferències entre els grups exposats a Mn sol, i aquells exposats a Mn a la vegada que a estrès són mínimes. En resum, els resultats d'aquest experiment, juntament amb els d'estudis previs amb altres elements (Colomina i cols, 1995, 1999) indiquen que la influència de l'estrès matern en els efectes de l'exposició prenatal als metalls sobre la toxicitat embriofetal i el desenvolupament postnatal i conducta posterior, depenen de cada element de manera específica, més que d'una influència general d'una situació comuna.

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

Hi ha diferents fonts d'exposició a Mn pels individus adults, tals com el menjar i l'aigua contaminats, i principalment emissions industrials. Els riscos de l'exposició ambiental per la salut humana no estan del tot caracteritzats (Alessio i cols, 1989; Halatek i cols, 2000). Tot i que, recentment, s'ha demostrat en rates que la neurotoxicitat del Mn requereix un temps llarg d'exposició (Giantusos i cols, 1997), no s'ha pogut confirmar en rosegadors el desenvolupament d'un síndrome conductual similar al que s'ha vist en humans i micos intoxicats per Mn (Inoue i cols, 1975; Bonilla, 1984; Morganti i cols, 1985; Nachtman i cols, 1986; Ingersoll i cols, 1995; Cano i cols, 1996; Aposhian i cols, 1999; Dorman i cols, 2000; Aschner i cols, 2001; Calabresi i cols, 2001).

En aquest experiment, els grups tractats amb Mn rebien el tòxic dissolt en aigua de beguda durant les 19 setmanes que va durar el tractament. A la vegada, la meitat dels animals eren sotmesos a estrès per immobilització durant 2 hores, 5 dies a la setmana. Els animals tractats amb dosi alta tenien una ingesta de menjar per sota dels altres grups, a la vegada que un consum d'aigua també disminuït. Molt probablement, degut a la disminució en el menjar i aigua consumits, es produïa una disminució en el pes corporal dels animals adults, tal i com ja ha estat descrit per altres autors (en rates exposades a Mn). Aquesta disminució de pes corporal dels animals seria dosi-dependent (Lipe i cols, 1999).

El pes del cervell en els animals tractats amb la dosi alta de Mn també es trobava disminuït respecte dels altres grups, probablement a conseqüència de la disminució de pes. Tot i que si s'observa el pes relatiu del cervell, en proporció al pes corporal, es veu que en els grups tractats amb Mn, el pes del cervell és proporcionalment més alt. Així, els animals dels grups tractats amb la dosi alta de Mn tindrien un pes relatiu del cervell superior.



---

L'observació dels animals, mitjançant la Bateria d'Observació Funcional ó "FOB", va mostrar al dia 60 de tractament que els animals diferien en la variable "piloerecció", presentant-se aquesta significativament augmentada en el grup tractat amb la dosi alta, quan aquests animals eren a més a més sotmesos a estrès per immobilització. Aquest resultat ja havia estat observat en investigacions prèvies (Inoue i cols, 1975).

Al dia 90 de tractament, les diferències en la piloerecció seguien presents, així com un augment en l'aparició de moviments tòncics en els animals, essent sempre que apareixien aquests deguts al paràmetre d'esquena corbada. Els animals tractats amb la dosi alta de Mn, tant amb estrès com sense, presentaven un augment de l'aparició d'esquena corbada tal i com altres autors ja havien descrit prèviament (Inoue i cols, 1975). En quant a la vigilància dels animals, valorada per la "FOB", tots els grups mostraven un augment respecte al control. Aquest augment podria ser degut a un dèficit en l'habitució, possiblement com a conseqüència d'una alteració en la dopamina, ja que ambdós, Mn i estrès, han estat relacionats amb alteracions en els sistema dopaminèrgic, i més concretament amb un augment de l'activitat en aquest sistema de neurotransmissió (Cuesta i cols, 1995; Murphy i cols, 1996).

Les diferències en l'activitat dels animals no són consistents, i en tot cas, aquestes anirien cap a una disminució en l'activitat dels tractats amb Mn sobretot a dosis altes. Això, en la mateixa línia que altres autors han descrit en les seves investigacions en rosegadors (Inoue i cols, 1975; Cano i cols, 1996; Aposhian i cols, 1999). Tanmateix, altres autors no han trobat diferències en quant a activitat (Dorman i cols, 2000). No es van detectar en cap cas, diferències entre grups en el nombre d'aixecaments o "rearings", ni tampoc en el nombre de defecacions, a diferència d'altres estudis en que s'havia trobat un increment en l'activitat vertical o aixecaments, i en les defecacions en rosegadors tractats amb Mn (Morganti i cols, 1985; Calabresi i cols, 2001). El recompte de les defecacions en la prova del Laberint d'aigua de Morris tampoc va mostrar cap efecte del tractament.

Pel que fa a la valoració de l'aprenentatge mitjançant el Laberint d'aigua, no s'han trobat diferències consistents en l'aprenentatge ni en el record d'aquest aprenentatge (valorat pel trial "probe") entre grups, en el mateix sentit que investigacions prèvies on tampoc es van trobar diferències mitjançant aquesta prova (Pappas i cols, 1997). En tot cas, es podria parlar d'una tendència a un empitjorament en l'aprenentatge i potser també en el record. Malgrat tot, no es pot descartar que aquestes diferències siguin degudes a un dèficit nutricional, evidenciat per la disminució en el pes corporal dels animals tractats.

No s'ha trobat cap empitjorament en l'aprenentatge d'acord amb el test d'evitació passiva. En la mateixa línia que en les proves conductuals anteriors, tampoc s'ha notat cap diferència en les defecacions en aquesta prova. Per tant, no es pot afirmar que hagin diferències en l'emocionalitat o reactivitat en els grups tractats. Aquest índex d'emocionalitat, que consisteix en avaluar-la mesurant les defecacions efectuades per l'animal, ha estat utilitzat per molt diversos autors des que Hall el va descriure al 1934.

Les concentracions de Mn en cervell i cerebel eren significativament més altes en els grups tractats amb Mn respecte els grups control i estressat, tal com ja han descrit varis autors recentment (Dorman i cols, 2000; Calabresi i cols, 2001; Centonze i cols, 2001; St-Pierre i cols, 2001). Només es van poder observar diferències significatives entre grups en les concentracions en cervell, indicant que aquest augment en les concentracions de Mn és dosi-dependent, tal i com ja havien descrit altres autors (Giantusos i cols, 1997).

No s'ha observat cap augment ni disminució en les concentracions de Mn degut a l'estrès, en la mateixa línia que Chandra i cols (1979). Tot i això, la possible interacció de l'estrès amb les concentracions de Mn és una qüestió controvertida, ja que mentre nosaltres no hem observat cap modificació en les concentracions atribuïble a l'estrès, altres autors han observat un augment (Saito i cols, 1995) o una disminució dels nivells de Mn deguts a l'estrès (Izgut-Uysal i cols, 2000).

En general, sembla ser que el Mn produiria un empitjorament en l'aprenentatge, però aquest no està deslligat de la disminució de pes dels animals tractats. Per tant, no es pot concloure sense reserves, que en realitat sigui el Mn el que està modificant aquest paràmetre. Tampoc podem afirmar que produeixi un augment en l'emocionabilitat el Mn, ni l'estrès, ni la suma d'aquest dos tractaments en vista dels resultats actuals. Tanmateix, no es pot descartar que avaluant l'índex de defecacions en altres contextos o proves es pogués arribar a evidenciar.

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

Els riscos per la salut associats a factors tòxics ambientals s'acostumen a avaluar mitjançant un esquema dosi-resposta. Factors com l'estil de vida, hàbits dietètics, diferències genètiques i/o adquirides, o l'estrès entre d'altres, poden estar presents durant l'exposició al tòxic. Aquests determinants personals i exògens han estat poc examinats respecte a l'impacte dels tòxics en la població general (Passchier-Vermeer i Passchier, 2000).

En els últims anys, s'han avaluat les possibles interaccions entre l'estrès per immobilització i alguns agents tòxics (p.ex. Colomina i cols, 1995; 1996a; 1996b; 1998; 1999). La conclusió general que s'extreu és que l'estrès exacerba els efectes adversos d'algunes substàncies només quan s'administra a dosis les quals ja serien tòxiques per elles mateixes, tot i que depèn de cada substància específicament avaluada. Per exemple, la DL50 oral per l'urani augmentava dràsticament quan les rates eren exposades, a la vegada, a una situació d'estrès (Damon i cols, 1986).

L'estrès per immobilització, és el mètode més utilitzat per induir estrès en dissenys experimentals, i causa estrès físic i psicològic. Existeixen també altres situacions estressants, mètodes per induir estrès que podrien semblar-se potser més a les situacions reals que experimenten els éssers humans. Entre aquests, el soroll, el qual el tenim present diàriament en les poblacions urbanes així com en alguns ambients ocupacionals, és un clar exemple.

Els efectes de l'estrès depenen de factors individuals, així com de la intensitat i de la durada de l'estressor. En el present estudi s'ha intentat caracteritzar models diferents d'estressors, els quals podrien ser inclosos en els estudis toxicològics. Hem estressat de manera subcrònica, durant 21 dies, rates mitjançant immobilització o "restraint", durant 2 hores / 5 dies a la setmana, així com estrès per soroll, ultrasons de manera continua 2 hores / 5 dies a la setmana, i estrès per soroll discontinu, ultrasons en intervals del 33% durant un total de 6 hores / 5 dies a la setmana.

No es van observar diferències entre grups en el guany de pes corporal durant els períodes estressants. Tanmateix, si es va apreciar una disminució del consum de menjar durant aquests períodes en els grups exposats a estrès per “restraint” i per soroll (continu i intermitent). Varis estudis previs utilitzant diferents tipus d’estrès, han trobat una disminució en l’increment de pes corporal (Wexler, 1980; Kohler i Knospe, 1982; Armario i cols, 1984; Mormede i cols, 1984; Gamallo i cols, 1986). Alguns autors han relacionat aquesta disminució de pes corporal amb una reducció en el consum de menjar (Armario i cols, 1984). Més concretament, s’ha descrit una disminució en el guany de pes corporal i de la ingesta de menjar en rates estressades crònicament per soroll (Alario i cols, 1987). Per contra, altres autors han observat un augment de la gana quan es tractava de menjar dolç en rates estressades per “restraint” (Ely i cols, 1997). En general, la bibliografia mostra una disminució en la ingesta de menjar de rates estressades, en la mateixa direcció que els nostres resultats; tot i que, no es pot oblidar, que el tipus, duració i severitat d’aquest, així com la soca i el sexe dels animals experimentals que s’utilitzen, poden modificar les respostes a l’estrès (Hargreaves, 1990; Marti i cols, 1994; Paré i Redei, 1993; Pucilowski i cols, 1993).

S’ha observat un augment del nombre total d’aixecaments (activitat vertical) en el grup exposat a soroll intermitent comparat amb els grups control i exposat a soroll continu, encara que no es va poder observar un augment de la distància total recorreguda (activitat horitzontal). També s’ha observat un increment significatiu del nombre de defecacions en el grup sotmès a soroll discontinu comparat amb el control. Aquest augment ja havia estat descrit per altres autors en ratolins exposats a alts nivells de soroll (Sato, 1991). Malgrat tot, alguns autors han arribat a afirmar que l’augment de defecacions, com a índex d’emocionalitat, només seria fiable en femelles (Russell, 1973). Per tant, es tractaria d’un índex poc fiable. Així, les defecacions comptabilitzades durant la prova de l’evitació activa, prova també estressant com seria la del camp obert o potser més, mostren diferències significatives però en sentit invers; és a dir, els animals sotmesos a soroll intermitent i també els sotmesos a “restraint” presentarien una disminució significativa en el nombre de defecacions totals respecte al grup control.

El nombre d'evitacions efectuades pels animals va mostrar diferències entre els animals que estaven sotmesos a soroll. Els subjectes a soroll continu aconseguien evitar significativament menys que els sotmesos a soroll discontinu. Pel que fa als escapaments, el grup d'animals sotmesos a soroll continu aconseguien fer-ho més vegades que els control. Així, les diferències entre estrès per soroll continu i per soroll discontinu s'han detectat principalment en els nivells d'activitat. D'aquesta manera les diferències en aprenentatge (evitacions) haurien de ser reavaluades per poder concloure si aquest increment en les evitacions és només una conseqüència de l'increment d'activitat observat en aquest grup. Per altra banda, les diferències en aprenentatge respecte al grup control, tot i que no consistents, sembla que anirien en la direcció d'una millor execució en els grups estressats en alguns casos, tal i com ja havia estat descrit prèviament per altres investigadors en diferents proves conductuals (Luin i cols, 1996; Shors, 2001). Tanmateix, en altres casos en els que la duració de l'estressor era més llarga, i/o el tipus d'estrès més sever, apareixia un empitjorament (Luine i cols, 1994). Així doncs, encara que amb 21 dies d'estrès es pugui parlar, segons la bibliografia, d'un estrès crònic, existeixen certes causes que han fet que no observem un empitjorament en l'aprenentatge en els animals sotmesos a estrès; tals com la severitat de l'estrès (potser més lleu que l'utilitzat en estudis previs), o la prova amb la què avaluàvem l'aprenentatge, o el tipus d'aprenentatge avaluat. En general, l'activitat i l'aprenentatge entre els animals sotmesos a estrès, tant per "restraint" com per soroll, eren força similars.

No s'han establert diferències en els nivells de corticosterona en els animals, al menys diferències que fossin estadísticament significatives, a diferència d'estudis previs on no només trobaven nivells de corticosterona augmentats, sinó que aquests augments perduraven fins els 90 dies després de l'exposició (Chantal i cols, 1994).

Tampoc s'ha observat un augment en el pes de les glàndules adrenals en els animals estressats, ni diferències entre els diversos tipus d'estrès. Per contra, si ha estat observat que el pes de les glàndules adrenals i els nivells de corticosterona estaven correlacionats. Així, els animals que tenien els nivells més alts de corticosterona, també tenien un pes major de les glàndules adrenals; la qual cosa podria estar indicant diferències individuals en els animals respecte a la seva sensibilitat davant l'estrès aplicat.

Altrament, sembla haver-hi una certa relació negativa entre la corticosterona i el nombre de defecacions en la prova d'evitació activa; però aquests resultats estarien indicant el contrari de l'índex d'emocionalitat de Hall (1934), ja que els animals amb més corticosterona efectuarien menys defecacions, tot i que aquesta relació no apareix amb les defecacions que els animals efectuaven a la prova del Camp Obert.

També apareix un resultat en principi contradictori, quan s'observa la relació entre el pes de les adrenals i els "intercrossings" o vegades que creuen la gàbia sense estímulo el.licitador, els dies 1 i 3. Així, un major pes en les adrenals ens indicaria que els animals, en aquests dies, efectuen menys "intercrossings". Això podria ser explicat pel "freezing" o estat d'immobilització, per la por que poden mostrar els animals altament reactius. Tot i això, aquesta hipòtesi no està recolzada per cap relació d'aquests mateixos paràmetres ("intercrossings") amb els nivells de corticosterona.

## 5. Discussió general.

No és fàcil avaluar comparativament els resultats obtinguts en els presents estudis, respecte a investigacions prèvies, degut a que no existeix extensa bibliografia sobre el tema: efectes del Mn i la influència de l'estrès en aquests efectes, avaluats en diferents moments del cicle vital.

Hi ha més informació sobre aspectes parcials tals com els efectes de l'estrès matern. Està força acceptat que l'estrès matern per immobilització en ratolins pot afectar el tamany de les ventrades i provocar un desenvolupament anormal embriofetal (Barlow i cols, 1975; Beyer i Chernoff, 1986; Scialli, 1988; Rasco i Hood, 1994). Observacions epidemiològiques han mostrat també una relació entre l'estrès psicològic (ansietat), i el benestar i desenvolupament fetal (Scialli, 1988), així com que l'estrès sever (psicològic i fisiològic), el poc espai, la immobilització i la temperatura extrema durant la gestació, modifiquen permanentment el desenvolupament estructural o funcional de la descendència en rates i ratolins (Michel i Fritz-Niggli, 1978; Herrenkohl, 1979; Rhee i Fleming, 1981; Kavlock i cols, 1985; Pollard, 1986; Ward i Wainwright, 1988; Bosque i cols, 1994; Miller i Chernoff, 1995). En els experiments actuals, no vam poder observar, a diferència d'estudis previs, toxicitat materno-fetal en els animals exposats a estrès. Només vam observar una disminució del pes dels fetus quan a la mare se li administraven 5 mg/kg/dia d'HC durant la gestació (del dia 6 al 18). Aquesta manca d'efectes adversos podria ser deguda al tipus d'estrès utilitzat.

Tanmateix, sí ha estat observada una interacció entre la HC i el Mn, però només a dosis on aquest metall era inherentment tòxic, tal com ja s'havia trobat en estudis previs amb altres metalls (Colomina i cols, 1995, 1997, 1998). L'administració de clorur de Mn durant l'organogènesi i durant el període final de gestació, causava toxicitat materna i durant el desenvolupament a dosi de 4 mg/kg/dia. En estudis anteriors, on s'administrava només durant el període d'organogènesi, la dosi on s'apreciaven efectes maternotòxics va ser de 8 mg/kg/dia (Sánchez i cols, 1993), la qual cosa fa pensar en la importància de l'administració durant el període final de gestació ja que seguiria tenint efectes adversos importants.



---

A dosi de 2 mg/kg/dia, tot i que no apareixia toxicitat materna, sí s'apreciava una disminució en l'índex de viabilitat. No s'han detectat efectes consistents a llarg termini deguts al tractament amb Mn, sol o combinat amb estrès, tot i que entre sexes sí es va observar un efecte diferencial del Mn en l'aprenentatge. L'aprenentatge dels mascles apareixia més perjudicat degut al Mn, a diferència de les femelles. Així, els mascles es mostrarien més sensibles als efectes tòxics del Mn tal i com ja s'havia descrit en humans (Mergler i cols, 1999).

L'elevat consum de Mn per via oral en animals adults, va provocar una pèrdua de pes dosi-dependent, precedida d'una ingesta de menjar i aigua disminuïda, també dosi-dependents tal i com ja havia estat descrit recentment (Lipe i cols, 1999). L'observació dels animals en l'estadi final del tractament, va mostrar alguns signes de toxicitat deguts a l'efecte del Mn, i/o de l'estrès, i/o de la interacció d'ambdós. Alguns d'aquests signes de toxicitat observats en animals tractats amb Mn són coincidents amb els descrits en estudis previs (Inoue i cols, 1975).

Les concentracions de Mn estaven augmentades en el cervell dels animals tractats amb aquest metall. Tanmateix, aquestes concentracions no van resultar modificades en cap cas per l'estrès, tal i com en algun estudi previ s'havia suggerit (Izgut-Uysal i cols, 2000). D'aquesta manera, quan es veuen interaccions entre el Mn i l'estrès (com per exemple en la variable de "piloerecció"), aquestes no són degudes a un augment de l'acumulació del Mn en SNC deguda a l'estrès, sinó per altres causes, entre elles l'efecte comú d'ambdós tractaments sobre els sistemes de neurotransmissió com la dopamina, el qual hauria de ser estudiat més detingudament en futurs estudis.

En quant al model d'estrès més adient pels estudis d'interacció amb metalls, no sembla haver-hi masses diferències entre els models estudiats. El que sí sembla clar, és una alteració en l'activitat més accentuada en els animals que rebien estrès per soroll de manera intermitent. A la vegada que s'observava un augment en el nombre de defecacions d'aquests animals en un camp obert, aquest últim resultat corrobora el descrit per ratolins sotmesos a alts nivells de soroll (Sato, 1991); la qual cosa, estaria indicant un model d'estrès força efectiu i a més a més, més proper al que estan exposats els éssers humans.

*“La ciència és el coneixement  
organitzat”  
Herbert Spencer*

## VI. CONCLUSIONS

1. L'administració de clorur de Mn durant el període d'organogènesi (dies 6 al 15) i durant el període final de gestació (dies 16 al 18) a ratolins gestants, a dosi de 4 mg/kg/dia, causa toxicitat materna i toxicitat durant el desenvolupament.
2. L'administració de clorur de Mn durant el període d'organogènesi i durant el període final de gestació en ratolins gestants, a dosi de 4 mg/kg/dia, no causa malformacions externes, internes o esquelètiques.
3. La HC potencia els efectes maternotòxics produïts per l'exposició a Mn en ratolins gestants durant la fase d'organogènesi i el període final de gestació, només a aquelles dosis en les que el Mn ja és inherentment tòxic per se.
4. L'administració de clorur Mn a dosi de 2 mg/kg/dia, disminueix l'índex de viabilitat en les cries de ratolí exposades prenatalment.
5. No s'observa disminució de pes en les cries de ratolí ni altres efectes adversos sobre el desenvolupament de ratolins prenatalment exposats a Mn, a estrès o a la interacció d'ambdós.
6. No s'han detectat modificacions de la cura materna en ratolins, degudes a l'exposició a Mn, a estrès, o a la interacció d'ambdós.
7. No s'observen efectes a llarg termini en el període d'adultesa dels ratolins prenatalment exposats a Mn, a estrès, o a la interacció d'ambdós.
8. Els mascles mostren una tendència a ser més sensibles que les femelles als efectes adversos del Mn en l'aprenentatge.

9. L'elevada ingesta de Mn per via oral en rates produeix una pèrdua de pes dosi-dependent, la qual està precedida d'una disminució en el consum de menjar i aigua.
10. L'elevada exposició a Mn per via oral en rates, de manera crònica, produeix signes de toxicitat. Alguns d'aquests signes estan potenciats per l'efecte de l'estrès.
11. L'elevada exposició a Mn per via oral en rates, augmenta significativament la concentració d'aquest metall en cervell i cerebel. L'estrès no modifica la concentració de Mn ni en el cervell ni en el cerebel.
12. El model d'estrès per soroll intermitent en rates augmenta l'activitat (vertical o aixecaments) respecte al model d'estrès per immobilització, i al model d'estrès per soroll continu.
13. No s'observen altres diferències consistents entre els models d'estrès per immobilització, soroll continu i soroll discontinu.

*“Quants cops un home ha  
començat una nova etapa de la  
seva vida a partir de la lectura  
d’un llibre”  
Henry David Thoreau*

**VII. BIBLIOGRAFIA**

Adams RD, Víctor M, Ropper AH (1997). Principios de neurología. McGraw-Hill. Interamericana. México. Cap. 43. Trastornos del sistema nervioso causados por fármacos y otros agentes químicos, pp 1025-1056.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (September, 2000). Toxicological Profile For Manganese. USA.

Al'Absi M, Bongard S, Lovallo WR (2000). Adrenocorticotropin responses to interpersonal stress: effects of overt anger expression style and defensiveness. *Int J Psychophysiol* 37: 257-265.

Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Trancho G (1987). Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 40: 29-32.

Alessio L, Apostoli P, Feerioli A, Lombardi S (1989). Interference of manganese on neuroendocrinal system in exposed workers. Preliminary report. *Biol Trace Elem Res* 21: 249-253.

Ali MM, Murthy RC, Saxena DK, Chandra SV (1983). Effect of low protein diet on manganese neurotoxicity. II. Brain GABA and seizure susceptibility. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5: 385-389.

Almaguer-Melián W, Jas-Garcia J, Francis-Turner L, Antúnez-Potashkina I, Bergado-Rosado JA (1999). Estudio comparativo de la lesión de fibra-fórnix por aspiración y transección. *Rev Neurología* 29: 704-709.

Alonso SJ, Damas C, Navarro E (2000). Behavioral despair in mice after prenatal stress. *J Physiol Biochem* 56: 77-82.

Altman J, Sudarshan K (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 23: 896-920.

Anderson DK, Rhees RW, Fleming DE (1985). Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area 8SDN-POA of the rat brain. *Brain Res* 332: 113-118.

Aposhian HV, Ingersoll RT, Montgomery EB Jr (1999). Transport and control of manganese ions in the central nervous system. *Environ Res* 80: 96-98.

Armario A, Ortiz R, Balasch J (1984). Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiol Behav* 32: 35-39.

Aschner M (2000a). Neuron-astrocyte interactions: implications for cellular energetics and antioxidant levels. *Neurotoxicology* 21: 1101-1108.

Aschner M (2000b). Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Persp* 108 (suppl 3): 429-432.

Aschner M, Connor JR, Dorman DC, Malecki EA, Vrana KE (2001). Manganese in health and disease. En: *Handbook of Neurotoxicology* (vol 1). Massaro EJ (ed), Humana Press Inc., Totowa, NJ, cap 11, pp 195-210.

Aschner M, Gannon M (1994). Manganese (Mn) transport across the rat blood-barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull* 33: 345-349.

Aschner M, Kimelberg HK (1996). Astrocytes: potential modulators of heavy metal-induced neurotoxicity. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, cap 35, pp 587-608.

Barceloux DG (1999). Manganese. *J Toxicol Clin Toxicol* 37: 293-307.

Barlow SM, McElhatton PR, Sullivan FM (1975). The relation between maternal restraint and food deprivation, plasma corticosterone, and induction of cleft palate in the offspring of mice. *Teratology* 12: 97-104.

Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM (1978). Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology* 18: 211-218.

Barrington WW, Angle CR, Willcockson NK, Padula MA, Korn T (1998). Autonomic function in manganese alloy workers. *Environ Res* 78: 50-58.

Bertók L (1998). Stress and nonspecific resistance. *Ann NY Acad Sci* 851: 1-2.

Beyer PE, Chernoff N (1986). The induction of supernumerary ribs in rodents. Role of maternal stress. *Terat Carci Mutagen* 6: 419-429.

Bignami G (1996). Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity. *Environ Health Persp* 104: 285-298.

Blazak WF, Brown GL, Gray TJB, Treinen KA, Denny KH (1996). Developmental toxicity study of mangafodipir trisodium injection (MnDPDP) in New Zealand white rabbits. *Fundam Appl Toxicol* 33: 11-15.

Bonilla E (1984). Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats. *Exp Neurol* 84: 696-700.

Bosque MA (1991). Evaluación del potencial embriofetotóxico y de los efectos postnatales de los quelantes DMSA y DMPS, nuevos antidotos en intoxicaciones por metales. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina, Reus.

Bosque MA, Domingo JL, Corbella J (1994). Housing of pregnant rats in metabolism cages: maternal and developmental effects. *Exp Toxicol Pathol* 46: 303-306.

Bremner JD (1999). Does stress damage the brain? *Soc Biol Psychiatr* 45: 797-805.

Buendía J (1993). Estrés y depresión. En: *Estrés y Psicopatología*. Buendía J (ed), Ediciones Pirámide, Madrid, cap 6, pp 97-112.



Butterworth RF, Spahr L, Fontaine S, Layrargues GP (1995). Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 10: 259-267.

Cahill L, McGaugh JL (1996). Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6: 237-242.

Calabresi P, Ammassari-Teule M, Gubellini P, Sancesario G, Morello M, Centonze D, Marfia GA, Saulle E, Passino E, Picconi B, Bernardi G (2001). A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. *Neurobiol Dis* 8: 419-432.

Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow W (1994). Manganism and idiopathic parkinsonism similarities and differences. *Neurology* 44: 1583-1586.

Cano G, Suárez-Roca H, Gómez G, Arcaya JL, Aversano C, Latán JC, Bonilla E (1996). Alterations of animal motor activity in early stages of experimental manganese poisoning. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, vol 4, pp 472-474.

Cardoso SE (1997). *Connections of the basal ganglia*. Accessible a [http://www.epub.org.br/cm/n04/fundamentos/connections\\_i.htm](http://www.epub.org.br/cm/n04/fundamentos/connections_i.htm) (Consulta 05-07-02).

Carl GF, Blackwell LK, Barnett FC, Thompson LA, Rissinger CJ, Olin KL, Critchfield JM, Keen CL, Gallagher BB (1993). Manganese and epilepsy: brain glutamine synthetase and liver arginase activities in genetically epilepsy prone and chronically seized rats. *Epilepsia* 34: 441-446.

Carson BL, Ellis III HV, McCann JL (1986). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Cap III. Metal Profiles. Lewis Publishers, Inc. Michigan. USA.

Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2001). Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese. *Exp Neurol* 172: 469-476.

Chandra SV (1972). Histological and histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch Toxicol* 29: 29-38.

Chandra SV, Shukla GS, Murthy RC (1979). Effect of stress on the response of rat brain. *Toxicol Appl Pharm* 47: 603-608.

Chang LW (1996a). An introduction to neurotoxicology of metals. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 509-510.

Chang LW (1996b). Toxicology and neuropathology induced by metals. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 511-536.

Chantal H, Kabbay M, Maccari S (1994). Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Respons in young and adult rats. *J Endocrinol* 6: 341-345.

Chernoff N, Miller DB, Rosen MB, Mattscheck CL (1988). Developmental effects of maternal stress in the CD-1 mouse induced by restraint on single days during the period of major organogenesis. *Toxicology* 51: 57-65.

Claudio L, Kwa WC, Russell AL, Walling D (2000). Testing methods for developmental neurotoxicology of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharm* 164: 1-14.

Coll-Andreu M, Martí-Nicolovius M, Morgado-Bernal I (1991). Facilitation of shuttle-box avoidance by the platform method: temporal effects. *Physiol Behav* 49: 1211-1215.

Coll-Andreu M, Martí-Nicolovius M, Portell-Cortés, Morgado-Bernal I (1993). Facilitation of shuttle-box avoidance by the platform method: effects of conditioned stimulus duration. *Physiol Behav* 53: 349-352.

Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J (1995). Effects of maternal stress on methylmercury-induced developmental toxicity in mice. *Physiol Behav* 58: 974-984.

Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J (1996a). Influence of maternal restraint stress on arsenic-induced pre- and postnatal alterations in mice. *Psychobiology* 24: 227-234.

Colomina MT, Albina ML, Domingo JL, Corbella J (1997). Influence of maternal stress on the effects of prenatal exposure to methylmercury and arsenic on postnatal development and behavior in mice: a preliminary evaluation. *Physiol Behav* 61: 455-459.

Colomina MT, Albina ML, Torrente M, Domingo JL (2000). Teratogenia en experimentación animal: interacción del estrés con tóxicos. *Monografías de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud* 2: 121-123.

Colomina MT, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J (1996b). Effect of day exposure on the developmental toxicity of manganese in mice. *Vet Hum Toxicol* 38: 7-9.

Colomina MT, Esparza JL, Corbella J, Domingo JL (1998). The effect of maternal restraint on developmental toxicity of aluminum in mice. *Neurotoxicol Teratol* 20: 651-656.

Colomina MT, Sánchez DJ, Sánchez-Turet M, Domingo JL (1999). Behavioral effects of aluminum in mice: influence of restraint stress. *Neuropsychology* 40: 142-149.

Corbella J (2000). *Esquemes de Toxicologia Industrial (I). Introducció metalls*. Studia Ramazziniana Mediterranea-IV, Seminaris Pere Mata, Barcelona.

Corbella J, Domingo JL (1996). Developmental and reproductive effects. En: Toxicology of Metals. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 1083-1096.

Cordero MI, Sandi C (1998). Estrés y función cognitiva: el papel de los glucocorticoides en procesos de aprendizaje y memoria. *Ansiedad y Estrés* 4: 51-58.

Costa-Miserachs D, Portell-Cortés I, Aldavert-Vera L, Torras-García M, Morgado-Bernal I (1993). Facilitation of a distributed shuttlebox conditioning with post-training epinephrine in rats. *Behav Neural Biol* 60: 75-78.

Costa-Miserachs D, Portell-Cortés I, Aldavert-Vera L, Torras-García M, Morgado-Bernal I (1994). Long-term memory facilitation in rats by post-training epinephrine. *Behav Neurosci* 108: 469-474.

Crossman AR, Neary D (2000). *Neuroanatomy. An illustrated colour text*. 2<sup>nd</sup> ed. Churchill Livingstone, London, UK.

Cuesta de Di Zio MC, Gómez G, Bonilla E, Suarez-Roca H (1995). Autoreceptor presynaptic control of dopamine release from striatum is lost at early stages of manganese poisoning. *Life Sci* 56: 1857-1864.

Curtis AL, Pavcovich AL, Grigoriadis DE, Valentino RJ (1995). Previous stress alters corticotropin releasing factor neurotransmission in the locus ceruleus. *Neuroscience* 65: 541-550.

Dahbhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1996). Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65: 360-368.

Dallman MF, Akana SF, Bradbur MJ, Strack AM, Hanson ES, Scribner KA (1994). Regulation of the hypothalamo pituitary adrenal axis during stress: feedback, facilitation and feeding. *Semin Neurosci* 6: 205-213.

Damon EG, Eidson AF, Hobbs CH, Hahn FF (1986). Effect of acclimation to caging on nephrotoxic response of rats to uranium. *Lab Anim Sci* 36: 24-27.

Darnaudäery M, Buäee L, Viltart O, Maccari S (2000). Chronic stress during pregnancy increases anxiety of female rats. *Abstr Soc Neurosci* 26: 488.

Davis JM (1998). Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. *Environ Health Persp* 106: 191-201.

Davis JM (1999). Inhalation health risks of manganese: an EPA perspective. *Neurotoxicology* 20: 511-518.

Davis JM, Elias RW (1996). Risk assessment of metals. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 60-65.

Davis JM, Jarabek AM, Mage DT, Graham JA (1998). The EPA health risk assessment of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT). *Risk Anal* 18: 57-70.

De Quervain D JF, Roozendaal B, McGaugh JL (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394: 787-790.

De Quervain D JF, Roozendaal B, Nitsch RM, McGaugh JL, Hock C (2000). Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* 3: 313-314.

Del Corral P, Mahon AD, Duncan GE, Howe CA, Craig BW (1994). The effect of exercise on serum and salivary cortisol in male children. *Med Sci Sport Exer* 26: 1297-1301.

Deskin R, Bursian SJ, Edens FW (1981). The effect of chronic manganese administration on some neurochemical and physiological variables in neonatal rats. *Gen Pharmacol* 12: 279-280.

Dobbing J, Sands J (1971). Vulnerability of developing brain IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol Neonate* 19: 363-378.

Domingo JL (1994). Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J Toxicol Environ Health* 42: 123-141.

Domingo JL, Colomina MT, Corbella J (1995). Interacciones entre tóxicos: influencia del estrés materno sobre la toxicidad embriofetal de sustancias teratogénicas. *Rev R Acad Med Catalunya* 10: 67-76.

Domingo JL, Paternain JL, Ortega A, Corbella J (1988). Revisión de la terminología utilizada en publicaciones de teratología y toxicidad en el desarrollo. Una propuesta de presentación de resultados. *Rev Toxicología* 5: 101-108.

Dorman DC (2000). An integrative approach to neurotoxicology. *Toxicol Pathol* 28: 37-42.

Dorman DC, Struve MF, Vitarella D, Byerly FL, Goetz J, Miller R (2000). Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure. *J Appl Toxicol* 20: 179-187.

Draski LJ, Burrig RG, Donovan PJ (1989). The influence of prenatal and/or postnatal exposure to lead on behavior of preweanling mice. *Physiol Behav* 45: 711-715.

Dreisbach RH, Robertson WO (1988). Manual de toxicología clínica. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Cap 15. Envenenamiento por Metales. Manual Moderno. México, pp 220-221.

Durán E, Chacón JR (2001). Parkinsonismo probablemente inducido por manganeso. *Rev Neurol* 33: 434-436.

Eaton DL, Klaassen CD (1996). Principles of Toxicology. En: Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons, 5<sup>th</sup> ed. Klaassen CD (ed), McGraw-Hill, New York, pp 13-33.

Eder K, Kralik A, Kirchgessner M (1996). The effect of manganese supply on thyroid hormone metabolism in the offspring of manganese-depleted dams. *Biol Trace Elem Res* 55: 137-145.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Corrêa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 61: 395-398.

Ericson JE, Rinderknecht A, Gonzalez EJ, Crinella FM, Kleinman MT (2001). Measurements of manganese with respect to calcium in histological enamel cross sections: toward a new manganese biomarker. *Environ Res* 86: 46-50.

Eriksson H, Magiste K, Plantin LO, Fonnum F, Hedstrom KG, Theodorsson-Norheim E, Kristensson K, Stalberg E, Heilbronn E (1987). Effects of manganese oxide on monkeys as revealed by a combined neurochemical, histological and neurophysiological evaluation. *Arch Toxicol* 61: 46-52.

Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P, Fernández Teruel A (1995). Effects of training, early handling and perinatal flumazenil on shuttle box acquisition in roman low-avoidance rats: toward overcoming a genetic deficit. *Neurosci Behav R* 19: 353-367.

Fechter LD (1999). Distribution of manganese in development. *Neurotoxicology* 20: 197-201.

Feldman RG, Ratner MH, Feldman ES (1999). Approach to neurotoxicity tort cases. *Neurol Clin* 17: 267-281.

Ferm VH, Kilham L (1977). Synergistic teratogenic effects of arsenic and hyperthermia in hamsters. *Environ Res* 14: 483-486.

Fernandez J, Edo S (1998). ¿Se puede medir el estrés? Un análisis de los elementos que componen el proceso de estrés. *APCL* 16: 133-148.

Fox WM (1965). Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav* 13: 234-241.

Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M (1986). Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav* 37: 681-687.

Frumkin H, Solomon G (1997). Manganese in the U.S. supply. *Am J Ind Med* 31: 107-115.

Gamallo A, Villanua MA, Beato MJ (1986). Body weight gain and food intake alterations in crowd-reared rats. *Physiol Behav* 36: 835-837.

García A, Martí O, Vallès A, Dal-Zotto S, Armario A (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Neuroendocrinology* 72: 114-125.

Gerber GJ, O'Shaughnessy D (1986). Comparison of the behavioral effects of neurotoxic and systemically toxic agents: how discriminatory are behavioral tests of neurotoxicity? *Neurobehav Toxicol Teratol* 8: 703-710.

Gerhardsson L, Skerfving S (1996). Concepts on biological markers and biomonitoring for metal toxicity. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 81-110.

Gesi M, Riva A, Soldani P, Fornai F, Natale G, Lenzi P, Pellegrini A, Paparelli A (1999). Central and peripheral benzodiazepine ligands prevent mitochondrial damage induced by noise exposure in the rat myocardium: an ultrastructural study. *Anat Rec* 225: 334-341.

Gianutsos G, Morrow GR, Morris JB (1997). Accumulation of manganese in rat brain following intranasal administration. *Fund Appl Toxicol* 37: 102-105.



Gianutsos G, Murray MT (1982). Alterations in brain dopamine and GABA following inorganic or organic manganese administration. *Neurotoxicology* 3: 75-82.

Giasson BI, Lee VM-Y (2000). A new link between pesticides and Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1227-1228.

Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci* 16: 4787-4798.

Golub MS, Han B, Keen CL (1991). Al and Mn: interactions in adult and developing mice. *Teratology* 43: 490.

Gómez M, Esparza JL, Domingo JL, Singh PK, Jones MM (1998). Aluminum distribution and excretion: a comparative study of a number of chelating agents in rats. *Pharmacol Toxicol* 82: 285-300.

Gottschalk LA, Rebello T, Buchsbaum MS, Tucker HG, Hodges EL (1991). Abnormalities in hair trace elements as indicators of aberrant behavior. *Compr Psychiat* 32: 229-237.

Grandin T (1997). Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci* 75: 249-257.

Grant D, Ege T (1995). Teratogenicity in the rat after repeated intravenous injection of manganese, either as a complex (mangafodipir trisodium, MNDPDP), or as the inorganic chloride. *Toxicologist* 15: 160.

Grant D, Hustvedt SO (1998). Developmental toxicity of manganese chloride in the rat. *Neurotoxicology* 19: 469.

Gray LE Jr, Laskey JW (1980). Multivariate analysis of the effects of manganese on the reproductive physiology and behavior of the male mouse. *J Toxicol Environ Health* 6: 861-867.

Gunnar MR (1998). Quality of early care and buffering of neuroendocrine stress reactions: potential effects on the developing human brain. *Prev Med* 27: 208-211.

Gunnar MR, Barr RG (1998). Stress, early brain development, and behavior. *Infants Young Child* 11: 1-14.

Halatek T, Trzcinka-Ochocka M, Matczak W, Krajewska B, Wronska-Nofer T, Ryzdzynski K (2000). Studies on the relationship between occupational exposure to manganese and serum Clara cell protein levels in shipyard workers. *Trace Elem Electrolytes* 17: 48-53.

Hall CS (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18: 385-403.

Hargreaves KM (1990). Neuroendocrine markers of stress. *Anesth Prog* 37: 99-105.

Hass U, Lund SP, Simonson L, Fries AS (1995). Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol* 17: 341-349.

Hayes AW (1989). *Principles and methods of toxicology*. 2ed. Hayes AW (ed), Raven Press, New York.

Henriksson J, Tallkvist J, Tjälve H (1999). Transport of manganese via the olfactory pathway in rats: dosage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 119-128.

Henry-Sam GA, Iszard MB (2001). A comparative study of the reproductive toxicity of manganese in rats and mice. *FASEB J*, 15: A585.

Herrenkohl LR (1979). Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science* 206: 1097-1099.

Hong JS, Hung CR, Seth PK, Mason G, Bondy SC (1984). Effect of manganese treatment on the levels of neurotransmitters, hormones, and neuropeptides: modulation by stress. *Environ Res* 34: 242-249.

Hua MS, Huang CC (1991). Chronic occupational exposure to manganese and neurobehavioral function. *J Clin Exp Neuropsych* 13: 495-507.

Huang CC, Chu NS, Lu CS, Calne DB (1997). Cock gait in manganese intoxication. *Movement Disord* 12: 807-808.

Huang CC, Chu NS, Lu CS, Chen RS, Calne DB (1998). Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. *Neurology* 50: 698-700.

Ingersoll RT, Montgomery EB, Aposhian HV (1995). Central nervous system toxicity of manganese. 1. Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride. *Fund Appl Toxicol* 27: 106-113.

Inoue N, Makita Y (1996). Neurological aspects in human exposures to manganese. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 415-422.

Inoue N, Tsukuda Y, Barbeau A (1975). Behavioral effects in rats following intranasal microinjection of manganese. *Brain Res* 95: 103-124.

Iregren (1990). Psychological test performance in foundry workers exposed to low levels of manganese. *Neurotoxicol Teratol* 12: 673-677.

Iregren A (1994). Using psychological tests for early detection of neurotoxic effects of low level manganese exposure. *Neurotoxicology* 15: 671-678.

Iregren A (1999). Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests. *Neurotoxicology* 20: 315-324.

Iszard MB, Henry-Sam GA, Ponnappakkam TP (2001). Evaluation of the reproductive system in CD-1 mice on oral exposure to manganese acetate. *The Toxicologist* 60: 386-387.

Izgut-Uysal VN, Derin N, Agac A (2000). Effect of cold-restraint stress on the distribution of trace elements in rat tissues. *Biol Trace Elem Res* 78: 149-155.

Joels M (1997). Steroid hormones and excitatory in the mammalian brain. *Front Neuroendocrin* 18: 2-24.

Kavlock RJ, Chernoff N, Rogers EH (1985). The effect of acute maternal toxicity on fetal development in the mouse. *Terat Carci Mutagen* 5: 3-13.

Keen CL (1996). Teratogenic effects of essential trace elements. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 707-718.

Khera KS (1984). Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformation in mice. *Teratology* 29: 411-416.

Khera KS (1987). Maternal toxicity in humans and animals. Effects on fetal development and criteria for detection. *Teratogen Carcin Mut* 7: 287-295.

Kimmel CA, Cuff JM, Kimmel GL, Heredia DJ, Tudor N, Silverman PM, Chen J (1993). Skeletal development following heat exposure in the rat. *Teratology* 47: 229-242.

Kimmel CA, Reginald OC, Robert ES (1976). Teratogenic potential of noise in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 36: 239-245.

King JA, Edwards E (1999). Early stress and genetic influences on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in adulthood. *Horm Behav* 36: 79-85.

Kinsley C, Svare B (1986). Prenatal stress effects: are they mediated by reductions in maternal food and water intake and body weight gain? *Physiol Behav* 37: 191-193.

Kishi R, Chen BQ, Katakura Y, Ikeda T, Miyake H (1995). Effect of prenatal exposure to styrene on the neurobehavioral development, activity, motor coordination, and learning behavior of rats. *Neurotoxicol Teratol* 17: 121-130.

Kohler E, Knospe S (1982). Prevention of the development of hyperglycemia in sane rats by adrenal medullectomy. *Horm Metab Res* 14: 574-579.

Koob GF, Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Britton KT (1994). Corticotropin releasing factor, stress and behavior. *Semin Neurosci* 6: 221-229.

Kopin IJ (1994). Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. Chronic manganese poisoning. En: *Basic Neurochemistry*. 5<sup>th</sup> ed. Siegel GS, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (eds), Raven Press, New York, cap 44, pp 899-918.

Krishnan K, Brodeur J (1994). Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience. *Environ Health Persp* 102 (supl 9): 11-17.

Lachuer J, Delton I, Buda M, Tappaz M (1994). The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 638: 196-202.

Ladron de Guevara J, Moya Pueyo V (1995). *Toxicología Médica. Clínica y Laboral*. Interamericana, McGraw-Hill, Madrid.

Lai JCK, Minski MJ, Chan AWK, Leung TKC, Lim L (1999). Manganese mineral interactions in brain. *Neurotoxicology* 20: 433-444.

Landrigan PJ, Graham DG, Thomas RD (1993). Strategies for the prevention of environmental neurotoxic illness. *Environ Res* 61: 157-163.

Laskey JW, Rehnberg GL, Hein JF, Carter SD (1982). Effects of chronic manganese ( $Mn_3O_4$ ) exposure on selected reproductive parameters in rats. *J Toxicol Environ Health* 8: 677-687.

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000). Prenatal stress produces deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Neurobiology* 97: 11032-11037.

Lightman SL (1994). How does the hypothalamus respond to stress? *Semin Neurosci* 6: 215-219.

Lipe GW, Duhart H, Newport GD, Slikker W Jr, Ali SF (1999). Effect of manganese on the concentration of amino acids in different regions of the rat brain. *J Environ Sci Health B* 34: 119-132.

Lloyd RV (1995). Mechanism of the manganese-catalyzed autoxidation of dopamine. *Chem Res Toxicol* 8: 111-116.

Lown BA, Morganti JB, D'Agostini R, Stineman CH, Massaro EJ (1984). Effects of the postnatal development of the mouse, of preconception, postconception and/or suckling exposure to manganese via maternal inhalation exposure to  $Mn O_2$  dust. *Neurotoxicology* 5: 119-129.

Lucchini R, Albini E, Placidi D, Alessio L (2000a). Mechanism of neurobehavioral alteration. *Toxicol Lett* 112-113: 35-39.

Lucchini R, Albini E, Placidi D, Gasparotti R, Pigozzi MG, Montani G, Alessio L (2000b). Brain magnetic resonance imaging and manganese exposure. *Neurotoxicology* 21: 769-776.

Lucchini R, Apostoli P, Perrone C, Placidi D, Albini E, Migliorati P, Mergler D, Sassine M-P, Palmi S, Alessio L (1999). Long term exposure to "low levels" of

---

manganese oxides and neurofunctional changes in ferroalloy workers. *Neurotoxicology* 20: 287-298.

Lucchini R, Selis L, Folli D, Apostoli P, Mutti A, Vanoni O, Iregren A, Alessio L (1995). Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. *Scand J Work Env Hea* 21: 143-149.

Luine V, Martínez C, Villegas M, Magariños AM, McEwen BS (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol Behav* 59: 27-32.

Luine V, Villegas M, Martínez C, McEwen BS (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 639: 167-170.

Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM, Maheu F, Sharma S, Nair NPV, Hauger RL, McEwen BS, Meaney MJ (1997). Stress-induced declarative memory impairment in health elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocr Metab* 82: 2070-2075.

Lupien SJ, McEwen BS (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 24: 1-27.

MacPhail RC (1994). Behavioral analysis in neurotoxicology. En: *Neurobehavioral Toxicity. Analysis and interpretation*. Weiss B, O'Donoghue JL (eds), Raven Press, New York, cap 2, pp 7-18.

Magariños AM, García-Verdugo JM, McEwen BS (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Neurobiology* 94: 14002-14008.

Magariños AM, McEwen BS (1995). Stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69: 89-98.

Magariños AM, Orchinik M, McEwen BS (1998). Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain Res* 809: 314-318.

Mailman RB, Mayleben M, Lawler CP (1996). Effects of toxic metals on neurotransmitters. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 627-638.

Manson JM, Kang YJ (1989). Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. En: *Principles and methods of toxicology*. 2ed. Hayes AW (ed), Raven press, New York, pp 311-359.

Manzo L, Castoldi AF, Coccini T, Prockop LD (2001). Assessing effects of neurotoxic pollutants by biochemical markers. *Environ Res* 85: 31-36.

Marcilhac A, Siaud P (1996). Regulation of the adrenocorticotrophin response to stress by the central nucleus of the amygdala in rats depends upon the nature of the stressor. *Exp Physiol* 81: 1035-1038.

Marti O, Marti J, Armario A (1994). Effect of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 54: 747-753.

Martí-Nicolovius M, Portell-Cortés I, Morgado Bernal I (1998). Improvement of shuttle-box avoidance following post-training treatment in paradoxical sleep deprivation platforms in rats. *Physiol Behav* 43: 93-98.

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Dev Brain Res* 84: 55-61.

McEwen BS (1994a). Introduction: stress and nervous system. *Semin Neurosci* 6: 195-196.



McEwen BS (1994b). Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. En: *Basic Neurochemistry*. Siegel GS, Agranoff BW, Wayne R, Molinoff PB (eds), Raven Press, New York, pp 893-913.

McEwen BS (1997). Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus. *Mol Psychiatr* 2: 255-262.

McEwen BS (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122.

McEwen BS, Sapolsky RM (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5: 205-216.

McGivern RF, Poland RE, Taylor AN, Branch BJ, Raum WJ (1986). Prenatal stress feminizes adult male saccharin preference and maze learning: antagonism by propranolol. *Monogr Neural Sci* 12: 172-178.

McIntosh LJ, Hong KE, Sapolsky RM (1998). Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 791: 209-214.

McMillan DE (1999). A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions. *Neurotoxicology* 20: 499-508.

Meaney MJ, Tannenbaum B, Francis D, Bhatnagar S, Shanks N, Viau V, O'Donnell D, Plotsky PM (1994). Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Semin Neurosci* 6: 247-259.

Mena I (1979). Manganese poisoning. En: *Handbook of Clinical Neurology*. Vinken PJ, Bruyn GW (eds), Amsterdam, North Holland, pp 217-237.

Mergler D (1999). Neurotoxic effects of low level exposure to manganese in human populations. *Environ Res* 80: 99-102.

Mergler D, Baldwin M (1997). Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environ Res* 73: 92-100.

Mergler D, Baldwin M, Bélanger S, Larribe F, Beuter A, Bowler R, Panisset M, Edwards R, Geoffroy A, Sassine M-P, Hudnell K (1999). Manganese neurotoxicity, a continuum of dysfunction: results from a community based study. *Neurotoxicology* 20: 327-342.

Mergler D, Bélanger S, Larribe F, Panisset M, Bowler R, Baldwin M, Lebel J, Hundnell K (1998). Preliminary evidence of neurotoxicity associated with eating fish from the Upper St Lawrence river lakes. *Neurotoxicology* 19: 691-702.

Mergler D, Huel G, Bowler R, Iregren A, Bélanger S, Baldwin M, Tardif R, Smargiassi A, Martin L (1994). Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environ Res* 54: 151-180.

Michel C, Fritz-Niggli H (1978). Induction of developmental anomalies in mice by maternal stress. *Experientia* 34: 105-106.

Miller DB, Chernoff N (1995). Restraint-induced stress in pregnant mice. Degree of immobilization affects maternal indices of stress and development outcome in offspring. *Toxicology* 98: 177-186.

Misselwitz B, Móuhler A, Weinmann HJ (1995). A toxicologic risk for using manganese complexes? A literature survey of existing data through several medical specialities. *Invest Radiol* 30: 611-620.

Moorcraft WH (1981). Heightened arousal in the 2-week-old rat: the importance of starvation. *Dev Psychobiol* 14: 187-199.

Moore KA, Burrows GD (1996). Stress and mental health. En: *Handbook of stress, medicine, and health*. Cooper CL (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, cap 4, pp 87-100.

Morganti JB, Lown BA, Stineman CH, D'Agostino RB, Massaro EJ (1985). Uptake, distribution, and behavioral effect of inhalation exposure to manganese (Mn O<sub>2</sub>) in the adult mouse. *Neurotoxicology* 6: 1-15.

Morishina HO, Pedersen H, Finster M (1978). The influence of maternal psychological stress on the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 131: 286-290.

Mormede P, Dantzer R, Montpied P, Bluthe RM, Laplante E, LeMoal M (1984). Influence of shock-induced fighting and social factors on pituitary-adrenal activity, prolactin and catecholamines synthesizing enzymes in rats. *Physiol Behav* 32: 723-729.

Morris RGM (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12: 239-260.

Morris R (1984). Developmental of a water maze-procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth* 11: 47-56.

Murata M, Takigawa H, Sakamoto H (1993). Teratogenic effects of noise and cadmium in mice: does noise have teratogenic potential? *J Toxicol Environ Health* 39: 237-245.

Murphy BL, Arnsten AFT, Jentsch JD, Roth RH (1996). Dopamine and spatial working memory in rats and monkeys: pharmacological reversal of stress-induced impairment. *J Neurosci* 16: 7768-7775.

Murphy VA, Rosenberg JM, Smith QR, Rapoport SI (1991). Elevation of brain manganese in calcium-deficient rats. *Neurotoxicology* 12: 255-263.

Nachtman JP, Tubben RE, Commissaris RL (1986). Behavioral effects of chronic manganese administration in rats: locomotor activity studies. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8: 711-715.

Nagahara AH, Otto T, Gallagher M (1995). Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 109: 3-9.

Nawrot PS, Cook RO, Staples RE (1980). Embriotoxicity of various noise stimuli in the mouse. *Teratology* 22: 279-289.

Nelson BK (1994). Interactions in developmental toxicology: a literature review and terminology proposal. *Teratology* 49: 33-71.

Nelson WE, Vaughan VC, McKay RJ (1980). *Tratado de Pediatría*. Salvat Editores SA, Barcelona, pp 1386-1387.

Neubert D, Barrach HJ, Merker HJ (1980). Drug-induced damage to the embryo or fetus (molecular and multilateral approach to prenatal toxicology). *Curr Top Pathol* 9: 241-233.

Newland MC (1999). Animal models of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 20: 415-432.

Orchinik M (1998). Glucocorticoids, stress, and behavior: shifting the timeframe. *Horm Behav* 34: 320-327.

Orchinik M, Weiland NG, McEwen BS (1995). Chronic exposure to stress levels of corticosterona alters GABA-A receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. *Brain Res* 34: 29-37.

Pal PK, Samii A, Calne DB (1999). Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20: 227-238.

Pani L, Porcella A, Gessa GL (2000). The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Mol Psychiatr* 5: 14-21.

---

Paparelli A, Soldani P, Breschi MC, Martinotti E, Scatizzi R, Berrettini S, Pellegrini A (1992). Effects of subacute exposure to noise on the noradrenergic innervation of the cardiovascular system in young and aged rats: a morphofunctional study. *J Neural Transm* 88: 105-113.

Papez JM (1937). A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatr* 38: 725-743.

Pappas BA (2000). Perinatal manganese exposure in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 22: 462.

Pappas BA, Zhang D, Davidson CM, Crowder T, Park GA, Fortin T (1997). Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical, and histopathological effects in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 19: 17-25.

Paré WP, Redei E (1993). Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol Behav* 54: 1179-1185.

Passchier-Vermeer W, Passchier WF (2000). Noise exposure and public health. *Environ Health Perspect* 108: 123-131.

Paternain JL, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J (1985). Estudios en ratas de los efectos producidos por la administración oral de  $\text{CoCl}_2$  sobre la fertilidad, gestación, parto y lactancia. *Rev Toxicología*, 2: 93-103.

Paule MG, Reuhl K, Chen JJ, Ali SF, Slikker WJr (1996). Developmental toxicology of trimethyltin in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 84: 412-417.

Peters DA (1982). Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone level. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 721-725.

Plunket ER (1978). Manual de Toxicología Industrial. Enciclopedia de la Química Industrial -tomo 12. Ediciones Urmo S.A, Bilbao.

Pollard I (1986). Prenatal stress effects over two generation in rats. *J Endocrinol* 109: 239-244.

Porter NM, Landfield PW (1998). Stress hormones and brain aging: adding injury to insult? *Nat Neurosci*, 1: 3-4.

Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, Tobeña A (1994). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttlebox avoidance. *Pharmacol Res* 29: 37-46.

Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1993). Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav* 54: 1215-1220.

Rasco JF, Hood RD (1994). Effects of maternal restraint stress and sodium arsenate in mice. *Reprod Toxicol* 8: 49-54.

Rasco JF, Hood RD (1995). Maternal restraint stress-enhanced teratogenicity of all-trans-retinoic acidin CD-1 mice. *Teratology* 51: 57-62.

Rattner BA, Michael SD, Brinkley HF (1979). Plasma gonadotrophins and progesterona concentrations during various degrees of underfeeding in pregnant mice. *J Reprod Fertil* 56: 587-591.

Reagan LP, McEwen BS (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* 13: 149-167.

Repetto, M (1997). *Toxicología fundamental*. Díaz de Santos, Madrid.

Rhees RW, Fleming DE (1981). Effects of malnutrition, maternal stress, or ACTH injection during pregnancy on sexual behavior of male offspring. *Physiol Behav* 27: 879-882.

Rivera S, Sanfeliu C, Rodríguez-Farré E (1990). Behavioral changes induced in developing rats by an early postnatal exposure to lindane. *Neurotoxicol Teratol* 12: 591-595.

Roels H, Ghyselen P, Buchet J, Ceulemans E, Lauwerys R (1992). Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese oxide dust. *Br J Ind Med* 49: 25-34.

Roels H, Lauwerys R, Buchet JP, Genet P, Sarhan MJ, Hanotiau I, de Fays M, Bernard A, Stanescu D (1987): Epidemiological survey among workers exposed to manganese: effects on lung, central nervous system, and some biological indices. *Am J Ind Med* 11: 307-327.

Rooszendaal B, McGaugh JL (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 9: 76-83.

Rowett HG (1960). *The rat as a small mammal*. John Murray, London. UK.

Rugh R (1990). *The mouse. Its reproduction and development*. Oxford Science Publications, Oxford. UK.

Russell PA (1973). Open-field defecation in rats: relationships with body weight and basal defecation level. *Br J Psychol* 64: 109-114.

Saito T, Fujimura M, Itoh T, Saito K (1995). Effects of various durations of restraint stress on the trace element metabolism in rat brain regions. *Trace Elem Electroly* 12: 89-94.

Salveti F, Chelli B, Gesi M, Pellegrini A, Giannaccini G, Lucacchini A, Martini C (2000). Effect of noise exposure on rat cardiac peripheral benzodiazepine receptors. *Life Sci* 66: 1165-1175.

Sánchez DJ, Colomina MT, Domingo JL (1998). Effect of vanadium on activity and learning in rats. *Physiol Behav* 63: 345-350.

Sánchez DJ, Domingo JL, Llobet JM, Keen CL (1993). Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse. *Toxicol Lett* 69: 45-52.

Sánchez DJ, Gómez M, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J (1995). Relative efficacy of chelating agents on excretion and tissue distribution of manganese in mice. *J Appl Toxicol* 15: 285-288.

Sánchez DJ, Gómez M, Llobet JM, Corbella J, Domingo JL (1997). Effects of aluminum on the mineral metabolism of rats in relation to age. *Pharmacol Toxicol* 80: 11-18.

Sandi C, Venero C, Cordero MI (2001). Estrés, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento. Ariel Neurociencia, Barcelona.

Sandin B (1993). Estrés y salud: factores que intervienen entre el estrés y la enfermedad física. En: Estrés y psicopatología. Buendía J (ed), Ediciones Pirámide, Madrid, cap 9, pp 148-174.

Santos-Burgoa C, Rios C, Mercado LA, Arechiga-Serrano R, Cano-Valle F, Alatorre R, Texcalac-Sangrador JL, Villa-Barragan JP, Rodríguez-Agudelo Y, Montes S (2001). Exposure to manganese: health effects on the general population, a pilot study in central Mexico. *Environ Res* 85: 90-104.

Sapolsky RM (1994a). Glicocorticoides, stress and exacerbation of excitotoxic neuron death. *Semin Neurosci* 6: 323-331.

Sapolsky RM (1994b). Individual differences and the stress response. *Semin Neurosci* 6: 261-269.



Sapolsky RM (1995). ¿Por qué las cebras no tienen úlcera?: la guía del estrés. Alianza Editorial, Madrid.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.

Sato M (1991). Open-field test in mice: a methodological analysis. *Teratology* 44: 47B.

Schneider ML, Clarke AS, Kraemer GW, Roughton EC, Lubach GR, Rimm-Kaufman S, Schmidt D, Ebert M (1998). Prenatal stress alters brain biogenic amine levels in primates. *Dev Psychopathol* 10: 427-440.

Scialli AR (1988). Is stress a developmental toxin? *Reprod Toxicol* 1: 163-171.

Selye H (1936). The alarm reaction. *Can Med Assoc J* 34: 706.

Selye H (1955). Stress and disease. *Science* 122: 625-631.

Seth PK, Chandra SV (1984). Neurotransmitters and neurotransmitter receptors in developing and adult rats during manganese poisoning. *Neurotoxicology* 5: 67-76.

Seth PK, Chandra SV (1988). Neurotoxic effects of manganese. En: *Metal Neurotoxicity*. Bondy SC, Prasad KN (eds), CRC Press, FL, cap 2, pp 19-33.

Setlow B, McGaugh JL (1999). Involvement of the posteroventral caudate-putamen in memory consolidation in the morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 71: 240-247.

Shors TJ (2001). Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat. *Neurobiol Learn Mem* 75: 10-29.

---

Siegl P, Bergert KD (1982). [A method of early diagnostic monitoring in manganese exposure]. *Z Gesamte Hyg* 28: 524-526.

Sierra P, Chakrabarti S, Tounkara R, Loranger S, Kennedy G, Zayed J (1998). Bioaccumulation of manganese and its toxicity in feral pigeons (*Columba livia*) exposed to manganese oxide dust ( $Mn_3 O_4$ ). *Environ Res* 79: 94-101.

Sjögren B, Iregren A, Frech W, Hagman M, Johansson L, Tesarz M, Wennberg A (1996). Effects on the nervous system among welders exposed to aluminum and manganese. *Occup Environ Med* 53: 32-40.

Slikker WJr (1994). Principles of developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 15: 11-16.

Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Cristofani R, Paparelli A (1997). SEM/TEM investigation of rat cardiac subcellular alterations induced by changing duration of noise stress. *Anat Rec* 248: 521-532.

Spranger M, Schwab S, Desiderato S, Bonmann E, Krieger D, Fandrey J (1998). Manganese augments nitric oxide synthesis in murine astrocytes: a new pathogenetic mechanism in manganism? *Exp Neurol* 149: 277-283.

St Omer VEV, Ali SF, Holson RR, Scalzo FM, Slikker WJr (1991). Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylene dioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 13: 13-20.

Staples RE (1975). Definition of teratogenesis and teratogen. En: *Methods for detection of environmental agents that produce congenital defects*. Shepard TH, Miller JR, Marois M (eds), North Polland Publishing Co, Amsterdam, pp 25-26.

Stam R, Croiset G, Bruijnzeel AW, Visser TJ, Akkermans LMA, Wiegant VM (1999). Sex differences in long-term stress-induced clonic, behavioural and hormonal disturbances. *Life Sci* 64: 2837-2849.

Stott DN (1973). Follow-up study from birth of the effects of prenatal stress. *Dev Med Child Neurol* 15: 770-787.

Stout SC, Nemeroff CB (1994). Stress and psychiatric disorders. *Semin Neurosci* 6: 271-280.

St-Pierre A, Normandin L, Carrier G (2001). Bioaccumulation and locomotor effect of manganese dust in rats. *Inhal Toxicol* 13: 623-632.

Suter KF, Schön H (1985). Testing strategies in behavioral teratology: I. Testing battery approach. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8: 561-566.

Sziraki I, Rauhala P, Kon Koh K, Bergen PV, Chiueh CC (1999). Implications for atypical antioxidative properties of manganese in iron-induced brain lipid peroxidation and copper-dependent low density lipoprotein conjugation. *Neurotoxicology* 20: 455-466.

Szuran T, Zimmermann E, Pliska V, Pfister HP, Welzl H (1991). Prenatal stress effects on exploratory activity and stress-induced analgesia in rats. *Dev Psychobiol* 24: 361-372.

Szuran T, Zimmermann E, Welzl H (1994). Water maze performance and hippocampal weight of prenatally stressed rats. *Behav Brain Res* 65: 153-155.

Takeda A, Ishiwatari S, Okada S (1999). Manganese uptake into rat brain during development and aging. *J Neurosci Res* 56: 93-98.

Thorne BM, Cook A, Donhoe T, Lyon S, Medeiros DM, Moutzoukis C (1987). Aluminum toxicity and behavior in the weanling Long-Evans rat. *Bull Psychon Soc* 25: 129-132.

Treinen KA, Gray TJB, Blazak WF (1995). Developmental toxicity of mangafodipir trisodium and manganese chloride in Sprague-Dawley rats. *Teratology* 52: 109-115.

University of Washington (1998). Neuroanatomy interactive syllabus, version 1.2.X. Atlas d'Anatomia.

Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav* 28: 336-348.

U.S. Environmental Protection Agency (1985). Toxic Substances Control Act Testing Guidelines, 40 CRF, part 798, subpart G, section 798.6050. *Federal Register*, 50: 39458-39460.

U.S. Environmental Protection Agency (1986). Guidelines for the health assessment of suspect developmental toxicants. *Federal Register* 51: 34028-34040.

U.S. Environmental Protection Agency (1991). Neurotoxicity Test Guidelines Addendum 10, Pesticide Assessment Guidelines Subdivision F. Publication PB 91-154617. National Technical Information Services, Springfield, UA.

U.S. Environmental Protection Agency (1991). Guidelines for the health assessment of suspect developmental toxicants. *Federal Register* 56: 63798-63826.

Valdés M, De Flores T (1986). *Psicobiología del estrés*. Ediciones Martínez Roca SA, Barcelona.

Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S (1997). Prenatal stress induced high anxiety and postnatal handling induced low anxiety in adult offspring: correlation with stress induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17: 2626-2636.

Verity MA (1999). Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 20: 489-498.

Vieregge P, Heinzow B, Korf G, Teichert H-M, Schleifenbaum P, Möisinger H-U (1995). Long term exposure to manganese in rural well water has no neurological effects. *Can J Neurol Sci* 22: 286-289.

Vitarella D, Wong BA, Moss OR, Dorman DC (2000). Pharmacokinetics of inhaled manganese phosphate in male Sprague-Dawley rats following subacute (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 163: 279-285.

Vogel MH (1987). Stress –the neglected variable in experimental pharmacology and toxicology. *Trends Pharmacol Sci* 8: 35-38.

Vogel MH (1993). The effect of stress on toxicological investigations. *Hum Exp Toxicol* 12: 265-271.

Vom Saal FS (1983). Variation in infanticide and parenteral behavior in male mice due to prior intrauterine proximity to female fetuses: elimination by prenatal stress. *Physiol Behav* 30: 675-681.

Wadhwa PD, Porto M, Sandman CA, Garite TJ (1993). A biopsychosocial investigation of the effects of stress on birth outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 168: 320.

Ward GR, Wainwright PE (1988). Reproductions in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice. *Physiol Behav* 44: 781-786.

Webster WS, Valois AA (1987). Reproductive toxicology of manganese in rodents, including exposure during the postnatal period. *Neurotoxicology* 8: 437-444.

Wennberg A, Iregren A, Struwe G, Cizinsky G, Hagman M, Johansson L (1991). Manganese exposure in steel smelters a health hazard to the nervous system. *Scand J Work Environ Health* 17: 255-262.

Weiss B (1990). Risk assessment: the insidious nature of neurotoxicity and the aging brain. *Neurotoxicology* 11: 305-323.

Weiss B, O'Donoghue JL (1994). *Neurobehavioral Toxicity. Analysis and interpretation.* Raven Press, New York.

Wexler B (1980). Transplantation of pituitary and adrenal glands of spontaneously hypertensive rats into hypophysectomized or adrenalectomized, normotensive Sprague-Dawley rats. *Br J Exp Pathol* 61: 429-439.

Wood GE, Shors TJ (1998). Stress facilitates classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4066-4071.

Zelikoff JT, Bertin JE, Bubacher TM, Hunter ES, Miller RK, Silbergeld EK, Tabacova S, Rogers JM (1995). Health risks associated with prenatal metal exposure. *Fundam Appl Toxicol* 25: 162-170.

Zheng W (1996). Choroid plexus and mental toxicity. En: *Toxicology of Metals*. Chang LW (ed), CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 609-626.



## VIII. ANNEXES

### 1. Abreviacions més utilitzades

**ACTH:** hormona adrenocorticotropa

**Ca:** Calci

**CRH:** factor alliberador d'hormona adrenocorticotropa

**Da:** Dopamina

**E:** Adrenalina

**Fe:** Ferro

**HPA:** hipotàlem-hipòfisi-adrenal

**I.p.:** Intraperitoneal

**IRM:** Imatge per Resonància Magnètica

**LCR:** Líquid Cèfalo-Raquidi

**MAO:** Mono-Amino-Oxidassa

**MMT:** Metilciclopentadienil-manganès-tricarbonil

**Mn:** Manganès

**MP:** Malaltia de Parkinson

**NE:** Noradrenalina

**NOEL ó NOAEL:** “No Observed (Adverse) Effects Level” o Nivell on no s'observen efectes (adversos)

**PET:** Tomografia per Emisió de Positrons

**SN:** Sistema Nerviós

**SNC:** Sistema Nerviós Central

**SNP:** Sistema Nerviós Perifèric

**SNS:** Sistema Nerviós Simpàtic

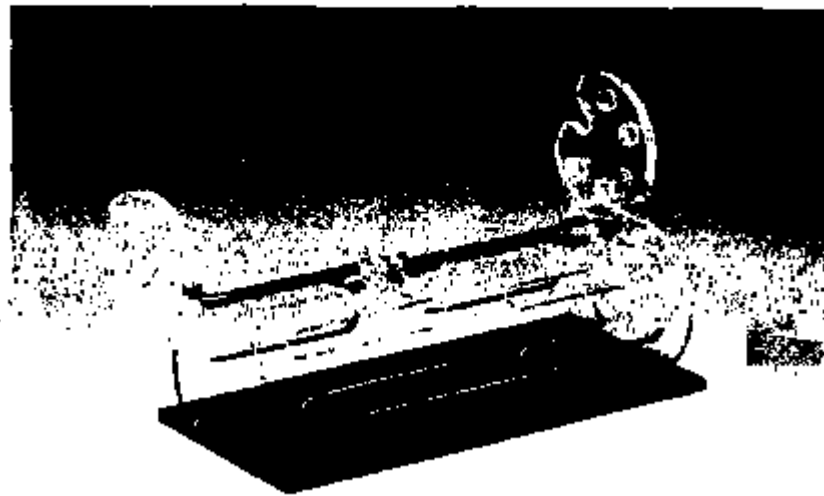
**SNV:** Sistema Nerviós Vegetatiu



## 2. Gàbies d'immobilització



## Cepos para roedores



Los cepos para roedores son fabricados a partir de cilindros de metacrilato transparente montados sobre una base plana de metacrilato negro. Todos los modelos disponen de acceso libre por ambos extremos, con una puerta de trampilla que se fija mediante un tornillo en la parte superior del cepo.

Las puertas permiten la inmovilización del animal gracias a su desplazamiento longitudinal. Una ranura en la parte inferior de la puerta permite que la totalidad de la cola esté accesible para la instalación del transductor y manguito en la medición incruenta de presión arterial, la administración i.v. o la extracción de sangre.

La sencilla manobra de las puertas de acceso y su disposición en ambos extremos del cepo hace que tanto la entrada como la salida de los animales se realice con facilidad y sin necesidad de arrastrarlos hacia atrás.

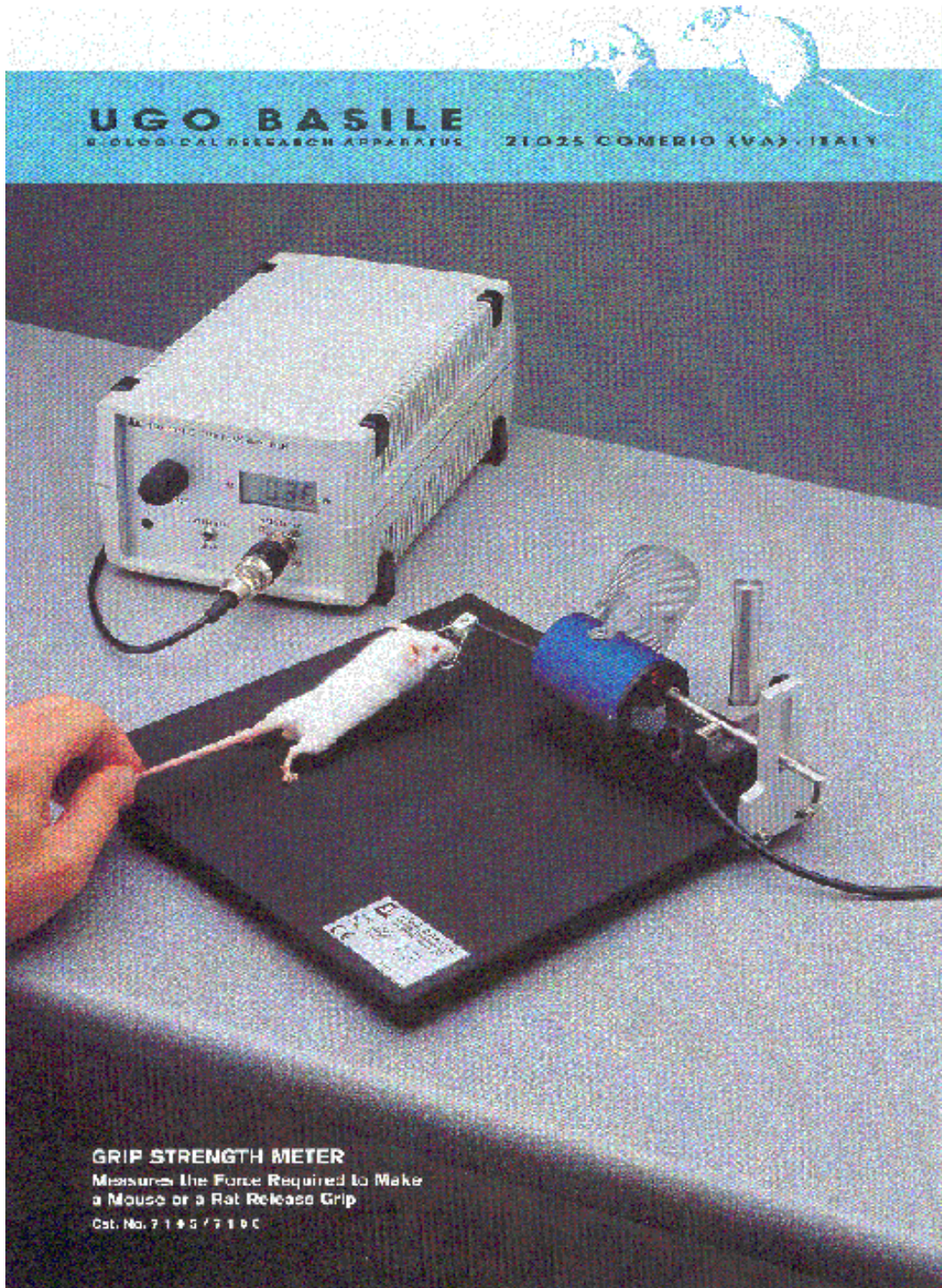
Los cepos están disponibles en 6 tamaños diferentes que cubren todo el espectro de peso de rata y ratón.

Referencia	Descripción
x LE 5016	Cepo para ratón de hasta 30 g
LE 5018	Cepo para ratón de hasta 50 g
LE 5020	Cepo para rata de hasta 150 g
LE 5022	Cepo para rata de hasta 250 g
x LE 5024	Cepo para rata de hasta 400 g
LE 6025	Cepo para rata de hasta 500 g

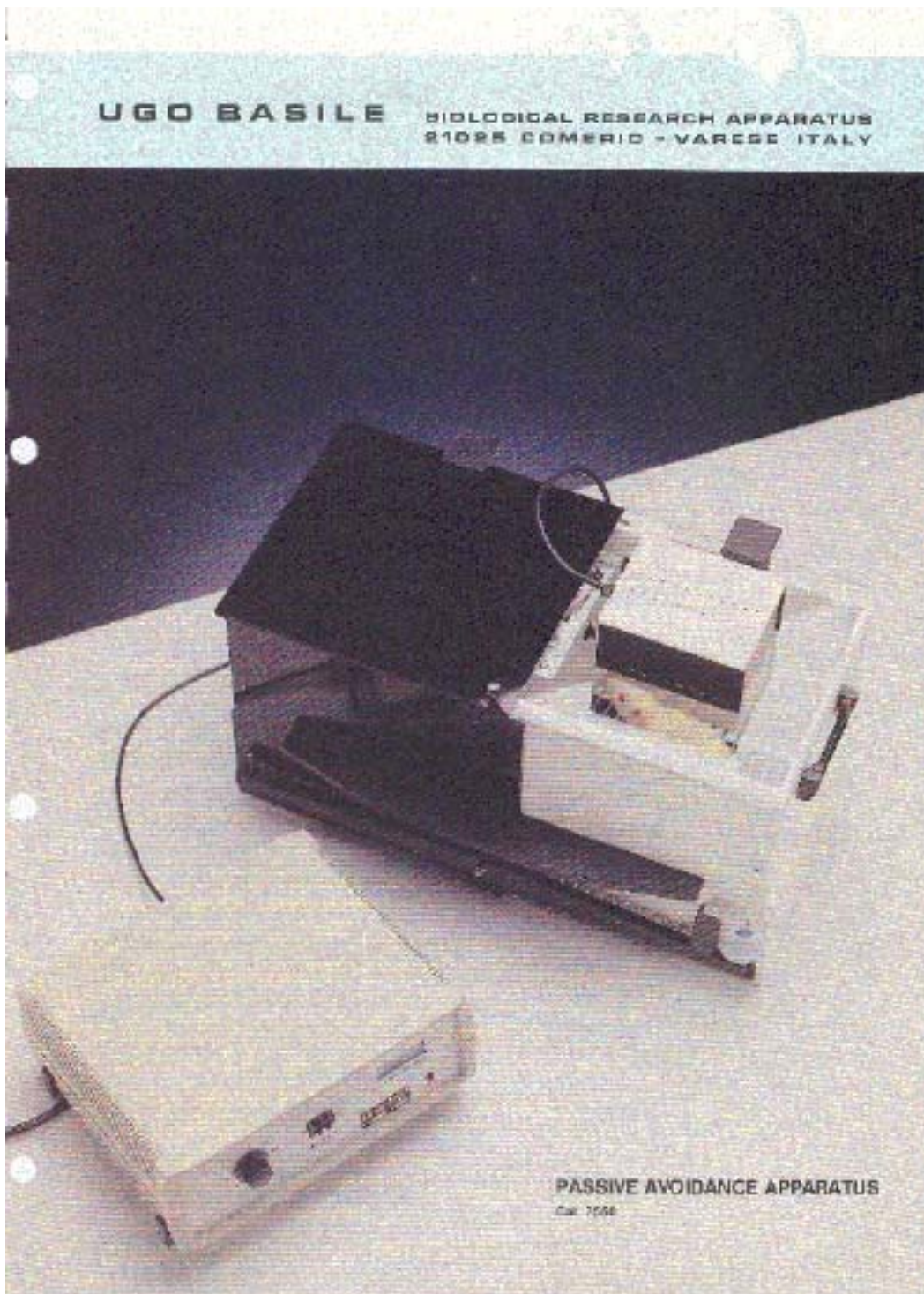
**Pb** Panlab s.l.  
C/Loreto 50  
08029 BARCELONA  
ESPAÑA

Tel. +34 93 419 07 09  
Fax+ 34 93 419 71 45  
email: panlab@bcn.servicom.es

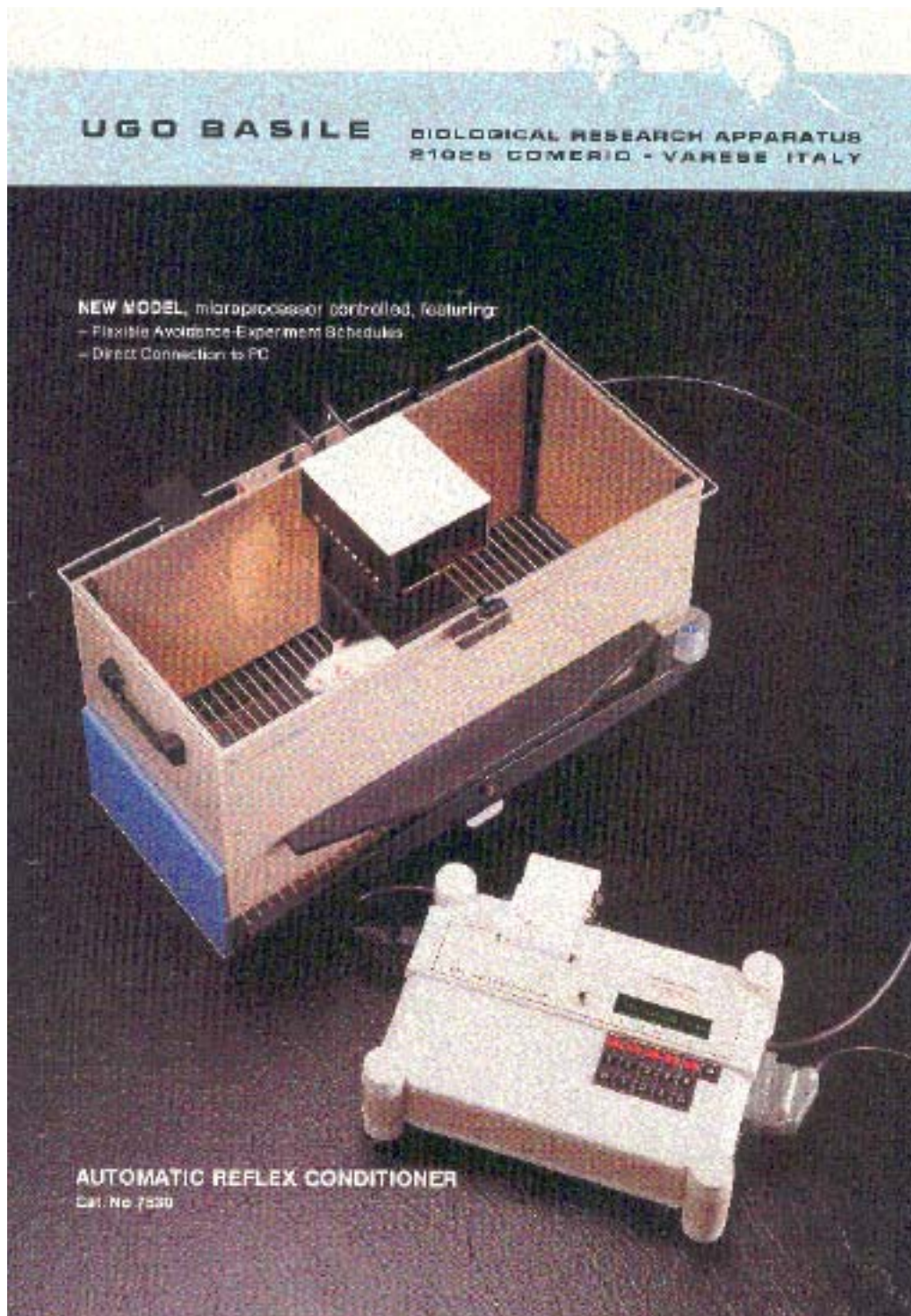
### 3. Mesurador de força



#### 4. Aparell d'evitació passiva



## 5. Aparell d'evitació activa



## 6. Protocol per transparentació de fetus

### TRANSPARENTACIÓ D'EMBRIONS

- 1- Mínim de 3 dies en alcohol 70%
- 2- Dos dies mínim en acetona .
- 3- KOH al 1%, fins a la transparentació.
- 4- Tinció amb vermell d'alizarina al 0.002% en aigua destil.lada, canviar cada dia fins a la tinció.
- 5- Conservar amb glicerina al 40%.
- 6- Per a la conservació a llarg termini utilitzar glicerina al 100%.

#### Observacions :

*El pas núm 2 es convenient allargar-lo fins que la consistència dels embrions sigui prou dura.*

*El pas núm 3 s'ha de revisar a diari, ja que un temps excessiu pot desfer els embrions.*

### CONSERVACIÓ PER EXAMEN VISCERAL

- 1- Mínim de 3 dies en alcohol 70%
- 2- Mínim d'una setmana en líquid de BOUIN<sup>1</sup>.
- 3- Tornar a alcohol de 70%, facilita l'observació.

### IMPORTANT

- 1- **Mantenir un mínim de 500 ml de les diferents disolucions esmentades**
- 2- **Revisar els pots de transparentació a diari.**

<sup>1</sup> Bouin : 1500ml d'aigua destil.lada. + 8 g. d'acid pícric +100ml d'àcid acètic + 500 ml de formol (30-40%)

## 7. Full de registre d'avaluació visceral

Fase II	Teratogenia de:		Grupo.					
<b>EXAMEN VISCERAL</b>								
	Animal n°:		Animal n°:					
<b>FOTOS OBSERVADOS/ FOTOS ANORMALES</b>								
<b>CRANEO</b>								
Faldar burlido								
Asia. septo nasal								
Anoftalmia								
Microftalmia								
Ventric. cerebrales								
Hidrocefalia								
<b>TORAX</b>								
Hiróides-Paratir.								
Timo								
Gl. submaxilares								
Esófago y tráquea								
Corazón y vasos								
Lóbulos pulmonares								
Hernias diafraga.								
<b>ABDOMEN</b>								
Estómago e intestinos								
Lóbulos hepáticos								
Bazo								
Adrenales								
Hipo/hipertir. renal								
Dilat. pelvis/uréter								
Cánceres								

## 8. Full de registre d'avaluació esquelètica

Fase II	Teratogenia de:				Grup:				
<b>EXAMEN ESQUELETICO</b>									
	Animal n°:				Animal n°:				
Fetos observados/ Fetos anormales					Fetos observados/ Fetos anormales				
	<b>CRANEO</b>								
Parietales									
Occipital									
Mandibula									
Otros									
	<b>TRONCO</b>								
Núcleos esternales									
Lifoides									
Costillas (12)									
Núcleos columna									
N° núcleos caudales									
	<b>EXTREMEIDADES</b>								
Metacarpians									
1ª falange									
2ª falange									
3ª falange									
Metatarsians									
1ª falange									
2ª falange									
3ª falange									
Calcáneo									
Observaciones									
<b>F</b> fusión	<b>FR</b> retraso	<b>FC</b> núcleo calcificación extra	<b>A</b> asimetría						

## 9. Fulls de registre de seguiment postnatal

### I. Seguiment postpart

- Identificació:
- Data del part:  Dia de gestació:
- Relació vius/morts:  Pes de la mare:

		<b><u>PES</u></b>		
data	MASCLES	/	FEMELLES	
1				
4				
8				
12				
21				

### ***“MATERNAL” CARE***

dia	data	temps
1		
3		

### **DEVELOPMENT**

#### **Desplegament del pabelló auditiu**

data	mascles	femelles
3		
4		
5		
6		

#### **Erupció d'incissius**

data	mascles	femelles
3		
4		
5		
6		
7		
8		

**Observacions:**



**Opertura d'ulls**

	data	mascles	femelles
12			
13			
14			
15			
16			

**APARICIÓ DE REFLEXES***Amb els animals marcats...***Surface Righting(s)** time

dia-postpart	data	mascles	femelles
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			

**Geotaxi**

dia-postpart	data	mascles	femelles
10			
11			
12			

**Forelimb grip strength**

dia-postpart	data	mascles	femelles
9			
11			
13			
15			

**DESENVOLUPAMENT POST-WEANING**  
**Descens de testicles/Opertura de vagina**

dia-postpart	data	mascles	femelles
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			

**Activitat Open-Field**→1 cop 30 minuts (1 mascle i una femella per ventrada)

**ROTAROD**→1 mascle i una femella per ventrada (s'agafen 3 valors)

	mascle	femella
<b>PES</b> dia:		
<b>FORÇA</b> dia:		
<b>ROTAROD 1</b> dia:		
<b>ROTAROD 2</b> dia:		

**Observacions:**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques  
Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental  
Unitat de Comportament

**AVALUACIÓ DELS EFECTES  
NEUROCONDUCTUALS DE L'EXPOSICIÓ A  
MANGANÈS EN ANIMALS  
D'EXPERIMENTACIÓ. INFLUÈNCIA DE  
L'ESTRÈS.**

**Margarita Torrente Torné  
Tesi Doctoral  
Reus, 2002**

**Als meus pares,  
Joan i Rosa**

## **AGRAÏMENTS:**

A la Dra. Maria Teresa Colomina, directora de la tesi, per les seves recomanacions, el seu temps i la seva dedicació i ajut en tot moment, que ha fet possible l'elaboració d'aquesta tesi.

Al Dr. Josep Lluís Domingo Roig, director del laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental i Catedràtic de Toxicologia, per la direcció i dedicació a aquesta tesi.

Al Josep Lluís Roig, company de la unitat de comportament, per tot el seu ajut en el treball experimental i sobretot per la seva amistat.

A l'Anna, la Carme i el Martí, companys del Laboratori de Toxicologia, i a la Griselda, per tot el seu suport i amistat.

A tots els demés companys i tècnics de Facultat que m'han ajudat en un o altre moment durant el meu treball de tesi.

Als meus germans, Lourdes, M. Rosa i Joan per donar-me ànims en tot moment.

Al José Luis Mansilla, per tota la seva paciència i comprensió.

A la beca del Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya, que ha fet possible aquest treball.

*“La majoria de les idees fonamentals  
en ciència són essencialment senzilles i,  
per regla general, poden ser expressades  
en un llenguatge comprensible per a tots”  
Albert Einstein*

---

<b>I. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
1. Conceptes generals .....	2
1.1. Toxicologia. Conceptes bàsics.....	2
1.2. Toxicologia de la reproducció i el desenvolupament. Conceptes bàsics.....	4
1.3. Neurotoxicologia. Generalitats .....	6
1.4. Neurotoxicologia del desenvolupament .....	10
2. El Manganès (Mn) .....	12
2.1. Generalitats .....	12
2.2. Aplicacions del Mn a la indústria .....	13
2.3. El Mn al medi ambient.....	13
2.4. El Mn en nutrició .....	14
2.5. Absorció, distribució i eliminació del Mn .....	15
2.6. Dèficit de Mn .....	16
2.7. Toxicologia del Mn: excés.....	17
2.7.1. Toxicologia del Mn en humans.....	20
2.7.1.1. En el desenvolupament .....	23
2.7.1.2. En adults.....	25
2.7.1.2.1. Mn i Malaltia de Parkinson (MP) .....	30
2.7.2. Toxicologia del Mn en animals d'experimentació: efectes sobre el comportament.....	31
2.7.2.1. En el desenvolupament .....	33
2.7.2.2. En adults .....	34
3. L'estrès.....	41
3.1. Generalitats .....	41
3.2. L'estrès com a resposta fisiològica .....	42
3.2.1. Diferències individuals en la resposta a l'estrès .....	45
3.2.2. Models d'estrès en animals d'experimentació .....	46
3.2.2.1. Administració d'hydrocortisona .....	46
3.2.2.2. Estrès per immobilització ("restraint") .....	47
3.2.2.3. Estrès per soroll .....	47

---

3.3. Efectes de l'estrès en el desenvolupament.....	48
3.4. Efectes de l'estrès en l'adult .....	51
3.4.1. Estrès i funció cognitiva .....	53
3.4.2. Estrès i psicopatologia .....	58
3.5. Estrès i tòxics .....	60
4. Influència de l'estrès en la neurotoxicitat del Mn.....	62
<b>II. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>64</b>
1. Hipòtesi.....	65
2. Objectiu general.....	65
3. Objectius específics .....	66
<b>III. MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>67</b>
1. Materials .....	68
1.1. Animals d'experimentació .....	68
1.2. Reactius i agents químics.....	68
1.3. Material específic.....	69
2. Metodologia general .....	75
2.1. Aparellament i identificació dels animals.....	75
2.2. Preparació i administració de solucions.....	75
2.3. Recollida de dades i tests .....	76
3. Metodologia específica .....	91
3.1. Estudis de fase II.....	91
3.1.1. Efectes materno i feto-tòxics de l'exposició prenatal a hidrocortisona (HC) i manganès (Mn) .....	91
3.2. Estudis de fase III .....	93



---

3.2.1. Efectes de l'exposició prenatal a Mn i estrès en el desenvolupament postnatal .....	93
3.3. Estudis amb adults .....	96
3.3.1. Efectes de l'exposició crònica d'adults a Mn i estrès .....	96
3.3.2. Efectes neuroconductuals de dos tipus d'estrès: immobilització i soroll.....	98
4. Tractament estadístic de les dades .....	100
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>102</b>
1. Efectes materno i feto-tòxics de l'exposició prenatal a hidrocortisona (HC) i manganès (Mn) .....	103
2. Efectes de l'exposició prenatal a Mn i estrès en el desenvolupament postnatal.....	111
3. Efectes de l'exposició crònica d'adults a Mn i estrès .....	130
4. Efectes neuroconductuals de dos tipus d'estrès: immobilització i soroll .....	155
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>175</b>
1. Efectes materno i feto-tòxics de l'exposició prenatal a hidrocortisona (HC) i manganès (Mn).....	176
2. Efectes de l'exposició prenatal a Mn i estrès en el desenvolupament postnatal .....	179
3. Efectes de l'exposició crònica d'adults a Mn i estrès .....	183
4. Efectes neuroconductuals de dos tipus d'estrès: immobilització i soroll .....	187
5. Discussió general .....	191

---

<b>VI. CONCLUSIONS.....</b>	<b>193</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>196</b>
<b>VIII. ANNEXES.....</b>	<b>230</b>
1. Abreviacions més utilitzades .....	231
2. Gàbies d'immobilització.....	232
3. Mesurador de força .....	233
4. Aparell d'evitació passiva.....	234
5. Aparell d'evitació activa.....	235
6. Protocol per transparentació de fetus.....	236
7. Full de registre d'avaluació visceral.....	237
8. Full de registre d'avaluació esquelètica.....	238
9. Fulls de registre de seguiment postnatal .....	239

*“L’home res pot aprendre si no  
és en virtut del que ja sap”  
Aristòtil*

## I. INTRODUCCIÓ

### 1. Conceptes generals.

#### 1.1. Toxicologia. Conceptes bàsics.

La *Toxicologia* és la ciència que estudia les substàncies químiques i els agents físics, en tant en quant siguin capaços de produir alteracions patològiques als éssers vius, a la vegada que estudia els mecanismes de producció d'aquestes alteracions i els medis per contrarestar-les, així com els procediments per detectar, identificar i determinar aquests agents i valorar el seu grau de toxicitat (Repetto, 1997).

Els toxicòlegs estudien la naturalesa dels efectes adversos (inclosos els seus mecanismes d'acció bioquímica i molecular) d'aquestes substàncies i/o agents, i valoren la probabilitat de la seva presència (Eaton i Klaassen, 1996).

Una substància es considera *agent tòxic* quan és capaç de produir en un organisme un efecte nociu o perjudicial per a ell. Aquests efectes nocius poden manifestar-se en poques hores o tardar varis mesos en aparèixer. Així, seguint un criteri cronològic podem classificar la toxicitat en:

-*toxicitat aguda*: quan 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*: quan la manifestació dels efectes nocius apareix a partir dels 3 mesos (Ladron de Guevara i Moya, 1995).

Altres conceptes d'importància en toxicologia són:

-*DL 50* ó *dosis 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 ó nivell sense efecte observable*: és la major concentració o quantitat d'una substància, obtinguda experimentalment, que no causa alteracions en la morfologia, capacitat funcional, creixement, desenvolupament o duració de la vida dels organismes, distingibles dels observats en organismes normals (controls) de la mateixa espècie o soca, sota concentracions idèntiques a les de l'exposició.

*-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).

El contingut de la toxicologia pot ser molt divers segons l'enfocament de l'estudi. Així trobem diferents disciplines dins la toxicologia, com la clínica, la mediambiental o l'experimental. Aquesta última, ja sigui mitjançant models "in vitro" o "in vivo" (animals), intenta descriure els efectes dels tòxics, estudia els mecanismes d'acció i possibles tractaments sempre sota condicions de laboratori que permetin controlar un major nombre de variables. En el cas d'estudis amb animals, el que es pretén és:

- Escollir espècies i soques semblants i que permetin les majors similituds amb els humans en quant al metabolisme de la substància.
- Escollir vies d'administració i temps el més adequats possibles pel que volem estudiar.
- Estudiar diferents dosis per tal d'establir una relació dosi-efecte.
- Utilitzar mètodes sensibles per a la detecció dels efectes tòxics.

En els experiments de toxicologia amb animals de laboratori s'intenta que la via d'administració i la duració del tractament reflecteixin el que seria una exposició humana al tòxic assajat, i que el metabolisme dels animals s'assembli el més possible a l'humà (Manson i Kang, 1989). En qualsevol cas, no sempre és possible aquesta similitud amb la que seria l'exposició al tòxic en humans per raons òbvies, i també dependrà del que es vulgui avaluar i de les característiques de l'estudi.

## **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.

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 al naixement i canvis en el desenvolupament i maduració del sistema nerviós central (SNC) (Zelikoff i cols, 1995). Els efectes més greus de l'exposició prenatal a agents tòxics s'associen amb mort abans del naixement (embrioletalitat), i altres valorats en el moment del naixement: les malformacions i el retard en el creixement (Neubert i cols, 1980). Un dels períodes crítics de susceptibilitat als tòxics és l'organogènesi, etapa on 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 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, donat el seu curt període de gestació i l'ampli nombre d'individus per ventrada, així com el seu baix cost i fàcil manipulació. Actualment, per poder classificar i interpretar millor els resultats, la majoria dels protocols divideixen els treballs en tres fases o classes d'estudis per a l'estudi dels tòxics de la reproducció i del desenvolupament (Bosque, 1991). Depenent dels 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'avalua la toxicitat materna i els potencials embriotòxic i teratogènic de la substància química. Els experiments de la fase II són molt rellevants ja que en ells s'examinen els efectes maternotòxics i els potencials embriotòxics i teratogènics de l'agent tòxic quan aquest 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 a estudiar. D'aquesta manera, podem perfilar millor els efectes de l'exposició tòxica en moments concrets del desenvolupament. S'acostumen a valorar les següents variables:

- la toxicitat materna es referiria al conjunt d'efectes nocius sobre la mare gestant, el comportament, increment de pes, ingesta, pes dels òrgans, funcionalitat orgànica, i incidència de lesions macro o microscòpiques en animals gestants exposats a una determinada substància química (Khera, 1987; Domingo i cols, 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 dona lloc 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, 1991a). En ratolins l'estadi d'embrió es donaria entre els 4 dies i mig fins els 15 dies després de la concepció aproximadament, al qual seguiria l'estadi de fetus (Rough, 1990). En rates, fins a finals de la segona setmana de gestació es dona l'estadi d'embrió, al qual seguiria l'estadi de fetus (Rowett, 1960). Així, en rosegadors, es donaria l'estadi fetal a partir del dia 15 de gestació fins el moment del part. La fetotoxicitat acostuma a donar-se quasi sempre junt amb la toxicitat materna, i molt sovint es considera com a conseqüència directe d'aquesta (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, part, lactància, viabilitat neonatal i desenvolupament de les cries. En aquesta fase el tòxic s'administra des del període final de la gestació fins el deslletament (Domingo i cols, 1988).

### **1.3. Neurotoxicologia. Generalitats.**

La *neurotoxicologia* és la ciència que estudia els efectes adversos estructurals o funcionals en el sistema nerviós (SN) provocats per l'exposició a agents químics. La neurotoxicitat pot ser permanent o reversible, i es pot expressar en canvis estructurals o alteracions funcionals (neuroquímiques, electrofisiològiques, conductuals) (Dorman, 2000). Disfuncions neurològiques característiques, canvis en la conducta i neuropatologia, han estat descrits en humans i en animals com a resultat de l'exposició a mercuri, plom, cadmi, manganès, alumini o arsènic entre altres metalls (Chang, 1996a).

El SN està compost pel cervell, cerebel, tronc del cervell, medulla espinal (sistema nerviós central –SNC-) i els nervis perifèrics (sistema nerviós perifèric –SNP-) que proporcionen innervació motora i sensitiva. El SN està clarament involucrat en el manteniment de la conducta sota condicions normals, així com sota l'exposició a agents químics (MacPhail, 1994).

En neurotoxicologia, 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 del SNC i del sistema nerviós perifèric (SNP). Desviacions dels nivells de rendiment esperat en tasques específiques i tests de funcionament neurològic són considerats com anormalitats (Feldman i cols, 1999).



El SN és el sistema més complex del nostre organisme. A més a més de les funcions de coordinació, les quals estan comunament associades amb el cervell (p. ex. aprenentatge i memòria), virtualment tots els processos fisiològics estan controlats o influenciats pel SN. La complexitat del SN contribueix a la seva vulnerabilitat als insults dels tòxics.

El SN està compost per una àmplia varietat de cèl.lules neuronals i gials. Les neurones poden ser classificades segons la seva localització anatòmica (p. ex. hipocampals, de l'estriat), el seu neurotransmissor principal (p. ex. colinèrgiques, dopaminèrgiques), estructura cel.lular (p. ex. granular, piramidal), o funció (p. ex. neuroendocrines, sensorials). S'han identificat tres classes de neuroglia al sistema nerviós central: astrocits, oligodendrocits i microglia. Les cèl.lules de Schwann són les principals cèl.lules gials del SNP. Les cèl.lules gials són les responsables d'un ampli ventall de funcions, que inclouen el suport i manteniment neuronal, la producció de mielina i la fagocitosi. La preservació de la relació normal entre neurones i glia és crítica pel manteniment de la funció normal del SN (Aschner, 2000a; Dorman, 2000). Els neurotòxics poden alterar aquesta relació danyant de manera selectiva o indiscriminada poblacions de cèl.lules. Una avaluació de la integritat de les neurones i la glia, és per tant crítica per determinar si un agent químic és neurotòxic.

Per altra banda, el SN té una taxa metabòlica molt alta, que és una altra característica que la fa sensible al dany dels tòxics. Aquesta taxa metabòlica és quasi exclusivament dependent del metabolisme aeròbic glucosa-dependent. Així, el SN és extremadament sensible als neurotòxics que afecten la funció mitocondrial i el metabolisme energètic. Un cop danyat el SN pot compensar-se funcionalment però aquesta potencialitat és limitada (Dorman, 2000).

El SN ofereix una diana única amb especials vulnerabilitats a agents tòxics. La seva intricada organització aporta innumerables oportunitats pel trastorn, i la conducta reflexaria un "output" integrat del SN (Weiss i O'Donoghue, 1994).

La toxicologia del comportament és un camp emergent que està esdevenint molt important en l'avaluació del risc de l'exposició a substàncies neurotòxiques, degut a l'alta sensibilitat de la conducta cap a l'acció neurotòxica, i la integració en funcions

conductuals de varis processos subjacents i neurofuncions, com la motora, la sensorial, l'atencional i la motivacional (Lucchini i cols, 2000a).

Una fita principal de la neurotoxicologia moderna és identificar als agents neurotòxics abans de que es presenti l'exposició en humans. Per aquest fi, els estudis experimentals ben dissenyats, conduïts en animals de laboratori són crítics per l'estudi de la neurotoxicitat (Dorman, 2000) (*taula 1.1.*), tot i que en l'actualitat existeixen moltes substàncies mediambientals de les quals encara es desconeix el seu potencial neurotòxic.

Els anàlisis de la conducta, han i continuaran aportant, importants contribucions al coneixement dels efectes tòxics dels agents químics en general i dels efectes neurotòxics en particular (MacPhail, 1994).

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

**Taula I.1. Nivells d'estudi en neurotoxicologia.**

<b>NIVELL D'ESTUDI</b>	<b>TIPUS DE DADES/USOS</b>
<i>→Neuropatologia</i>	
-Microscopi òptic	Identifica llocs vulnerables dins del SN o poblacions de cèl.lules susceptibles. Tincions especials aporten informació sobre la identitat, localització i quantitat de les macromol.lècules.
-Microscopi electrònic	Identifica llocs diana subcel.lulars de neurotoxicitat i una indicació de l'estat metabòlic del SN. Anàlisis de composicions elementals, immunocitoquímica especialitzada i tècniques autorradiogràfiques poden avaluar la distribució subcel.lular de certs xenobiòtics.
<i>→Neuroquímica</i>	
-Estudis de neurotransmissió, lligands i receptors	Avaluen els efectes de l'exposició a les substàncies químiques en els processos neuroquímics bàsics, i poden identificar els mecanismes de neurotoxicitat moleculars i bioquímics. Pot ser avaluat "in vivo" usant una gran varietat de tècniques, incloent microdiàlisi, tomografia per emissió de positrons i altres mètodes d'imatge moderns.
<i>→Electrofisiologia</i>	
-Electroencefalografia	Les tècniques electroencefalogràfiques permeten l'anàlisi funcional de poblacions de neurones. Usada per identificar focus epilèptics i altres condicions neurològiques. Avalua l'estat metabòlic del cervell en general.
-Potencials evocats	Avalua l'activitat funcional del SN a macro o microescala. Inclou les respostes auditives evocades del tronc del cervell, somatosensorials i potencials evocats en flash i patró revertit.
<i>→Conductual</i>	
-Funció cognitiva	Test d'aprenentatge associatiu i no associatiu. Cap test per si sol pot avaluar tots els tipus d'aprenentatge i memòria. Inclou l'evitació passiva i activa, conducta operant controlada i test d'aprenentatge espacial. Influenciat per la funció sensorial, l'arousal general, la motivació i l'activitat motora.
-Funció motora	Els neurotòxics afecten la funció motora via els nervis perifèrics o danyant el SNC. L'activitat motora és una conducta complexa que consisteix en una varietat d'actes motors.
-Funció sensorial	Avalua la integritat dels sistemes visual, auditiu, olfatori, gustatiu i somatosensorial.

#### **1.4. Neurotoxicologia del desenvolupament.**

La neurotoxicologia del desenvolupament ha esdevingut una subdisciplina important i enèrgica, focalitzant el seu camp d'estudi als períodes prenatal i postnatal. Els fetus i els nens són sovint més susceptibles als tòxics químics que alteren l'estructura i/o funció del cervell, tot i que la susceptibilitat varia per cada neurotòxic.

El cervell en desenvolupament és sovint més sensible als neurotòxics. És àmpliament acceptat que el grau de neurotoxicitat varia amb el període de desenvolupament, i pot ser particularment alt en les etapes primerenques d'aquest. Aquesta vulnerabilitat és conseqüència de les característiques dels processos cel·lulars i moleculars implicats en el cervell en desenvolupament. Algunes d'aquestes característiques serien:

- La lenta maduració -p.ex. mielinització, connexions sinàptiques-.
- La immaduresa dels sistemes de protecció -p.ex. la barrera hematoencefàlica-.
- L'especialització cel·lular -cada tipus de cèl·lula és produïda en un període diferent del desenvolupament, i per això és susceptible als tòxics en diferents moments del desenvolupament- (Claudio i cols, 2000).

Existeixen molts exemples a la literatura on alguns agents tòxics resulten en neurotoxicitat per les cries i no necessàriament per la mare. En altres casos, també s'ha trobat en animals d'experimentació que els adults són més susceptibles que els animals en desenvolupament (Paule i cols, 1986; St Omer i cols, 1991). També s'han proposat que les exposicions perinatals a alguns agents podria resultar en 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 el SN (MacPhail, 1994).

S'han utilitzat varis models animals per confirmar la neurotoxicitat en el desenvolupament que pot resultar de l'exposició a diferents agents tòxics – neurotòxics-. Raons ètiques impedeixen testar possibles agents neurotòxics, nous o ja

existents, en humans en desenvolupament. Per aquesta raó, els models animals han esdevingut un mètode comú per avaluar el seu potencial tòxic en el desenvolupament (Slikker, 1994).

## 2. Manganès (Mn).

### 2.1. Generalitats.

El manganès (Mn) és un metall comunament usat amb una àmplia varietat d'aplicacions industrials (Seth i Chandra, 1988). És un metall de transició amb acció fisiològica. Té una densitat de 7.21 g/cm<sup>3</sup>. Als 1260°C es produeix la seva fusió i als 1900°C la seva ebullició.

Els minerals més importants que contenen aquest metall són:

- la pirolusita (diòxid), que té un color negròs.
- la manganita (hidròxid), que té un color gris brillant.
- la psilomelana (òxid mixt de bari i Mn), amb un color negre brillant

(Corbella, 2000).

És un element relativament abundant a l'escorça terrestre (0.085%) que es troba normalment en forma d'òxids en varis tipus de roques (Ladron de Guevara i Moya, 1995). No té un gust o olor especial. El Mn pur seria un metall de color platejat, però no es troba al medi ambient en aquesta forma; més aviat, sempre es troba combinat amb altres elements com l'oxigen, el sulfur o el clorur. Aquestes formes, anomenades compostos, són sòlids que no s'evaporen, però petites partícules del material sòlid poden aparèixer suspeses a l'aire. També alguns compostos del Mn es poden dissoldre a l'aigua i, a baixos nivells, es troben presents normalment a llacs, rius i a l'oceà (Toxicological Profile for Manganese, ATSDR, 2000).

El Mn és un element essencial pels humans i altres espècies per la formació dels ossos, i pel metabolisme dels carbohidrats i lípids (Gerhardsson i Skerfving, 1996). El Mn ingerit normalment a la dieta podria protegir les cèl.lules i les neurones de l'estrès oxidatiu (Sziraki i cols, 1999).

## **2.2. Aplicacions del Mn a la indústria.**

El Mn és àmpliament usat en indústria. També s'ha usat com agent bactericida i com a fungicida. A la indústria s'utilitza en la producció d'acers. En forma metàl·lica es fa servir sobretot en aliatges de ferro i coure per construir hèlices de vaixell, i en la indústria armamentística per la seva resistència a la vibració, rascades i cops.

En forma d'òxids es fa servir en la fabricació de linòleums, piles seques i condensadors, indústria del vidre, ceràmica, fabricació de pintures, esmalts i laques, en la pirotècnia i en la indústria farmacèutica. També (en diferent forma química de les anteriors) com a pigment fosc.

Dins del grup de sals (en diferents formes) s'usa en tintoreria, com a secant empleat en l'adob de cuiros, fabricació de condensadors, secant de vernissos i com a pigment vermell.

Dels compostos orgànics s'utilitza el ciclopentadienil-manganès-tricarbonil i el metilciclopentadienil-manganès-tricarbonil (MMT) com a antidetonant de gasolines.

En l'agricultura, diferents compostos s'empren com a adobs i fungicides (Ladron de Guevara i Moya, 1995).

Així, els minerals de Mn, en les seves diferents formes i compostos, s'utilitzen principalment en la mineria i metal·lúrgia, i la indústria (Plunket, 1978).

## **2.3. El Mn al medi ambient.**

El Mn és àmpliament distribuït al medi ambient. Apareix al sòl, aire, aigua i aliments. Així, tots els humans estan exposats al Mn, el qual és un component natural del cos humà. La dieta és usualment la ruta més important d'exposició dels humans, sent la ingesta típica diària d'1 a 5 mg/dia.

Les exposicions al Mn per damunt de la mitjana són més probables que es donin en fàbriques, zones properes, o en deixalleries que alliberin quantitats significatives de pols de Mn a l'aire (Toxicological Profile for Manganese, ATSDR, 2000).

El límit d'exposició o concentració màxima permissibile de Mn i els seus compostos, segons els autors Dreisbach i Robertson (1988), en el seu llibre d'edició mexicana, són:

• pols	5 mg/m <sup>3</sup> en aire
• fums	1 mg/m <sup>3</sup>
• ciclopentadienil-manganès-tricarbonil	0.1 mg/m <sup>3</sup>
• metilciclopentadienil-manganès-tricarbonil	0.2 mg/m <sup>3</sup>

El ciclopentadienil-manganès-tricarbonil i el metilciclopentadienil-manganès-tricarbonil (MMT) s'utilitzen en alguns països com a additius antidetonants en la benzina. Aquestes substàncies són ràpidament absorbides per la pell (Dreisbach i Robertson, 1988). Ara com ara, s'afegeix com un augmentador de l'octanatge en la benzina sense plom als Estats Units i al Canadà. El Canadà és l'únic país del món que fa ús exclusiu del MMT com agent antidetonant en la benzina sense plom. Tot i que l'MMT està aparentment permès a l'Argentina, Austràlia, Rússia, i condicionalment a Nova Zelanda, no és ben conegut si en l'actualitat es fa servir habitualment en aquests països (Davis, 1998). La combustió del MMT provoca la formació d'òxids de Mn. Aquesta contaminació pot portar a un increment en les concentracions de Mn inorgànic a l'aire.

Per altra part, i menys important com a font d'exposició, existeix una droga “de carrer” anomenada “bazoka”, basada en la cocaïna però contaminada amb carbonat de Mn (Aschner i cols, 2001).

#### **2.4. El Mn en nutrició.**

El Mn és un element essencial requerit pels mamífers, aus, plantes i microorganismes per certes funcions fisiològiques (Seth i Chandra, 1988). La càrrega total en el cos està entre 12 i 20 mg per un home de 70 kg de referència. El seu balanç de Mn s'estimaria com segueix:



- Ingesta:
  - 3.7 mg/dia en menjar i líquids.
  - 0.002 mg/dia en aire.
- Pèrdues:
  - 0.03 mg/dia per orina.
  - 3.6 mg/dia per femta.
  - 0.039 mg/dia per la suor.
  - 0.002 mg/dia pel cabell i les ungles.

(Carson i cols, 1986).

## **2.5. Absorció, distribució i eliminació del Mn.**

Les vies fonamentals d'absorció són la respiratòria i la digestiva. L'absorció oral del Mn és lenta i incompleta, sobre l'1 i el 4 % (Carson i cols, 1986), ja que la solubilitat en els líquids intraluminals del tub digestiu és petita. Es produeixen interaccions entre el ferro (Fe) i el Mn. D'aquesta manera la carència del primer afavoreix l'absorció del segon. De fet, en les anèmies ferropèniques s'absorbeix significativament més Mn que en estats no carencials (Ladron de Guevara i Moya, 1995).

El Mn inhalat, en canvi, és ràpidament tòxic, indicant una absorció més ràpida a través del pulmó (Carson i cols, 1986). Aquesta via és la més freqüentment implicada en les intoxicacions industrials. El pulmó actua com a reservori de Mn, a partir del qual va penetrant a la circulació general (Ladron de Guevara i Moya, 1995).

El Mn és àmpliament distribuït entre els òrgans. Les concentracions més altes es donen a SNC, os, fetge i ronyó. S'acumula a l'interior de les cèl.lules, principalment als mitocondris (Carson i cols, 1986), el que fa que es distribueixi sobretot en els teixits especialment rics en mitocondris, i per tant amb índexs metabòlics més elevats (Ladron de Guevara i Moya, 1995). El Mn és transportat en el sèrum sanguini per la  $\beta$ -globulina. Les concentracions de Mn són 25 vegades més altes en les cèl.lules vermelles que al sèrum; tot i que no s'ha trobat una relació significativa entre l'exposició i les concentracions en sang de treballadors.

L'eliminació del Mn absorbit per via digestiva és pràcticament total a través de la bilis (Carson i cols, 1986). També s'elimina Mn a través de l'orina, via que pot potenciar-se mitjançant la utilització de quelants tipus EDTA. La melanina reté Mn (la substància negra és rica en melanina), el que afavoreix la seva eliminació en forma de grànuls de melanina pel cabell (Ladron de Guevara i Moya, 1995).

## **2.6. Dèficit de Mn.**

El Mn és requerit pel nostre organisme com a nutrient essencial. Tanmateix, no són freqüents els casos de deficiència d'aquest metall donat que a la nostra dieta és present en quantitat suficient. S'ha suggerit una relació entre el Mn i el metabolisme dels carbohidrats. Així, una deficiència de Mn a la dieta resulta en una producció anormal d'insulina i un empitjorament del metabolisme dels carbohidrats. En els individus adults, tant la deficiència de Mn, com l'excés, poden alterar els nivells de catecolamines, i es suggereix un lligam directe entre els nivells de Mn al cervell i el metabolisme i funció catecolaminèrgica (Seth i Chandra, 1988).

Durant l'última dècada s'han descrit varies malalties humanes caracteritzades en part per les baixes concentracions de Mn en sang. Aquestes malalties inclouen l'epilèpsia i l'osteoporosis. Resta per ser determinat si les baixes concentracions de Mn en sang observades en aquestes malalties són una causa o un efecte (Carl i cols, 1993; Keen, 1996).

Un dèficit de Mn a la dieta té relativament poc impacte en adults però pot afectar de manera severa al desenvolupament (Golub i cols, 1991). En quant als possibles efectes d'un dèficit de Mn durant el desenvolupament, s'ha descrit en animals d'experimentació, criats amb una dieta deficient en Mn, un retard en el creixement, anormalitats esquelètiques, disfunció reproductiva i alteracions a nivell del SNC.

Altres investigadors han observat en animals mantinguts amb una dieta deficient en manganès incoordinació, problemes d'orientació i altres dèficits conductuals com atàxia, dèficit d'equilibri, tremolors i marxa retrògrada. La suplementació amb Mn reverteix alguns d'aquests dèficits conductuals (Seth i Chandra, 1988).

Un dels principals efectes del dèficit prenatal del Mn és a l'esquelet. En rates, la descendència de la mare alimentada amb una dieta deficient en Mn ( $< 1 \mu\text{g Mn/g}$  comparat amb la dieta típica control de  $10\text{-}50 \mu\text{g Mn/g}$ ) des del deslletament, mostren un creixement desproporcionat al naixement que es caracteritza per l'escurçament sever dels radis, ulna (cúbit), tibia i fibula (peroné).

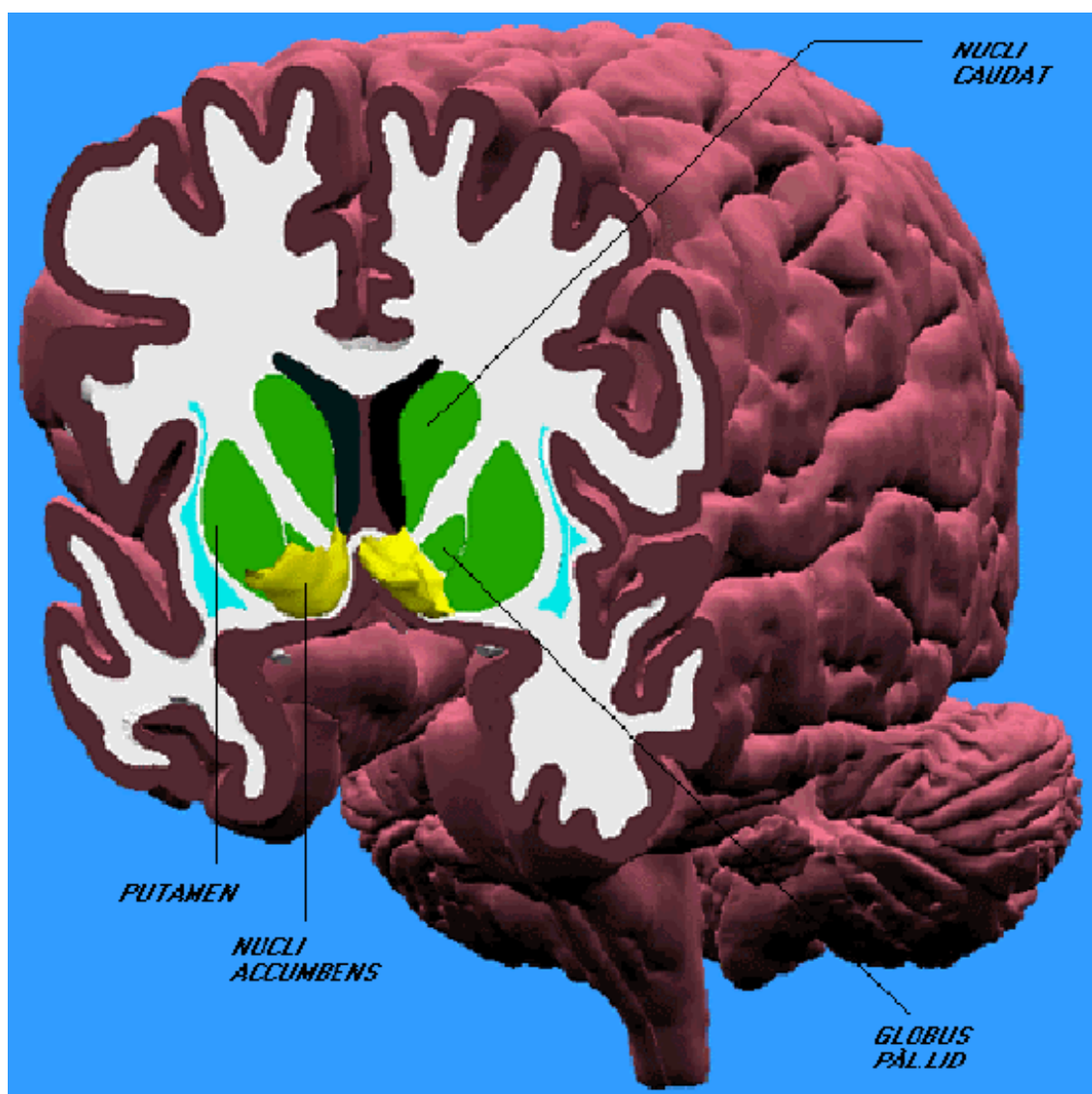
Un efecte espectacular de la deficiència de Mn pot ser l'atàxia congènita irreversible, la qual es caracteritza per una pèrdua de l'equilibri i retracció del cap. Aquesta atàxia és deguda a una anormal desenvolupament dels otolits a l'orella interna. El teixit pancreàtic també pot resultar afectat acusadament (Keen, 1996).

Altres estudis en animals d'experimentació mostren que l'alimentació amb concentracions de Mn molt baixes, afecta el creixement i el metabolisme, fet que s'ha relacionat amb dèficits de les hormones tiroïdals de les cries de les mares exposades a aquesta dieta (Eder i cols, 1996).

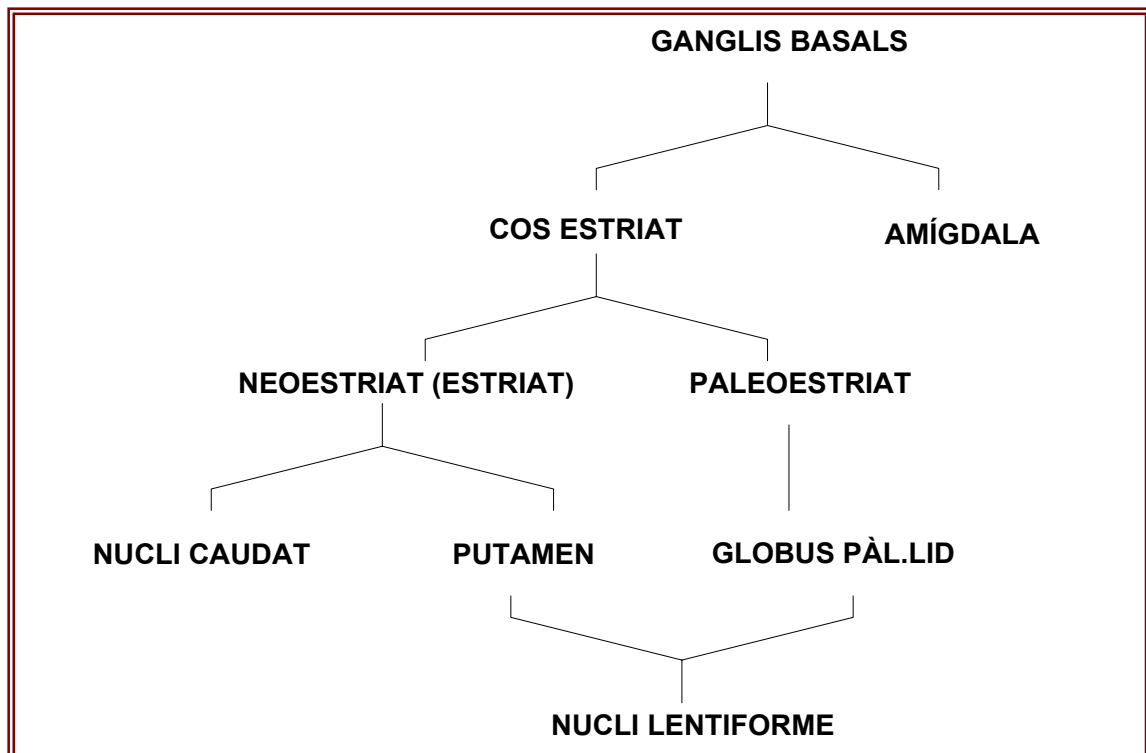
## **2.7. Toxicologia del Mn: excés.**

El Mn, com altres elements essencials, ha de mantenir-se entre uns certs límits de concentració per un funcionament òptim (Mergler, 1999). L'exposició excessiva a Mn està associada amb una malaltia del cervell irreversible anomenada "manganisme", amb alteracions prominentment psicològiques i neurològiques, caracteritzada en el seu inici per una alteració psiquiàtrica ("bogeria mangànica") que recordaria força a l'esquizofrènia (Aschner i cols, 2001). Mentre que la malaltia inicial pot ser reversible, el manganisme més avançat persistiria, essent irreversible (Frumkin i Solomon, 1997).

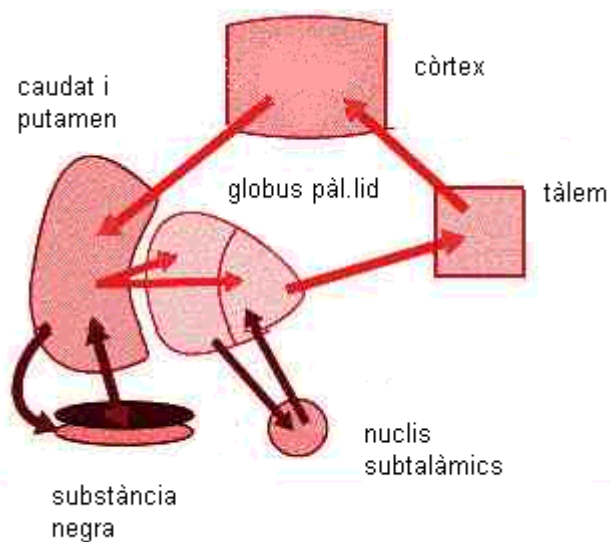
El SNC és el principal teixit diana del Mn. El manganisme està associat a uns nivells de Mn cerebrals alts, principalment en aquelles àrees conegudes per contenir altes concentracions de ferro, que inclouen el caudat-putamen (nucli estriat), globus pàl·lid, substància negra i nuclis subtalàmics (*figures I.2, I.3 i I.4*). Recentment, les Imatges per Ressonància Magnètica (IRM) mostren que existeix una disminució de la circulació sanguínia regional cerebral en el caudat i tàlem (Aschner i Kimelberg, 1996; Aschner i cols, 2001).



*Figura I.2.* Ganglis basals (Atlas d'Anatomia, University of Washington, 1998)



*Figura I.3.* Nomenclatura dels ganglis basals (Crossman i Neary, 2000).



*Figura I.4.* Dibuix esquemàtic de les relacions entre les principals estructures afectades per la intoxicació de Mn (Cardoso, 1997).

L'exposició a nivells alts de Mn estan associats amb alteracions neurològiques i neuropsiquiàtriques (Mergler, 1999).

A la 15<sup>a</sup> Conferència Internacional de Neurotoxicologia (1999), es va considerar el risc per la salut de l'exposició a Mn en el marc ocupacional i ambiental. La introducció d'un compost organomanganèsic com augmentador del grau d'octanatge a la benzina, ha estimulat la revisió de la seva possible toxicitat (Verity, 1999), ja que fins ara existeixen relativament poques descripcions de la toxicitat del Mn a partir d'aigua o de la dieta (Aschner i cols, 2001). Tanmateix, hi ha evidències de que l'ús del MMT a la gasolina incrementarà els nivells de Mn ambientals, augmentant la seva bioabilitat (Frumkin i Solomon, 1997).

Els signes neurològics causats per excés de Mn en el medi ambient han rebut una gran atenció degut a que s'assemblen a alteracions clíniques descrites col·lectivament com una disfunció del sistema motor extrapiramidal, i en particular a la Malaltia de Parkinson (MP) amb distònia (Aschner, 2000b). Mena (1979), va estar entre els primers en reconèixer les similituds entre els signes i símptomes del manganisme i la MP.

Un principi central de la neurotoxicitat del Mn està relacionat amb el rol selectiu que juga la disfunció de les neurones dopaminèrgiques (Verity, 1999), tot i que els mecanismes pels quals el Mn produeix neurotoxicitat no estan clars (McMillan, 1999).

### **2.7.1. Toxicologia del Mn en humans.**

Al segle XIX alguns autors van observar que la pols de Mn produïa un síndrome neurològic en treballadors exposats. Tot i que degut a la millora de la higiene industrial, el manganisme clàssic és rarament vist en miners i treballadors en les societats desenvolupades, les noves aplicacions del Mn, com additiu a la benzina, fa el problema emergent altra vegada (McMillan, 1999). La combustió del MMT incrementarà els nivells inorgànics de Mn ambiental i incrementarà l'exposició de Mn en humans (Aposhian i cols, 1999).

L'MMT, com en el cas dels derivats del plom, és emès des dels tubs d'escapament i dispersat a l'atmosfera. L'exposició a la població té lloc principalment per inhalació de les partícules a l'aire de l'ambient, i secundàriament per la ingestió d'aquestes partícules dipositades al menjar, al sòl i altres superfícies amb que la població en la seva totalitat o subpoblacions entren en contacte (Davis, 1998).

Al contrari que el Mn ingerit, el Mn inhalat és transportat directament del tracte respiratori al cervell abans del seu pas pel fetge (Frumkin i Solomon, 1997; Davis, 1998), i per tant, dosis més baixes de Mn inhalat serien igual o més tòxiques que dosis més elevades de Mn ingerit.

La via d'exposició pot influenciar la distribució, el metabolisme i la neurotoxicitat del Mn. La via oral és considerada la menys importat per als propòsits d'avaluació de risc, ja que el Mn és pobrament absorbit des del tracte gastrointestinal (absorció neta < 5%) i els nivells de Mn es mantenen relativament constants al cervell i altres teixits. En contrast, la inhalació és més eficient que la ingestió, aportant Mn al cervell (Aschner i cols, 2001). L'eliminació del Mn del SNC és lenta (Newland, 1999). El fetge juga un rol clau mantenint les concentracions normals de Mn a l'organisme. El Mn absorbit des del tracte gastrointestinal és portat primer cap al fetge, no arribant gairebé a la circulació sanguínia (Aschner i cols, 2001).

El Mn produeix una toxicitat retardada i acumulativa (Newland, 1999). Aquest mecanisme d'acció acumulatiu del Mn s'ha de tenir molt en compte a l'hora de fixar el nivell d'exposició segur (Lucchini i cols, 1999), per cada via.

Tot i que l'ús de l'MMT resultaria en només un petit increment en l'exposició a Mn per la majoria de la població, certes poblacions estarien desproporcionadament exposades. Subpoblacions susceptibles com nens, dones embarassades, persones grans, individus deficientes en ferro (Fe) i calci (Ca), i individus amb problemes hepàtics (Davis, 1998), tindrien un potencial increment per una càrrega excessiva de Mn al cos atribuïble a un increment de l'absorció o una alteració dels mecanismes d'eliminació com s'ha suggerit, segons dades limitades. Causes d'aquesta susceptibilitat en les diferents poblacions serien:

- En lactants, perquè el Mn es transmet a través de la placenta i per la llet materna.
- Nens, pel seu metabolisme particular i perquè el seu sistema nerviós està en desenvolupament.
- Les dones embarassades i també mares que esta alletant, degut a dèficit de ferro i dèficit de calci.
- Gent gran. Són una població preocupant, tenint en compte que una substancial proporció d'aquests desenvolupa la MP idiopàtica, i per tant, és possible que altres tinguin una tendència subclínica per la disfunció en el globus pà.lid, substància negra i nucli estriat. Aquest subgrup de gent pot ser posat "al límit" incrementant l'exposició a Mn.
- Individus amb malaltia neurològica preexistent, els quals serien d'especial risc degut al potencial de la combinació.
- Persones amb deficiència de ferro, perquè l'absorció gastrointestinal de Mn és augmentada per aquesta deficiència (Frumkin i Solomon, 1997); i també amb dèficit de calci.

La intoxicació per Mn pot donar-se per exposicions agudes o de curta durada o per exposicions cròniques o de llarga durada, que donarien lloc al manganisme.

S'han fet estudis en poblacions exposades a importants nivells de Mn en aigua i aire, estudiant varis tòxics en general a més del Mn (p.ex. Mergler i cols, 1998), en àrees concretes amb resultats poc concloents (p.ex. Vieregge i cols, 1995; Santos-Burgoa i cols, 2001).

Els mecanismes precisos de la neurotoxicitat del Mn no són ben coneguts, tot i que sembla que el Mn pot afectar varis aspectes de l'estructura i funció del SNC en els humans (Davis, 1998).

La literatura científica suggereix el lligam de varis neurotransmissors en la toxicitat del Mn. S'ha vist que altera el nivells de varis neurotransmissors i l'activitat d'alguns dels enzims involucrats en el metabolisme dels neurotransmissors, a més de modificar la sensibilitat d' alguns receptors.

El dany a les neurones catecolaminèrgiques podria ser causat pels radicals lliures i quinoides formats com a resultat de l'autoxidació de la dopamina (Da) catalitzada



pel Mn. El sistema dopaminèrgic apareix com el més sensible al Mn, i aquest sembla que juga un paper significatiu en el desenvolupament normal de les funcions dopaminèrgiques (Seth i Chandra, 1988). La toxicitat del Mn podria estar relacionada amb la seva habilitat per accelerar l'oxidació de les catecolamines (Lloyd, 1995). El Mn s'acumula dins la mitocondria preferentment, via calci, i està associat amb una inhibició de la fosforilació oxidativa (Verity, 1999).

Algunes troballes postmortem, tant en humans com en animals, han revelat una degeneració neuronal al cos estriat (nucli caudat, putamen i globus pà.lid), així com en neurones dopaminèrgiques de la substància negra (Cuesta de Di Zio i cols, 1995), mentre que altres autors només parlen d'atròfia i disminució de les cè.l.lules del globus pà.lid (Dreisbach i Robertson, 1988).

#### **2.7.1.1. En el desenvolupament.**

Històricament, les exposicions severes a Mn havien estat restringides als treballadors adults del sexe masculí en les indústries basades en aquest metall. La possibilitat de que un excés d'exposició al Mn pugui donar-se a prop d'algunes refineries, o fins i tot en l'ambient general, podria significar que la toxicitat del manganès sigui un seriós perill per la salut de les dones i nens que visquin en ambients altament exposats (Corbella i Domingo, 1996).

Generalment, la majoria dels estudis s'han centrat en subjectes adults, enlloc de en població general. Els treballadors adults de sexe masculí no poden ser considerats òbviament representatius de grups com persones grans, nens, dones embarassades i altres poblacions susceptibles com ara els malalts hepàtics i amb dèficit de ferro (Davis i Elias, 1996; Davis, 1999).

Tot i que hi ha estudis que suggereixen que el Mn és requerit en grans quantitats durant la infància, i que un subministrament de Mn suficient és crític per un desenvolupament normal del cervell (Takeda i cols, 1999), els nens serien una de les subpoblacions més susceptibles als efectes tòxics del Mn. El SN dels nens està en desenvolupament, els seus sistemes de neurotransmissió són immadurs i això comporta una certa vulnerabilitat afegida (Seth i Chandra, 1988).

Es considera que aquest és un període especialment susceptible a un ampli rang d'exposicions tòxiques (Frumkin i Solomon, 1997). Els animals molt joves no només absorbeixen i retenen Mn de manera excepcional. També han mostrat una acumulació relativa més gran del Mn al SNC. S'ha vist que els nadons alimentats amb fórmules que contenen Mn, tenen nivells més alts d'aquest element al cabell que els nadons alletats per la mare, i els nens hiperactius tenen nivells de Mn més alts al cabell que els controls (Frumkin i Solomon, 1997).

Els nens formarien també part d'una de les dues subpoblacions més exposades, juntament amb treballadors exposats ocupacionalment, si aquest metall, degut sobretot a l'ús de l'MMT a la gasolina, es troba a l'ambient, per varies raons:

1. Presenten una taxa respiratòria més alta.
2. L'absorció gastrointestinal és superior en els nens que en els adults.
3. A través de les estones de joc a l'exterior a prop d'àrees amb alt nivell de trànsit de vehicles, estarien altament exposats per l'aire i pel sòl (Frumkin i Solomon, 1997).

El Mn travessa la barrera hematoencefàlica tant dels neonats com del fetus en desenvolupament (Aschner, 2000b).

Existeix un nombre limitat d'estudis adreçats a investigar els dèficits neurològics de l'exposició a Mn en nens (Aschner, 2000b). Tanmateix, està força acceptat que l'exposició a Mn durant un període limitat del desenvolupament primerenc podria ser capaç d'induir danys permanents o irreversibles al SNC en desenvolupament (Davis, 1998).

La competició entre el Fe i el Mn pel mateix sistema de transport, comporta unes importants implicacions pel potencial increment de l'acumulació de Mn al SNC en poblacions ferrodeficients. Degut a que ambdós, Mn i Fe, comparteixen similituds en la seva química i bioquímica, és raonable postular que els mecanismes subjacents a la distribució del Mn, en la salut i en la malaltia, i en els individus en desenvolupament són dependents de l'homeostasi del Fe (Aschner, 2000b). No s'han portat a terme estudis a llarg termini de nens exposats a Mn (Davis i Elias, 1996).

Es sap que l'exposició a certs metalls, com per exemple el plom, té efectes neurotòxics sobretot durant certs "estadis crítics" del desenvolupament humà. Per tant, aquestes evidències, augmenten la probabilitat de que l'exposició a Mn durant

---

un període limitat en el desenvolupament primerenc, sigui capaç d'induir danys permanents o irreversibles al SNC en desenvolupament. Els nens, a més, tindrien un risc afegit per les seves característiques metabòliques i, a la llarga, per la possible acumulació dels efectes tòxics durant els anys que condueixen a l'adulthood i vellesa, si segueix l'exposició (Davis i cols, 1998).

La potencial toxicitat en el desenvolupament deguda a l'exposició prenatal del Mn, sembla força provada, tot i que les concentracions mínimes i la durada de l'exposició suficients per induir els efectes adversos no estan ben definides (Davis, 1998; Davis, 1999).

### **2.7.1.2. En adults.**

La neurotoxicologia del Mn es coneix des de fa més de 150 anys. Des de llavors, el síndrome tòxic ha estat descrit en varis grups de miners i altres treballadors altament exposats (Iregren, 1999). S'han descrit també casos d'intoxicació per Mn en famílies exposades a altes dosis d'aquest metall a través d'aigua contaminada, així com en pacients amb malaltia hepàtica, i en nens que rebien nutrició parenteral per un període perllongat (Calabresi i cols, 2001).

Els efectes tòxics de l'exposició a Mn en el SNC un cop establerts són irreversibles. D'aquí la importància que té la detecció primerenca dels primers símptomes i signes de neurotoxicitat en poblacions de risc (Iregren, 1999).

Dels miners exposats a pols de Mn, només una petita proporció desenvolupa el "manganisme", el que fa pensar que existeixen diferències individuals en quant a vulnerabilitat.

El Mn és absorbit per l'intestí, així com a través de l'epiteli alveolar pulmonar. Un cop a la circulació sistèmica fàcilment entra al cervell (Kopin, 1994). A concentracions normals en plasma, el Mn entra al SNC principalment travessant la barrera hemato-encefàlica pels capil·lars de l'endotel·li, mentre que a altes concentracions predominaria el transport a través del plexe coroide (Zheng, 1996; Aschner i cols, 2001).

Segons alguns investigadors (Calabresi i cols, 2001), els símptomes conductuals descriurien una fase clínica primerenca del manganisme causada per un control inhibitori dopaminèrgic anormal en els inputs cortico-estriats.

El curs clínic del manganisme, descrit en centenars de casos d'intoxicació per miners, treballadors de la indústria i agricultura, pot ser dividit en 3 fases:

- 1- Una fase inicial on predominen els símptomes subjectius, on poden succeir episodis psicòtics. Aquesta fase acostuma a durar varis mesos.
- 2- Una fase intermitja on predominen els símptomes neurològics. Aquesta fase també pot durar varis mesos.
- 3- Una fase establerta amb dèficits neurològics persistents, dèficits que poden persistir i progressar encara que l'exposició a Mn cessi (Chang, 1996b; Mergler i Baldwin, 1997; McMillan, 1999).

Alguns estudis indiquen que la progressió clínica en aquests pacients continua fins i tot 10 anys després d'acabar-se l'exposició (*taula I.5*) (Seth i Chandra, 1988; Huang i cols, 1998).

**Taula I.5. Alguns signes i símptomes neurològics del manganès en humans.**

FASE DE LA MALALTIA	ALTERACIONS NEUROLÒGIQUES SIGNIFICATIVES
1. Fase prodròmica	Apatia, astènia, anorèxia, insomni, dolors musculars, excitament mental, al.lucinacions, riure incontrolat, memòria empitjorada, accions compulsives, excitament sexual seguit d'impotència.
2. Fase intermèdia	Alteracions de la parla, moviments irregulars ("patosos"), marxa anormal, balanceig alterat, reflexes exagerats en les extremitats inferiors, falta d'expressió a la cara, tremolors.
3. Fase establerta	Rigidesa muscular a les extremitats, marxa anomenada "de gall" (aixecant els talons), tremolors, riure espasmòdic, sudoració excessiva.

La clínica més característica és la “marxa de gall”. Aquesta dificultat en el caminar pot ser unilateral, però usualment és bilateral i es considera una forma de distònia. Generalment, esdevé prominent després de caminar una distància curta i representa una manifestació severa del manganisme crònic (*figura I.6*) (Huang i cols, 1997).

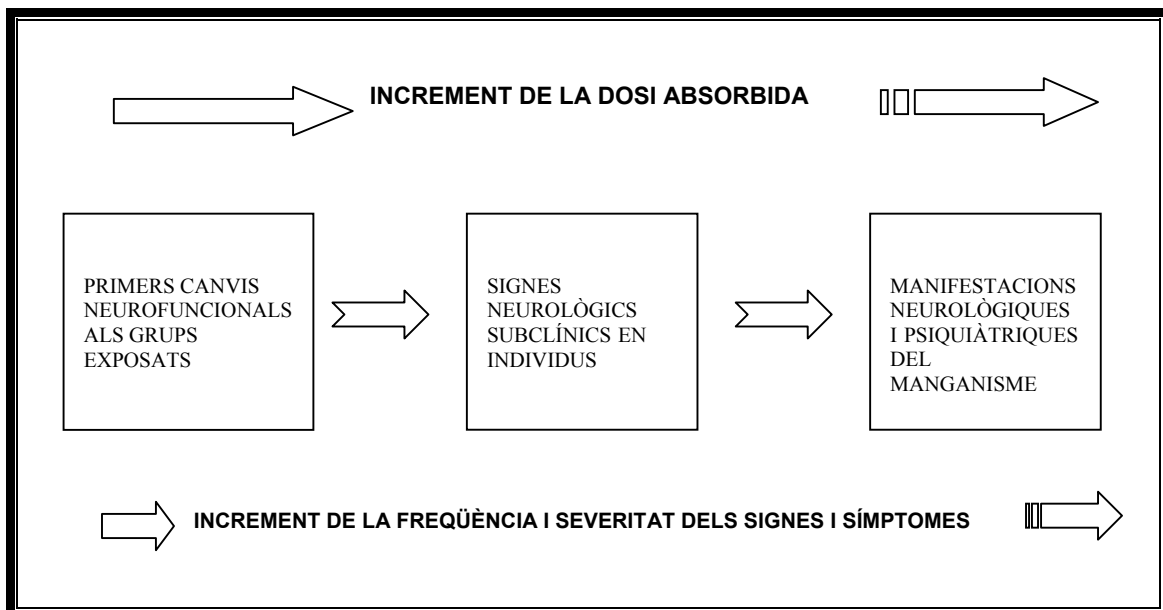


*Figura I.6. “Cock gait” o  
“Marxa de gall”  
(Inoue i Makita, 1996)*

En els estudis ocupacionals s’han utilitzat diverses proves i bateries d’estudi neuropsicològic que han aportat resultats valuosos i força coherents respecte a la neurotoxicitat del Mn. Així, s’han pogut detectar tant alteracions motores com cognitives (Iregren, 1999).

Alguns autors indiquen que la toxicitat del Mn podria no ser clínicament evident fins alguns anys després de l'exposició (Davis i cols, 1998). Tanmateix, altres autors (Mergler i Baldwin, 1997) afirmen que és possible detectar els primers signes de disfunció neurotòxica associada a l'exposició a Mn tant ocupacional com ambiental (*figura I.7*).

**Figura I.7. Progressió dels canvis neurofuncionals associats a l'exposició a manganès.**



Degut a l'interès per conèixer la toxicitat a baixos nivells d'exposició a Mn, varis grups d'investigadors (Siegl i Bergert, 1982; Roels i cols, 1987; Iregren, 1990; Huan i Huang, 1991; Wennberg i cols, 1991; Roels i cols, 1992; Mergler i cols, 1994; Lucchini i cols, 1995; Sjögren i cols, 1996) han fet servir tests neuroconductuals sensibles per estudiar treballadors exposats a baixos nivells de Mn, aparentment lliures de malaltia. Existeix una bona consistència en els resultats. L'activitat motora i la memòria estarien afectades per l'exposició a nivells prou baixos com per no causar toxicitat clínicament evident. L'alteració més consistent trobada en els estudis va ser una funció empitjorada en les tasques que requerien moviments coordinats, seqüencials o alternats a una velocitat ràpida. Aquests signes sembla que liderarien el principi de la toxicitat del sistema piramidal. Iregren (1994) va suggerir que l'habilitat per repetir moviments simples podria ser particularment

---

sensible a l'exposició a Mn, i concloure que els efectes del Mn sobre el SNC serien principalment una interferència en la iniciació del moviment. Altres autors (Barrington i cols, 1998) han fet servir proves de personalitat per valorar la neurotoxicitat del Mn però sense resultats conclouents.

Per altra banda, sembla que existeixen diferències entre sexes en quant a la vulnerabilitat pels efectes tòxics del Mn, essent els homes els més sensibles (Mergler i cols, 1999). En quant a la funció reproductiva es veu afectada en homes (impotència, pèrdua de la líbido, disminució de la fertilitat), però no ha estat prou investigada en dones (Frumkin i Solomon, 1997; Davis i cols, 1998; Davis, 1999; Toxicological Profiles of Manganese, ATSDR, 2000).

Algunes investigacions han suggerit també l'associació d'una conducta agressiva amb l'exposició a Mn (Gottschalk i cols, 1991).

A part de les proves neurològiques i neuropsicològiques, s'ha intentat buscar marcadors/biomarcadors que puguin permetre valorar l'exposició a Mn i la possible afectació (p.ex. Manzo i cols, 2001). Fins i tot, s'ha parlat de la mesura de l'esmalt dental per valorar l'exposició a Mn (Ericson i cols, 2001), a més del típic índex dels nivells en sang (Lucchini i cols, 2000b). Les baixes concentracions de Mn a la sang no poden ser garantia d'absència de nivells significatius a SN. Els nivells fecals, reflecteixen primàriament el Mn no absorbit de la dieta; així que no pot ser un marcador de la càrrega al cos. La sang, la femta i l'orina no reflecteixen les concentracions de Mn al SNC, mentre que el cabell no ha estat validat com a biomarcador (Newland, 1999).

Característic del Mn és el dany al globus pà.lid. Aquesta regió conté neurones dopaminèrgiques i receptors de dopamina (Da) (Verity, 1999). D'aquí que s'hagi començat a utilitzar també com a indicador d'exposició al Mn el que s'ha arribat a anomenar fins i tot "Índex del pà.lid", que és la visualització per IRM de l'acumulació de Mn al globus pà.lid i/o als ganglis basals en general (Butterworth i cols, 1995; Misselwitz i cols, 1995; Pal i cols, 1999; Lucchini i cols, 2000b).

### 2.7.1.2.1. Mn i Malaltia de Parkinson (MP).

Alguns investigadors (Landrigan i cols, 1993) parlen de que les exposicions a altes dosis de Mn poden produir MP, però tot i que hi ha un interès en la possible exposició a pesticides i a altres toxines com a causants de malalties neurodegeneratives en humans (Giasson i Lee, 2000), i que en alguns casos de MP s'ha trobat concentracions elevades en sang de Mn (Durán i Chacón, 2001), cal distingir clarament la MP idiopàtica, de la típica malaltia neurotòxica produïda pel Mn o “manganisme”. A diferència de la MP, el manganisme també produeix distònia, un signe neurològic associat amb el dany al globus pàllid (Calne i cols, 1994; Aschner i cols, 2001) (*figura I.8*).



*Figura I.8.* Postura distònica en la marxa (Inoue i Makita, 1996).



En el manganisme, a diferència de la MP, s'acostuma a trobar:

- 1- Un tremolor en repòs menys freqüent.
- 2- Distònia més freqüent.
- 3- Una propensió particular a caure cap enrera.
- 4- Fracàs per arribar a una resposta terapèutica mantinguda a la levodopa.
- 5- Fracàs en detectar una reducció de la captació de la fludopa mitjançant PET (Tomografia per Emissió de Positrons).
- 6- Preservació del circuit dopaminèrgic nigro-estriat (Aschner i cols, 2001).

Així, la MP, el parkinsonisme vascular, el parkinsonisme postencefàlic i el parkinsonisme tòxic han d'ésser diferenciats. Els símptomes desenvolupats en l'enverinament o toxicitat per Mn freqüentment són bastant semblants als de la MP, però l'avaluació neurològica detallada revelarà la diferent simptomatologia en la toxicitat del Mn (Inoue i Makita, 1996).

### **2.7.2. Toxicologia del Mn en animals d'experimentació: efectes sobre el comportament.**

Els estudis de neurotoxicitat del Mn conduïts en poblacions humanes, tenen avantatges perquè es duen a terme en la població que realment preocupa, però també comporten moltes desavantatges encara i quan els protocols siguin sofisticats. En els estudis epidemiològics, les relacions causa-efecte o dosi-efecte no poden ser identificades. El control experimental sobre l'exposició és requerit per identificar clarament relacions entre la dosi i l'efecte del Mn.

La neurotoxicitat del Mn s'associa amb la seva aparició en estructures dels ganglis basals, especialment al globus pàllid. El Mn també apareix a la glàndula pituïtària, tot i que les conseqüències funcionals no es coneixen (Newland, 1999), encara que alguns autors destaquen la falta d'acord existent sobre les àrees específiques del cervell en les que el Mn es concentra (Fechter, 1999).

En rosegadors, l'acumulació de Mn s'ha relacionat amb les alteracions en la funció i concentració dels neurotransmissors (Newland, 1999). Les dades

experimentals d'animals i humans indiquen que el Mn té efectes neurotòxics, alterant el sistema dopaminèrgic (St-Pierre i cols, 2001). Tanmateix, les investigacions dels efectes conductuals en aquestes espècies, les quals acostumen a relacionar l'activitat motora, han esdevingut en resultats menys consistents.

El NOAEL (No-Observed-Adverse-Effects-Level, o Nivell on no s'observen efectes adversos) no ha estat identificat amb el Mn amb estudis animals (Newland, 1999).

Els estudis en rosegadors i primats donen resultats diferents. Tot i que els rosegadors han mostrat alteracions neuroquímiques després d'exposició a Mn per ruta inhalada i no inhalada, mostren menys efectes conductuals als mateixos nivells d'exposició. S'ha suggerit que les diferències en la probabilitat d'exhibir alteracions conductuals entre primats i rosegadors podrien estar relacionades amb que els rosegadors no tenen pigmentada la substància negra, a diferència dels primats i també dels humans (Davis, 1998). La substància negra és una regió del cervell amb una captació de Mn relativament alta, degut segurament a la seva elevada concentració de melanina.

La pèrdua de neurones i gliosis al globus pà.lid són el segell del manganisme en humans i del manganisme experimental en primats (Verity, 1999). Els rosegadors, mostrarien alteracions neuroquímiques després d'exposició a Mn, tot i que està en qüestió la seva sensibilitat per la valoració conductual (Davis, 1999). El tema de si la rata és indicada com a model de toxicologia comportamental del Mn es manté obert. Altres espècies que també s'han considerat per l'estudi de la toxicologia del Mn són ratolins, micos i, de vegades, coloms.

Els efectes conductuals dels productes químics en ratolins han estat bastant descrits, tot i que no tant com en rates, ni existeixen masses dades dels efectes tòxics del Mn en ratolins. Però, donat el relatiu petit cost de treballar amb ratolins, segons McMillan (1999) haurien de ser considerats per estudis de toxicitat conductual del Mn. Els ratolins i les rates podrien ser ambdós models vàlids per testar neurotoxicitat, tot i que existeixen diferències entre ells. D'aquí la importància d'avaluar la toxicitat en ambdós espècies. Per exemple, alguns investigadors (Henry-

Sam i Iszard, 2001) han trobat que els ratolins són més sensibles que les rates als efectes del Mn sobre la reproducció.

### **2.7.2.1. En el desenvolupament.**

En els últims anys, s'han incrementat els estudis de la toxicitat prenatal del Mn en animals de laboratori, degut a la preocupació creixent envers la toxicitat d'aquest metall i la coneguda vulnerabilitat dels fetus, neonats i individus en desenvolupament a l'efecte dels tòxics, i sobretot, degut a la sensibilitat incrementada del SNC durant el seu desenvolupament. Només uns quants experiments han examinat els efectes de l'exposició prenatal i perinatal al Mn. Les dades són controvertides, i els estudis conductuals escassos i poc informatius (Pappas i cols, 1997; Pappas, 2000).

S'ha demostrat, en rosegadors, que el Mn pot travessar la barrera hematoencefàlica, acumular-se al fetus, i causar toxicitat materna i del desenvolupament (Sánchez i cols, 1993; Aschner i Gannon, 1994; Colomina i cols, 1996b). Segons alguns autors (Grant i Ege, 1995), el Mn és clarament teratogènic per la rata quan s'administra de manera repetida per via intravenosa durant l'organogènesi (del dia 6 al 15 de gestació), però no s'han trobat el mateixos efectes quan és administrat de manera oral a dosis molt altes, probablement degut a la limitada absorció gastrointestinal del Mn, i el seu altament eficient primer pas de recaptació pel fetge, reduint així la biodisponibilitat al fetus. Els efectes adversos descrits van ser anormalitats esquelètiques, concretament irregularitats a les costelles (Grant i Ege, 1995; Grant i Hustvedt, 1998).

Existeix una àmplia evidència que indica que els neonats són més susceptibles que els adults a molts neurotòxics. Les rates neonatals tindrien un risc incrementat per la toxicitat induïda pel Mn degut a la seva habilitat per acumular Mn al cervell (Aschner i cols, 2001). El resultat d'aquestes altes concentracions de Mn al cervell podrien tenir importants conseqüències funcionals. S'ha demostrat una activitat motora neonatal deprimida seguida d'una exposició prenatal a Mn per inhalació (Corbella i Domingo, 1996).

També s'ha demostrat en animals de laboratori, ratolins en aquest cas, que l'exposició a Mn (oral) pot causar una disminució en les taxes d'embaràs i altres paràmetres reproductius com la mitjana del pes dels fetus i el nombre de fetus per ventrada (Iszard i cols, 2001), així com un retard en el reflex d'adreçament o "righting reflex" de les cries de mares exposades (Ali i cols, 1983). L'administració de Mn postnatal a ratolins, alletats per mares exposades a partir del segon dia de vida, mostraven un increment de l'activitat motora mesurada als dies postnatsals 60 i 90 (Lown i cols, 1984). També s'ha vist en rates exposades prenatalment a Mn una disminució de les concentracions de Da i de l'activitat de la tirosin-hidroxilasa i un increment de l'activitat de la MAO (Mono-Amino-Oxidassa) a l'hipotàlem (Mailman i cols, 1996).

Altres investigadors han observat en rates exposades a Mn des de la concepció fins el dia 30 postnatal, els nivells de monoamines al cervell i l'activitat de la colin-acetiltransferassa afectats, tot i que no s'han pogut replicar aquests resultats (Pappas i cols, 1997; Pappas, 2000). En aquests estudis es van observar anormalitats físiques però, es va trobar una disminució del gruix del còrtex i una marcada hiperactivitat al dia 17 postnatal, explicats per la possible hipofunció dopaminèrgica.

Així, ha estat descrit (Davis i cols, 1998) que l'exposició prenatal a Mn en rosegadors podria deprimir l'activitat neuroconductual en animals neonats, amb una possible intensificació d'aquesta depressió si es continua amb una exposició postnatal de les cries. S'ha demostrat que hi ha alteracions en els nivells de Da en rates i ratolins exposats a Mn durant el desenvolupament postnatal primerenc per diferents vies d'exposició (Davis i cols, 1998; Dorman i cols, 2000). Es pot afirmar que la majoria dels experiments suggereixen que els neonats es trobarien amb un risc incrementat a la neurotoxicitat induïda pel Mn comparat amb subjectes adults, tot i que els mecanismes de neurotoxicitat i els efectes concrets no estan tan clars.

#### **2.7.2.2. En adults.**

El sistema respiratori no regula l'input de Mn, i d'aquesta manera el Mn pot acumular-se; al contrari que a la dieta, en que més alts nivells de Mn poden ser regulats de manera eficient (Newland, 1999). Quan el Mn s'administra a l'aigua de beguda les dosis acumulatives en les quals els efectes adversos poden aparèixer estan

entre 1000 i 5000 mg/kg, amb un estudi que arriba fins a 27.000 mg/kg (Newland, 1999).

S'ha vist en rates, que la ruta olfactiva seria una via significativa per la qual el Mn guanyaria accés al cervell. Alguns estudis conclouen que les neurones olfactives, mitjançant el transport axonal retrògrad, oferirien un camí amb considerable capacitat per transportar Mn al cervell (Henriksson i cols, 1999), i que el bulb olfactiv de la rata acumularia més que altres regions cerebrals d'inhalació (Vitarella i cols, 2000). La rellevància d'aquestes troballes respecte l'exposició inhalada humana i els riscos per la neurotoxicitat no és coneguda, i és complicada per les diferències interespecíes en l'anatomia i fisiologia nasal i cerebral. El bulb olfactiv i la mucosa nasal olfactiva serien estructures proporcionalment més petites en humans, suggerint que aquesta ruta d'accés al cervell seria menys important en humans comparat amb les rates (Aschner i cols, 2001).

Segons alguns experiments el plexe coroide sembla filtrar el Mn (administrat intraperitonealment), cap al líquid cefalorraquídi (LCR) i SNC, a dosis altes de Mn però no sembla fer el camí invers i sortir del SNC (Aposhian, 1999). Hi ha variables que augmenten l'absorció de Mn al cervell, com la deficiència de Ca, la deficiència de Fe, la malnutrició proteica, etc. (Seth i Chandra, 1988; Murphy i cols, 1991).

La neurotoxicitat del Mn és un esdeveniment retardat, requerint un temps llarg d'exposició, suggerint que un lent però persistent alliberament de Mn a llocs crítics pot, almenys en part, ser la raó fonamental de la toxicitat latent (Giantusos i cols, 1997).

#### Acumulació de Mn al SNC

- Quan s'injecta de manera intranasal clorur de Mn a rates s'ha demostrat que es produeix un increment del contingut de Mn al cervell, el qual és temps i dosi dependent. L'elevació del contingut de Mn a l'estriat, una de les suposades dianes de la toxicitat del Mn, es dona només quan les injeccions intranasals són repetides (Giantusos i cols, 1997). En rates, és on s'han fet més estudis d'exposició experimental a Mn. Segons els autors, s'han trobat increments significatius de Mn:

- 
- Als ganglis basals, còrtex, cerebel i fetge, comparat amb rates control (Calabresi i cols, 2001).
  - Increments a l'estriat, cerebel i cervell en rates exposades a altes dosis de Mn (Dorman i cols, 2000).
  - Concentracions de Mn més altes respecte del grup control al putamen, cerebel, còrtex frontal i globus pà.lid; on el globus pà.lid tenia l'increment més alt de Mn al cervell, seguit del putamen i del còrtex frontal (St-Pierre i cols, 2001).
  - Nivells de Mn incrementats en l'estriat, hipotàlem i hipocamp (Lai i cols, 1999).
  - De manera global, increment de Mn al cervell i cerebel (Centonze i cols, 2001).
- L'ús de tècniques d'IRM ha revelat, que de manera similar als humans, els micós macacs als quals se'ls hi ha administrat altes dosis de Mn, presenten elevades concentracions d'aquest element al cervell localitzades a l'estriat, globus pà.lid i substància negra (Aschner i cols, 2001).
  - En coloms exposats a Mn per inhalació, es va trobar que les concentracions del metall al cervell, a més de pulmó i os, eren significativament més altes respecte a les trobades en animals control (Sierra i cols, 1998).

### Alteracions funcionals

- En micós rhesus exposats a clorur de Mn per un període de 18 mesos es van observar moviments de tipus corèic, rigidesa, i tremolors fins a les mans; i també una degeneració neuronal estesa i una proliferació neurològica (Seth i Chandra, 1988).
- Estudis en conills exposats a Mn per via respiratòria mostraven degeneració neuronal al còrtex cerebral i cerebelar, nucli caudat, putamen i substància negra. Aquestes alteracions estaven associades amb la proliferació de la neuroglia en aquestes regions (Chandra, 1972).

---

Alteracions a nivell cel.lular

En rates, el tractament crònic amb Mn altera la distribució regional de Mn al cervell i aquesta alteració de la distribució de Mn també comporta uns canvis regiò-específics d'altres elements. També indueix canvis diferencials en les distribucions subcel.lulars de metalls i electrolits i introdueix increments en l'acumulació de Mn al nucli, mitocondris i sinaptosomes. Els mitocondris del cervell serien la diana subcel.lular de la toxicitat del Mn. Si els mitocondris del cervell constitueixen una important diana subcel.lular per la toxicitat del Mn, llavors l'increment de l'acumulació d'aquest element als mitocondris del cervell s'esperarà que indueixi disfunció mitocondrial (Lai i cols, 1999). L'efecte neurotòxic del Mn sembla ser que exerciria una inhibició de la funció mitocondrial i l'efecte neurotòxic del Mn a baixes concentracions podria estar mediatitzat per l'increment de la producció d'òxid nítric als astròcits (Spranger i cols, 1998).

Alteracions a nivell de neurotransmissors

El que sembla clar és que la neurotoxicitat del Mn és deguda a les alteracions en el sistema de neurotransmissió, suggerint alteracions en les funcions dopaminèrgica, serotoninèrgica, colinèrgica i gabaèrgica (Seth i Chandra, 1984). S'ha descrit un increment de l'activitat de la MAO en el cervell d'animals adults i en desenvolupament exposats a Mn (Seth i Chandra, 1988). També s'ha relacionat amb alteracions al sistema del glutamat, conclouent que existiria una transmissió glutamaèrgica alterada a l'estriat en rates intoxicades crònicament (Centonze i cols, 2001).

En rates, l'administració intracranial de Mn ( $MnCl_2$ ), s'ha vist que causa una reducció de la Da al nucli caudat i putamen. En ratolins, l'administració addicional de Mn ( $MnCl_2$ ) en la dieta, provoca una reducció de les concentracions de Da al cervell a la vegada que eleva les concentracions de GABA a l'estriat i substància negra (Giantusos i Murray, 1982). Així, en general, els experiments en rosegadors intoxicats amb Mn, mostren una disminució de Da al cervell i un augment de GABA a l'estriat (Seth i Chandra, 1988; Newland, 1999).

Segons Cuesta i cols (1995) la toxicitat crònica per Mn pot produir una hiperactivitat inicial del sistema dopaminèrgic central, seguida d'hipoactivitat. Similarment, una alteració bioquímica bifàsica podria també ser responsable del curs clínic de la intoxicació en humans. Més específicament, en un experiment portat a terme amb ratolins intoxicats per Mn es va trobar una disminució del control de l'alliberació de la Da exercida pels autorreceptors presinàptics en les primeres etapes de l'enverinament per Mn (Cuesta i cols, 1995).

La Da està relacionada amb el moviment motor. Existeixen varis experiments que han valorat l'activitat motora en animals intoxicats per Mn (Seth i Chandra, 1988; Ingersoll i cols, 1995; St-Pierre i cols, 2001).

La toxicitat del Mn ha estat associada amb una disfunció motora i es sabut que el cerebel controla la funció motora i la coordinació. El Mn podria exercir els seus efectes modificant la bioquímica del cerebel, però existeix poca informació descrivint els efectes del Mn en la neuroquímica del cerebel (Lipe i cols, 1999).

### Efectes conductuals

S'ha trobat que, després de l'administració intracranial de Mn Cl<sub>2</sub> en rates, l'activitat motora espontània disminuïa significativa i ràpidament (Aposhian i cols, 1999). Això, contrasta amb altres estudis en que es va administrar Mn per altres vies: oral, i.p., intracranial o inhalat, on l'activitat motora tardava setmanes o mesos en disminuir, si és que ho feia (Aposhian i cols, 1999).

També s'ha descrit en rates sedació, letargia, esquena corbada i piloerecció, a més d'una disminució de l'activitat motora espontània (Inoue i cols, 1975). Altres investigadors han descrit una disminució en l'activitat motora de rates (Ingersoll i cols, 1995) i en ratolins (Cano i cols, 1996) després de l'administració de Mn. En algun estudi no s'han trobat diferències en l'activitat motora de les rates exposades a Mn (Dorman i cols, 2000), mentre que en altres les rates exposades eren significativament més actives (Calabresi i cols, 2001).

De fet, sembla ser que en primera instància es produiria un increment de l'activitat motora, hiperactivitat que aniria seguida si el tractament continua, per hipoactivitat motora (Bonilla, 1984; Nachtman i cols, 1986). Tal com ja descriuen Eriksson i cols (1987) en micos intoxicats amb Mn els animals esdevenien



hiperactius després d'aproximadament 2 mesos de tractament; però després de 5 mesos els animals van esdevenir hipoactius amb marxa inestable i tremolor en acció. També s'ha descrit un dèficit en l'habitució dels rosegadors en la prova del "camp obert" o "open-field" quan es mesuraven els "aixecaments" o "rearings" en rates (Calabresi i cols, 2001) i ratolins (Morganti i cols, 1985). Els ratolins exposats mostraven un increment dels aixecaments al camp obert respecte al grup control. En la prova del camp obert també s'ha trobat un increment en la defecació de les rates tractades amb Mn respecte a les del grup control (Calabresi i cols, 2001).

Tot i amb totes aquestes troballes en quant a diferències de conducta en rates intoxicades amb Mn, no hi ha estudis en rates adultes o neonats que confirmin el desenvolupament d'un síndrome conductual comparable al que s'ha vist en humans i micos intoxicats per Mn (Aschner i cols, 2001).

#### *Efectes en la fertilitat*

No s'ha portat a terme massa recerca sobre la fertilitat dels animals exposats a Mn, tot i que sí s'ha descrit que ratolins mascles exposats a una dieta amb un elevat contingut de Mn mostren una disminució del tamany dels testicles, vesícules seminals i glàndules del prepuci; tot això fins i tot sense signes neurològics com tremolor i atàxia (Gray i Laskey, 1980). En rates, s'ha trobat una disminució de la fertilitat en les femelles i en els nivells de testosterona en sèrum dels mascles (Laskey i cols, 1982).

#### *Pes corporal*

El que sí s'ha descrit per varis autors (p.ex. Lipe i cols, 1999) i és força curiós, és una disminució dosi-dependent del pes corporal dels animals exposats a Mn. En aquest sentit s'hauria de valorar si existeix una disregulació del metabolisme, o bé si hi ha una disminució de la ingesta.

*Quelants*

Tot i que alguns autors (Sánchez i cols, 1995) han trobat que el quelant CDTA (àcid ciclohexàdiaminotetraacetic) mobilitzaria el Mn, no s'ha valorat els seus possibles efectes beneficiosos sobre la simptomatologia neurotòxica. Sembla ser que les anomalies neurològiques en humans no han millorat, almenys fins el moment, al tractament amb agents quelants (Adams i cols, 1997).

### 3. L'estrès.

#### 3.1. Generalitats.

El concepte d'estrès pateix d'una falta de definició clara i acceptada pels propis especialistes. Podem trobar fins a cinc tipus de definicions d'estrès, segons aquest es consideri com: una condició ambiental, una apreciació personal, respostes a certes condicions ambientals, relació de desequilibri o una conseqüència nociva concreta patològica (Fernandez i Edo, 1998).

Hans Selye (1907-1982) va introduir el concepte d'estrès i va contribuir a l'establiment de la moderna endocrinologia. Selye va observar que els pacients d'un hospital que patien diferents malalties, sovint exhibien signes i símptomes similars (Selye, 1955; Bertók, 1998). Abans, també havia observat que tots els animals d'un mateix experiment desenvolupaven úlceres d'estómac i d'altres símptomes inespecífics, inclosos els animals del grup control, i va arribar a la conclusió que això era degut a les manipulacions experimentals a les que estaven sotmesos sorgint així el concepte de "resposta d'estrès" (Sapolsky, 1995). Segons Selye (1955), el terme "estrès" defineix un estat o situació del cos produït per diversos agents nocius, i manifestat per un síndrome de canvis que donen a conèixer la presència de l'estrès al cos. A aquests canvis Selye els va denominar "Síndrome General d'Adaptació", i es produeixen en 3 fases:

1. Reacció d'alarma: va incloure en aquesta fase la hipertròfia de l'escorça suprarrenal, atrofia dels òrgans limfàtics i úlceres sagnants a l'estómac i duodè. Més a més, el sistema nerviós simpàtic (SNS) i la medulla suprarrenal augmenten la seva activitat.
2. Fase de resistència o adaptació: en aquesta fase, l'escorça i la medulla suprarrenal 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 fase.
3. Fase d'esgotament: aquesta última fase només apareix quan l'estrès és molt greu o es perllonga durant llargs períodes de temps. La secreció de corticoides i l'adaptació acaben per disminuir notablement.

(Selye, 1936; Valdés i De Flores, 1986).

Altres definicions més recents d'estrès són:

- 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 major o menor dificultat (Vogel, 1993).
- L'estrès és una amenaça percebuda cap a l'homeostasi 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, depenent de l'estat físic i de 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. L'estrès altera el sistema nerviós vegetatiu (SNV) provocant un desequilibri a favor del sistema nerviós simpàtic (SNS), i en aquestes situacions també s'observa una modificació en l'alliberació de glicocorticoides.

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

Existeix considerable evidència que mostra que la resposta de l'eix HPA (hipotàlem-hipòfisi-adrenal), es redueix progressivament després d'exposicions repetides al mateix estressor. L'habitució dependria de múltiples factors: la intensitat de l'estrès, l'interval de temps intersecció, o la variabilitat interindividual (Lachuer i cols, 1994).

L'estrès, biològic i evolutivament, és una resposta fisiològica que es produeix de forma puntual –estrès agut–, però en l'actualitat, la majoria de les situacions que ens provoquen estrès són d'origen social o psicològic (relacions

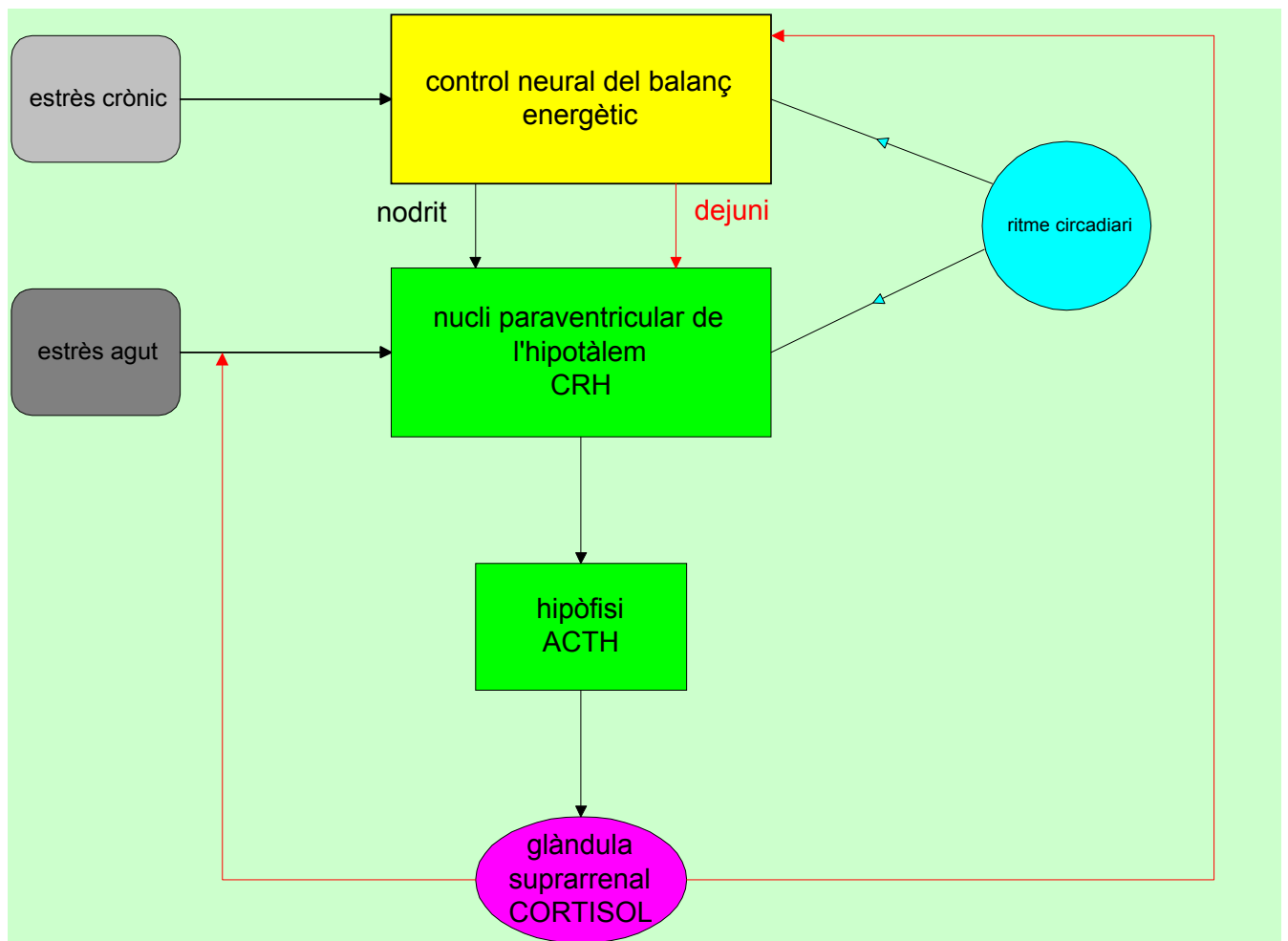
personals, promoció en el treball...). Així, activen d'una forma permanent –estrès crònic- aquest sistema i això augmenta la vulnerabilitat del subjecte a desenvolupar patologies.

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

Els glicocorticoides, juntament amb els mineralcorticoides són les principals hormones segregades per la glàndula suprarrenal (còrtex suprarrenal). La secreció de glicocorticoides es dona des de les zones fasciculades i reticulars del còrtex suprarrenal, i depèn de la secreció d'ACTH (hormona adrenocorticotropa) des de la hipòfisi, que al seu torn és regulada per l'alliberació de CRH (factor alliberador d'hormona adrenocorticotropa) des de l'hipotàlem (nucli paraventricular APV). La secreció d'aquests factors segueix un ritme circadiari ben desenvolupat després dels primers anys de vida (Nelson i cols, 1980), i el seu patró d'alliberament pot estar modulats per diverses variables com per exemple l'exposició prèvia a situacions estressants (Curtis i cols, 1995), estrès físic o psicològic, l'exercici (Del Corral i cols, 1994), o els nivells de glucosa (Dallman i cols, 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'autorregulació de l'alliberació anomenat retroalimentació negativa (*feedback* negatiu), que s'exerceix principalment a nivell hipotalàmic a través dels dos subtipus principals de receptors pels glicocorticoides: els receptors mineralcorticoides (MR o subtipus I) i els receptors glicocorticoides (GR o subtipus II), els receptors MR tenen una alta afinitat tant pels glicocorticoides com pels mineralcorticoides. Exerceixen efectes de tipus excitador, sent els responsables dels efectes tòncics d'aquestes substàncies, mentre que els receptors GR tenen una baixa afinitat tant pels mineralcorticoides com per als glicocorticoides, de tal manera que només són ocupats a altes concentracions de glicocorticoides, i els seus efectes són de tipus inhibitori (efectes fàssics). L'ocupació d'aquests a l'hipotàlem i a altres estructures centrals provoca la inhibició de l'alliberació de CRH per part de l'hipotàlem, i per tant, la disminució en ACTH i en

glicocorticoides (McEwen, 1994b) (*figura I. 9*). 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 ó GR semblen tenir 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).



**Figura I. 9.** Esquema de l'alliberació del cortisol

El cortisol és el principal glicocorticoide que secreten els humans i altres primats, mentre que en rosegadors aquest pràcticament no existeix, trobant-se en el seu lloc 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 seus efectes generals són:

- Augment dels nivells de glucosa a la sang mitjançant:
  - la conversió de proteïnes en carbohidrats
  - el trencament del glucògen
  - reducció de la glucogenogènesi
  - augment de la lipólisi
- Immunossupressors
- Antiinflamatoris

Els efectes sobre el 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 nivell cel.lular, podem observar canvis ràpids (supressió o excitació) o lents (a llarg termini), modificant 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 sí. 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 seves respostes presenten igualment notables diferències (Buendia, 1993). Les respostes al

repte són individualitzades, i existiran per tant diferències individuals tant en les respostes endocrines com autonòmiques (McEwen, 1994a).

Alguns investigadors han posat èmfasi al rol de la genètica, i altres a les diferents experiències perinatals en 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 duració del patró d'estimulació, factors constitucionals, experiències prèvies, l'edat i sexe de l'individu, experiències perinatals i posició o no de dominància dins d'un grup social (Lightman, 1994). Així, existeixen també autors que han estudiat els trets de personalitat com a moduladors de la resposta cardiovascular a l'estrès (Al'Absi i cols, 2000).

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

### **3.2.2. 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 cols, 1988; Kimmel i cols, 1993; Murata i cols, 1993; Rasco i Hood, 1994, 1995; Domingo i cols, 1995; Miller i Chernoff, 1995; Grandin, 1997). També és pot estudiar l'estrès provocant de forma química l'augment de glucocorticoides, com per exemple mitjançant l'administració de corticosterona (Magariños i McEwen, 1995). Això permet estudiar de forma aïllada un dels sistemes involucrats en la resposta a l'estrès.

#### **3.2.2.1. Administració d'hidrocortisona.**

Els efectes de l'estrès estan principalment relacionats amb els glucocorticoides. L'hidrocortisona administrada en animals d'experimentació es pot



fer servir com a substitut de condicions estressants, reduint així els efectes indesitjables d'altres condicions d'estrès físic. Per altra part, estan descrites i es coneixen les dosis d'hidrocortisona que substitueixen a situacions d'estrès lleuger-moderat (Magariños i McEwen, 1995).

### **3.2.2.2. Estrès per immobilització (“restraint”).**

Un dels models més coneguts i utilitzats com inductor d'estrès en animals és la immobilització. Aquest model s'utilitza a l'actualitat però té una llarga història. Així, Selye al 1936 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 utilitzat per ser 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 cols, 1997, 2000; Alonso i cols, 2000).

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

### **3.2.2.3. 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 cols, 1992; Soldani i cols, 1997; Salvetti i cols, 2000). El soroll es considera generalment com un factor estressant ambiental que les persones troben en el dia a dia (Gesí i cols, 1999) i, és un model d'estrès que és fàcilment aplicable a l'experimentació en animals. A la vegada, és força interessant el seu estudi degut a l'increment en les societats industrialitzades d'aquest factor, on les persones es 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 cols, 1987; Stam i cols, 1999). També

s'ha utilitzat per avaluar els efectes de l'estrès sobre el desenvolupament (Kimmel i cols, 1976; Nawrot i cols, 1980), i la seva interacció amb altres tòxics durant el desenvolupament (p.ex. Murata i cols, 1993).

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

### **3.3. Efectes de l'estrès en el desenvolupament.**

El desenvolupament del 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 morbiditat 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 severa podria estar associada amb un augment en el nombre de parts prematurs, parts amb un menor pes del bebè, i probablement parts amb altres alteracions de diversa índole. L'ansietat severa està també associada amb altres factors afegits a l'estrès, els quals influeixen sobre la gestació, com són l'hàbit de fumar, una pobra nutrició, o un baix nivell socioeconòmic entre d'altres (Scialli, 1988; Wadhwa i cols, 1993). En contrast amb els resultats d'estudis epidemiològics, les investigacions amb animals de laboratori aporten dades més concretes encara que més controvertides (Morishina i cols, 1978; Scialli, 1988).

Durant els últims anys varis estudis han demostrat alteracions primerenques en el desenvolupament motor i anormalitats en el comportament de la descendència de mares estressades, amb increment d'emocionalitat en les cries durant la seva maduresa, respostes alterades davant una situació novedosa i desordres en el curs normal de la diferenciació sexual, perdurables fins la maduresa (Barlow i cols, 1978; Fride i cols, 1986; Chantal i cols, 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 orquestren les nostres reaccions a l’estrès i al repte (Meaney i cols, 1994; Gunnar i Barr, 1998).

El cortisol, a l’igual que altres hormones, és necessari per un desenvolupament normal de l’organisme. Els nivells de cortisol regulen la mort neuronal (apoptosi) i modulen la diferenciació i creixement neuronal (Koob i cols, 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 cols, 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 atencional, 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 cols, 1998). En aquest sentit, es va comprovar que l’estrès prenatal en rates produeix una descendència que és hipersensible a estímuls que provoquen ansietat, suggerint una menor capacitat d’habitució, mostrant-se més vulnerables a estímuls estressants (Peters, 1982; Fride i cols, 1986).

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

Una altra diferència que es va observar en rates prenatalment estressades, és referent al funcionament cognitiu (McGivern i cols, 1986). Es conegut que l’hipocamp és crític per l’aprenentatge espacial, i que l’estrès produeix un empitjorament de les tasques espacials relacionades amb l’hipocamp (Lemaire i cols, 2000). Es va veure que l’estrès prenatal disminuïa el pes de l’hipocamp en ambdós sexes (Morris, 1984; Szuran i cols, 1994).

Chantal i cols (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 novedosa. 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 3er dia de vida.

Altres estudis parlen de que en ambdós 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. A les femelles, es va produir una 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 cols, 1985).

Una qüestió que està encara per resoldre és si els efectes de l'estrès prenatal són mediat per la reducció de la ingesta i per la reducció del guany de pes dels animals gestants sotmesos a estrès. Tampoc està clar si aquesta reducció de la ingesta i de l'increment de pes deguts a l'estrès, estimulen o actuen juntament amb els canvis hormonals que es donen en el fetus i en les femelles gestants durant situacions d'estrès (Kinsley i Svare, 1986).

S'han observat reduccions agudes en els nivells materns de progesterona i de gonadotropina en rates i ratolins gestants amb malnutrició (Rattner i cols, 1979). També hi ha alteracions en el comportament relacionades amb la copulació i en la descendència de 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 a ratolins a estrès per immobilització sota diverses condicions van observar que la baixa nutrició resultant de l'estrès per immobilització és suficient per produir els dèficits observats en la descendència en quant al pes al naixement i pes del cervell als 32 dies de vida, confirmant així els resultats obtinguts per Kinsley i Svare (1986) en rates.

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

Els organismes i les psiues difereixen tremendament en la seva vulnerabilitat a l'estrès en resposta a estressors físics i sobretot psicològics. En aquesta variabilitat interindividual hi té 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).

### **3.4. 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 a l'individu a afrontar la situació. Però quan la intensitat i/o duració de l'estímul estressant supera determinats nivells, la resposta a l'estrès desencadenada pot suposar una amenaça per la salut i el benestar de l'individu, podent-se produir alteracions fisiològiques, metabòliques i psicològiques.

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

- Alteracions en el sistema cardiovascular.

Quan els nivells plasmàtics de glucocorticoides es troben elevats durant un llarg període de temps, s'impedeix l'acció de la insulina sobre la captura de la glucosa per part de les cèl.lules, de manera que es produeix un increment en els nivells plasmàtics de glucosa. L'elevació 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, podent-se arribar a produir una isquèmia coronària.

- Alteracions en el sistema digestiu i problemes associats.

L'augment en els nivells de glucocorticoides que es produeix en situacions d'estrès sembla ser 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 de què en períodes d'estrès es reactivin o compliquin possibles úlceres pèptiques ja existents.

- 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 on és molt important no produeix greus conseqüències manifestes, la reducció dels estrògens en femelles, a més de reduir la libido, comporta importants alteracions del cicle menstrual (dismenorrees), causant generalment retards i disminució, arribant fins i tot 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 de 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 l'erecció es necessita un to parasimpàtic (Sandi i cols, 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 aplaçada durant l'estressor (Sapolsky i cols, 2000).

L'exposició a estressors o a elevats nivells de corticosteroides, 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).

### 3.4.1. Estrès i funció cognitiva.

Els efectes de l'estrès en la funció cognitiva han despertat gran interès i s'han efectuat diferents estudis, no sense resultats controvertits. Existeixen múltiples evidències a partir d'estudis en animals i humans, que indica que l'estrès i els glucocorticoides influencien la funció cognitiva (De Quervain i cols, 1998). Les accions col·lectives dels glucocorticoides al cervell són paradoxals. Nivells basals de glucocorticoides són essencials per al desenvolupament, plasticitat i supervivència neuronal, mentre que glucocorticoides als nivells d'estrès semblen produir pèrdua neuronal (Reagan i McEwen, 1997).

L'estrès inicia una cascada d'esdeveniments fisiològics, incloent alts nivells de catecolamines circulants i glucocorticoides. Les catecolamines són alliberades ràpidament, i típicament retornen a nivells basals en uns 10 minuts, però la resposta dels glucocorticoides és molt més lenta (De Quervain i cols, 1998).

Mentre que l'activació induïda per l'estrès del SNS i l'alliberament de les catecolamines són capaços de preparar ràpidament a l'organisme per l'acció i mobilitzen recursos energètics, el paper precís de la corticotropina (ACTH) i els glucocorticoides en les situacions estressants és més difícil d'entendre. De fet, la concentració màxima de glucocorticoides arriba aproximadament uns 20-30 minuts després del començament de l'estrès, al temps que la majoria de les situacions estressants naturals ja s'han acabat (García i cols, 2000).

L'estrès afectaria la cognició de moltes maneres, actuant ràpidament via les catecolamines i més lentament via els glucocorticoides (McEwen i Sapolsky, 1995). Els glucocorticoides semblen tenir beneficis a curt termini al cervell, però també incrementen la vulnerabilitat neural amb una exposició perllongada. El balanç entre els efectes normals i els patològics dels glucocorticoides dependria de la concentració. Les concentracions baixes de glucocorticoides activarien els receptors mineralocorticoides (o tipus I) i les altes concentracions activarien els receptors glucocorticoides (o tipus II). L'activació d'aquests dos receptors tindrien diferents efectes fisiològics (Porter i Landfield, 1998).

Així, l'estrès sever i perllongat, físic i psicològic causaria dany al cervell. En primats no humans s'ha observat degeneració i reducció de les neurones de l'hipocamp. Les neurones piramidals de l'hipocamp contenen una alta concentració de receptors (I i II) de glucocorticoides i semblen ser altament vulnerables a l'hipercortisolèmia causada per l'estrès sever, així com a l'exposició a glucocorticoides exògens. L'hipocamp mediatitza un feed-back negatiu de l'alliberació de cortisol i, per tant, una falta o deficiència de les neurones de l'hipocamp atenuaria aquest feedback resultant en hipercortisolèmia (Uno i cols, 1994).

El dany inicial és exacerbat perquè l'hipocamp inhibeix l'alliberació hipotalàmic-hipofisiària de la CRH i l'ACTH, la qual controla l'alliberament dels glucocorticoides. D'aquesta manera, la desinhibició que segueix al dany hipocampal pot desencadenar un continu increment dels nivells de glucocorticoides i un debilitament més ràpid de l'hipocamp (Porter i Landfield, 1998).

També existiria però un control amigdalari de l'activació metabòlica induïda per l'estrès dels sistemes monoaminèrgics, així com una integració amigdalari dels components conductuals i endocrins (Goldstein i cols, 1996).

Tot i que molts dels mecanismes moleculars pels quals els glucocorticoides regulen la neurogènesi, plasticitat i mort neuronal encara estan per determinar, hi ha un mecanisme ben definit a través del qual els glucocorticoides participen en la pèrdua neuronal manifestada en isquèmia, excitotoxicitat i possiblement envelliment, té lloc via la disminució de la utilització de la glucosa en el cervell en general, i de l'hipocamp en particular. Conseqüència d'aquesta disminució en les concentracions de glucosa neuronal és la inactivació dels transportadors dependents d'energia dels aminoàcids excitatòris. Aquesta inactivació lidera un increment dels nivells de glutamat a la sinapsi i una activació excessiva dels receptors d'aminoàcids excitatoris postsinàptics. Una de les conseqüències d'aquesta excessiva estimulació glutamèrgica seria un increment en els nivells de calci ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracel·lular a través dels receptors NMDA, i possiblement també a través dels canals de  $\text{Ca}^{++}$  voltatge-dependents. Els increments intracel·lulars de  $\text{Ca}^{++}$  activen diversos enzims cel·lulars (Reagan i McEwen, 1997). L'excés intracel·lular de  $\text{Ca}^{++}$  mediatitza els processos d'excitotoxicitat mitjançada pel  $\text{Ca}^{++}$ .



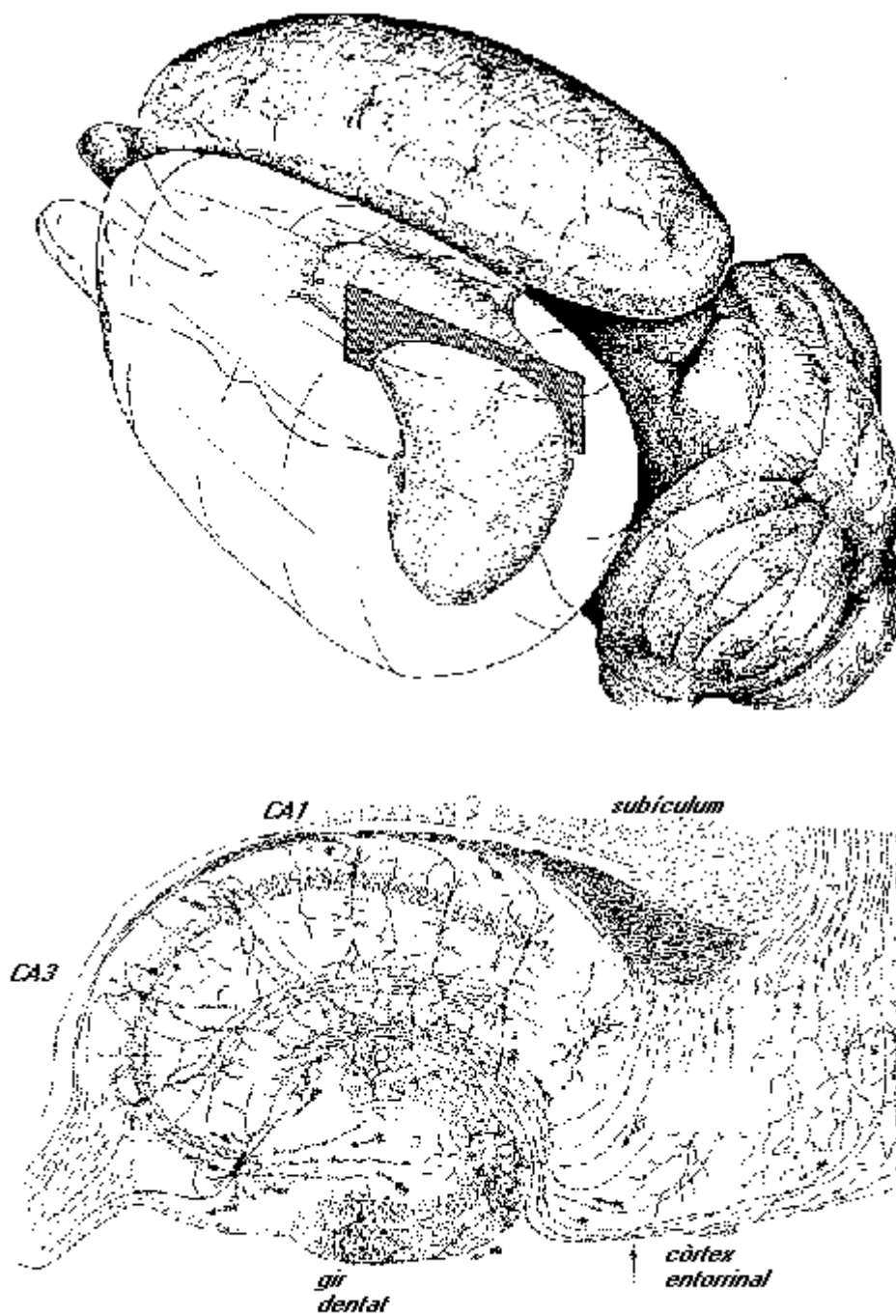
Altres autors (McIntosh i cols, 1998) destaquen el fet que els glucocorticoides incrementarien la vulnerabilitat de les neurones hipocampals alterant potencialment la capacitat de defensa neuronal davant el dany oxidatiu.

L'estrès repetit causa atròfia de les dendrites a la regió CA3 de l'hipocamp. Ambdós, l'estrès agut i el crònic, suprimirien la neurogènesi de les neurones granulars del gir dentat de l'hipocamp (Magariños i cols, 1998; McEwen, 1999) (*figura I.10*).

L'hipocamp, un òrgan diana per les hormones de l'estrès, és una regió del cervell especialment vulnerable. Juntament però amb els glucocorticoides també s'ha de tenir en compte en el procés d'atròfia hipocampal, el paper dels aminoàcids excitatòris, dels receptors NMDA i l'alteració del sistema gabaèrgic (McEwen, 1997). La 5HT també ha estat destacada per alguns autors pel paper que jugaria en l'etiologia del dany hipocampal (Bremner, 1999). L'exposició crònica a nivells estressants de glucocorticoides altera molts aspectes de la funció hipocampal i lideraria a la neurodegeneració (Orchinik i cols, 1995).

Les neurones piramidals de la CA3 són particularment sensibles als nivells de glucocorticoides davant l'estrès; però l'atrofia que exhibeixen les neurones de la CA3, segons alguns autors, seria reversible, il·lustrant així la plasticitat de l'hipocamp (Reagan i McEwen, 1997). Tanmateix, altres investigadors afirmen que encara no es coneix si existeix aquesta reversibilitat en humans (Bremner, 1999).

És conegut que l'hipocamp juga un paper molt important en els nous aprenentatges i la memòria, a la vegada que és un important centre per la integració de les respostes a l'estrès, cognitives, neurohormonals i neuroquímiques (Bremner, 1999). Les hormones alliberades durant l'estrès, o el contingut emocional explícit durant l'aprenentatge, es podrien considerar com crítics en la modulació de la memòria (McEwen i Sapolsky, 1995). Les àrees cerebrals implicades, que per molts autors estan acceptades com les principals, serien l'hipocamp i l'amígdala (Cahill i McGaugh, 1996).



**Figura I.10.** Hipocamp de rata.

Els corticosteroides creuen fàcilment la barrera hematoencefàlica degut a la seva naturalesa lipofílica, accedint al cervell, on exerceixen les seves accions en aquelles cèl.lules que presenten receptors per aquestes hormones. El fet de que els corticosteroides siguin capaços d'arribar al cervell i unir-se a receptors específics, fa que aquestes hormones tinguin propietats funcionals que les identifiquin com candidates idònies per la modulació cognitiva en situacions d'estrès (Cordero i Sandi, 1998).

Papez (1937) va proposar el sistema límbic com el substrat subcortical de les emocions. Donat que l'hipocamp és una estructura que connecta de manera recíproca àrees d'aquest sistema i estructures superiors, va hipotetitzar que la cognició i l'emoció s'afectarien mútuament.

Per altra banda, els corticoides modularien processos neurals implicats en la funció cognitiva seguint un efecte en forma d'U-invertida. L'eliminació dels glucocorticoides endògens, així com concentracions elevades dels mateixos, resultarien en la supressió de la potenciació hipocampal, mentre que concentracions que correspondrien a nivells basals o d'una activació moderada facilitarien la plasticitat sinàptica (Lupien i McEwen, 1997).

Diversos investigadors han estudiat els efectes de l'estrès sobre la funció cognitiva d'humans, on s'ha trobat que condicions estressants disminuirien significativament l'execució en la memòria declarativa (Lupien i cols, 1997). Tanmateix l'administració de cortisona empitjoraria el record, però no l'adquisició o la consolidació (De Quervain i cols, 2000).

En rosegadors, hi ha autors (Shors, 2001) que parlen de que l'exposició a un estressor agut augmentaria la formació de noves associacions (en rates mascles). Altres investigadors també han trobat una significativa millora de l'execució en rates en una tasca de memòria espacial, quan aquestes eren sotmeses a estrès durant 13 dies, tot i que no trobaven cap diferència als 7 dies d'exposició (Luine i cols, 1996). Per altra banda, quan els animals eren estressats durant 21 dies apareixia un empitjorament de la tasca de memòria espacial (Luine i cols, 1994). Així, la duració de l'estrès afectaria diferencialment l'aprenentatge i la memòria, amb curts períodes

d'estrès servint com a funció adaptativa, mentre que duracions més llargues causarien canvis desadaptatius.

A nivell neural, l'examen de les neurones piramidals de l'àrea CA3 de l'hipocamp als 10-13 dies d'estrès, amb tècniques de Golgi, no mostrava efectes de l'estrès en l'arborització dendrítica basal ni distal (Luine i cols, 1996). Però l'estrès repetit, causaria atrofia de les dendrites distals de les neurones piramidals de la CA3, resultant en una disminució dels punts d'arborització dendrítica distal, i de la llargària total de les dendrites de les cèl·lules piramidals de la regió CA3 de l'hipocamp (Luine i cols, 1994; Magariños i cols, 1997). Els efectes sobre l'adquisició serien temporals, i els canvis en les dendrites depenents de l'estrès serien reversibles (Luine i cols, 1994). Els mateixos investigadors han postulat que l'activitat de la 5HT contribuiria a l'atrofia de les dendrites, o que alternativament interactuaria amb els aminoàcids excitatoris per produir atrofia neuronal hipocampal (Luine i cols, 1994).

Altres autors suggereixen que el volum de Da en el còrtex prefrontal incrementat per un estrès lleu en rosegadors, produiria els dèficits en tasques de memòria espacial, tot i que també accepten que l'estrès afectaria altres sistemes de neurotransmissors a part de la Da (Murphy i cols, 1996).

Altrament, és de destacar que quan s'han utilitzat animals dels dos sexes, s'han trobat resultats contradictoris; de manera que el mateix estressor podia facilitar l'adquisició en un sexe i empitjorar-la en un altre. Aquesta podria ser la causa de que els resultats referits a la literatura moltes vegades són contradictoris (Szuran i cols, 1994; Wood i Shors, 1998).

### **3.4.2. Estrès i psicopatologia.**

L'estrès pot influir sobre la salut perquè modifica el funcionament fisiològic general de l'organisme (p.ex. freqüència cardíaca, pressió sanguínia, respiració, tensió muscular), l'activitat neuroendocrina i la competència immunològica (Sandin, 1993). Sembla clar que existeix una relació entre l'estrès, especialment en les situacions de la vida "indesitjables", i la reducció del benestar psicològic; tot i que el

paper d'aquestes situacions en l'etiologia dels trastorns mentals es manté controvertit (Moore i Burrows, 1996).

Alguns autors parlen de que la disfunció de l'eix HPA seria la clau de les condicions psicopatològiques, les quals inclouen les respostes anormals a estressors, com l'anorèxia nerviosa, ansietat i trastorns afectius (Koob i cols, 1994; Stout i Nemeroff, 1994).

Altres investigadors suggereixen que l'exposició repetida i perllongada a la resposta fisiològica de l'estrès estaria en la base de nombrosos trastorns. És freqüent que l'exposició a un procés traumàtic comporti el desenvolupament d'algunes de les següents alteracions psicològiques que es relacionen amb l'estrès:

- Trastorn per estrès posttraumàtic
- Estrès agut
- Ansietat
- Trastorns de pànic
- Depressió
- Dissociació
- Baixa autoestima i sentiment de culpabilitat
- Alteracions psicossomàtiques
- Dificultats sexuals
- Problemes en el desenvolupament de les relacions interpersonals
- Anorèxia nerviosa
- Esquizofrènia
- Addicció a l'alcohol, drogues o altres fàrmacs
- Intents de suïcidi

(Moore i Burrows, 1996; Sandi i cols, 2001).

Potser el desordre més clarament relacionat amb l'estrès o situacions estressants és el trastorn per estrès posttraumàtic. La síndrome d'estrès posttraumàtic és un trastorn neuropsiquiàtric en el que la vivència d'un esdeveniment "traumàtic" causa en l'individu un impacte tant important que, en endavant, el seu funcionament cognitiu es veurà afectat de forma decisiva. A nivell endocrí, els pacients que han

desenvolupat aquesta síndrome acostumen a presentar una alteració peculiar en l'eix HPA. Generalment, aquestes persones mostren en situacions basals, nivells de cortisol plasmàtics inferiors als nivells de subjectes control. Tanmateix, davant estímuls que els hi recorden la vivència traumàtica, la resposta de secreció hormonal de l'eix és més alta que la dels subjectes control. Aquesta hiperactivació també la trobem en el SNS amb la secreció d'adrenalina (E) i noradrenalina (NE). Els sistemes fisiològics de l'estrès dels individus amb estrès posttraumàtic són particularment reactius quan s'enfronten davant qualsevol element que els hi recorda el trauma (Sandi i cols, 2001).

Tant l'estrès agut com el crònic tindrien un impacte perjudicial en la funció normal del sistema dopaminèrgic. En aquest sentit, l'estrès influiria directament varies conductes bàsiques, les quals estan mediatitzades pel sistema dopaminèrgic; com l'activitat motora, l'activitat sexual, la gana i la sensibilització creuada a drogues d'abús (Pani i cols, 2000).

### **3.5. Estrès i tòxics.**

La interacció tòxica es referiria 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, donant 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 4 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 a la vegada 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 a nivell de la toxicocinètica suposa una modulació a nivell de l'absorció, distribució, metabolisme i/o excreció d'un agent per l'efecte d'un altre. Una alteració a nivell 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 a l'absorció, distribució, metabolisme 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 cols, 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 suficientment altes com per produir ja toxicitat materna (Chernoff i cols, 1988).

#### 4. Influència de l'estrès en la neurotoxicitat del Mn.

Al 1981 alguns investigadors ja van implicar en la toxicitat del Mn els trastorns de les hormones de l'eix HPA (Deskin i cols, 1981). Es sap que la toxicitat del Mn afecta principalment als ganglis basals, i la relació dels nuclis caudat i putamen en l'aprenentatge i la memòria està subjecta a controvèrsia (Setlow i McGaugh, 1999). Així, la funció cognitiva podria estar afectada directament pel Mn per aquesta via, i en aquest cas, l'efecte de l'estrès en aquesta afectació seria de suma importància.

Com a element essencial, les concentracions de Mn al cervell i les seves possibles variacions sota condicions d'estrès han estat estudiades, trobant-se resultats controvertits. Alguns autors han trobat una disminució significativa de les concentracions de Mn dependents de la duració de l'estrès per immobilització a les que eren sotmeses rates d'experimentació (Saito i cols, 1995). Les regions on es va observar aquesta disminució eren: cerebel, cervell mig i tàlem, hipocamp i còrtex cerebral. Aquests autors varen concloure que els canvis en les concentracions de Mn i altres elements essencials en les regions del cervell podrien estar estretament relacionades amb els processos d'activació neural induïts per estímuls psicològics moderats, i que aquest metabolisme dels metalls estaria regulat diferencialment d'acord amb el paper funcional de cadascun al SNC (Saito i cols, 1995).

Altres autors però, han trobat que els nivells de Mn al fetge, ronyons i cervell estaven significativament augmentats per l'estrès (immobilització o fred) al qual eren sotmesos ratolins d'experimentació (Izgut-Uysal i cols, 2000). En aquest treball, els autors conclouen que l'estrès afectaria el procés metabòlic de la distribució del Mn en els teixits.

Existeixen pocs estudis que hagin avaluat directament l'efecte de l'estrès sobre la neurotoxicitat del Mn. Chandra i cols (1979) van tractar rates amb Mn Cl<sub>2</sub> i les van sotmetre a estrès per immobilització. L'increment de les concentracions de Mn va ser quasi idèntic després del tractament amb Mn sol, o en combinació amb estrès. Així, els autors conclouen que l'estrès no influïa el balanç del Mn al SNC, tot i que si van trobar alteracions en els continguts de tirosina, triptòfan, Da i NE en el teixit cerebral



de les rates després de l'exposició a Mn i immobilització. Això suggereix que els efectes neurotòxics del metall podrien ser més pronunciats en situacions estressants.

Altres investigadors, en un estudi en rates sobre els efectes de l'exposició a Mn i la possible modulació per l'estrès, suggereixen que el Mn afectaria predominantment l'eix HPA, i que la interacció del neurotòxic, Mn i l'estrès podrien servir per tant, per desemmascarar efectes tòxics que d'altra manera serien imperceptibles (Hong i cols, 1984).

Donat que avui en dia, tant els adults d'ambdós sexes com les dones embarassades podrien estar exposats a alts nivells de Mn tant de manera ocupacional com ambiental, i a la vegada estar exposats a varis tipus d'estrès, tant a la feina com a casa, fa que aquesta combinació i els seus possibles efectes en el SNC tinguin interès creixent.

*“La veritat en ciència pot ser  
definida com la hipòtesi de  
treball que millor s’ajusta per  
obrir camí a la següent millor  
ajustada”*

*Konrad Lorenz*

*“Sense dubte no hi ha progrés”*

*Charles Darwin*

## **II. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

La neurotoxicitat del Mn ha estat demostrada quan aquest és inhalat o bé administrat per via parenteral. En canvi, els possibles efectes derivats del consum elevat de Mn per via oral han estat poc estudiats i no existeixen dades concloents al respecte. Així mateix, els efectes del Mn sobre el desenvolupament han rebut poca atenció.

La simptomatologia observada en humans després de la intoxicació per Mn és semblant a la observada en la malaltia de Parkinson, la qual cosa ha fet que el sistema dopaminèrgic hagi estat àmpliament estudiat en relació als efectes del Mn. Tot i que en l'actualitat els possibles mecanismes de l'acció neurotòxica del Mn no es centren només en aquest sistema, sinó que inclouen també el sistema glutamaèrgic com a possible mediador dels efectes sobre el sistema dopaminèrgic.

Per altra banda, els estressors tant físics com psicològics, provoquen canvis a nivell de SNC, i concretament a nivell del sistema dopaminèrgic. En general, s'accepta que l'estrès experimentat de forma aguda provoca un augment de la secreció de dopamina, mentre que en una situació d'estrès crònic es pot observar una disminució funcional del sistema dopaminèrgic.

### **1. Hipòtesi.**

Donat que el Mn i l'estrès afecten de forma directa o indirecta el funcionament del sistema dopaminèrgic, l'exposició concurrent a Mn i estrès es pot manifestar com una interacció, augmentant o modificant els seus efectes sobre el SNC.

### **2. Objectiu general.**

L'objectiu general d'aquest treball ha estat dirigit a avaluar els efectes neuroconductuals de l'exposició a Mn sobre la toxicitat materna, fetal, postnatal i en el subjecte adult, així com la influència que l'estrès pot exercir en aquesta exposició.

### **3. Objectius específics.**

1. Avaluar els efectes sobre el desenvolupament embriofetal de l'exposició a Mn durant la gestació.
  - 1.1. Toxicitat materna.
  - 1.2. Toxicitat embriofetal.
  
2. Avaluar els efectes postnatsals de l'exposició prenatal a Mn.
  - 2.1. Toxicitat materna.
  - 2.2. Toxicitat embriofetal.
  - 2.3. Efectes postnatsals.
  
3. Valorar les possibles interaccions entre l'estrès/hidrocortisona i el Mn administrat durant la gestació.
  - 3.1. Toxicitat materna.
  - 3.2. Toxicitat embriofetal.
  - 3.3. Efectes postnatsals.
  
4. Valorar els efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a Mn en subjectes adults.
  - 4.1. Avaluar els efectes deguts al Mn.
  - 4.2. Avaluar els efectes deguts a l'estrès.
  - 4.3. Avaluar els efectes deguts a la interacció del Mn i l'estrès.
  
5. Examinar els efectes neuroconductuals en subjectes adults sotmesos a diferents tipus d'estrès crònic.

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

*Theophrastus Bompert*

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

*Thomas Carlyle*

### III. MATERIALS I MÈTODES

#### 1. Materials.

##### 1.1. Animals d'experimentació.

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

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

##### 1.2. Reactius i agents químics.

Es van utilitzar els següents reactius:

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

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

### 1.3. Material específic.

#### a) Gàbies d'immobilització

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

#### b) Emissor d'ultrasons

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

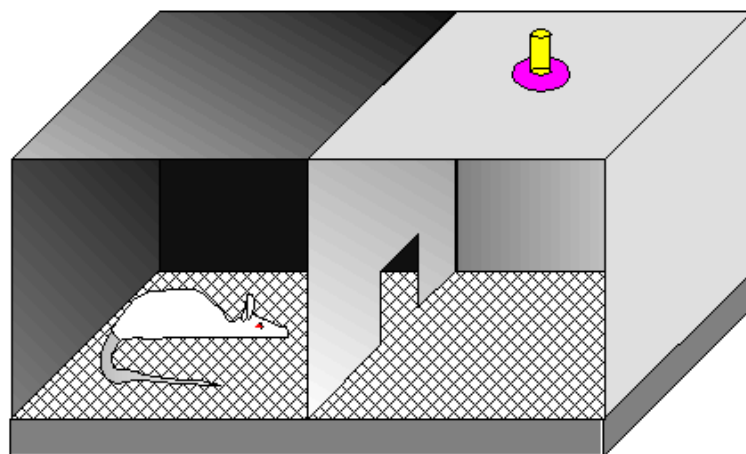
#### c) Aparells per la realització dels diferents tests als animals

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

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

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

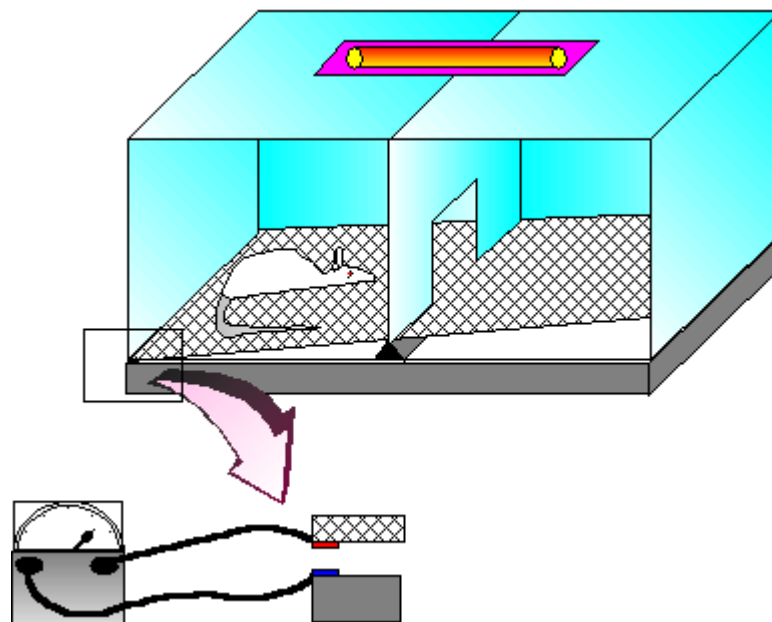
Les dimensions de l'aparell per ratolins són de 39 x 9.5 x 17 cm (ref. 7553) i les dimensions de l'aparell per rates són de 40 x 20 x 20 cm (ref. 7550). Aquest està connectat a un controlador que registra la latència d'entrada de l'animal al compartiment fosc, en el qual es pot fixar el temps que passa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



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



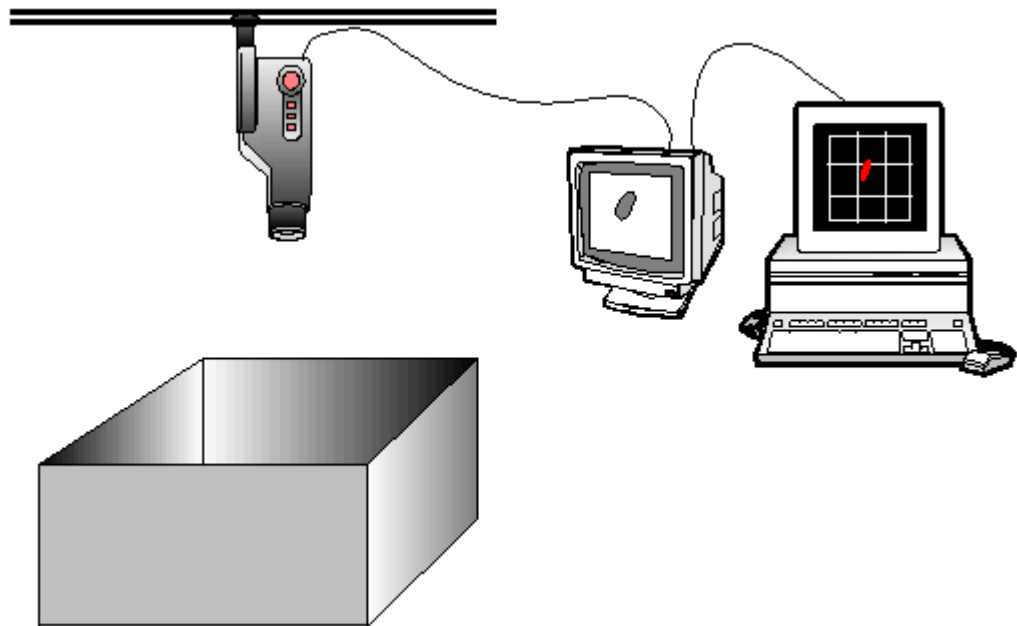
- *Evitació activa “Active avoidance”*, l’aparell d’evitació activa consisteix en una caixa feta de *perspex*, dividida en dos seccions amb una porta/forat que les comunica a nivell de la base. La base és una reixeta, a través de la qual s’administra el shock elèctric. Dins la gàbia l’intensitat lluminosa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



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

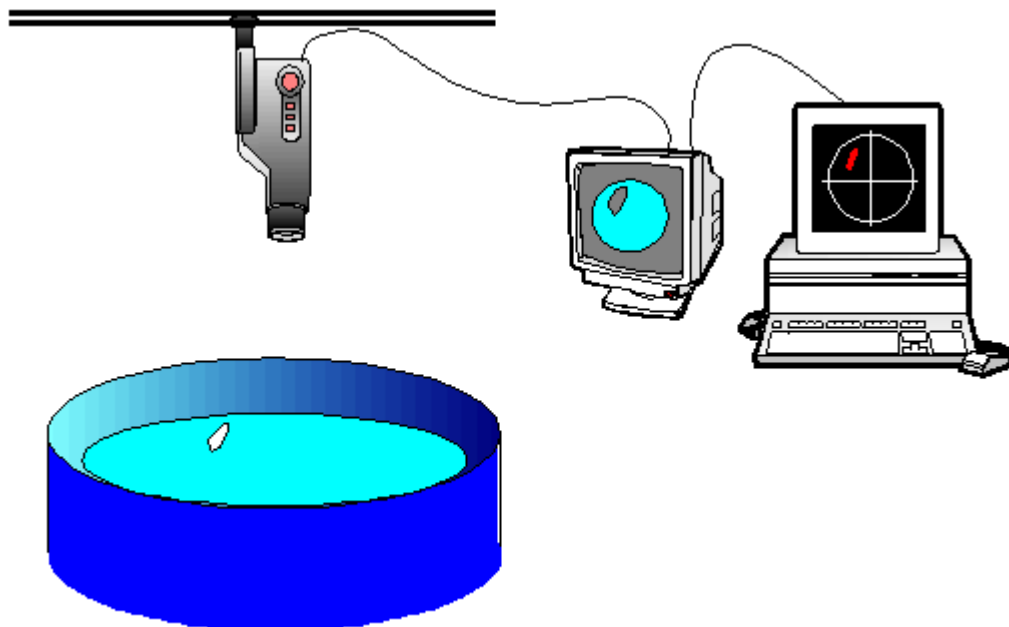
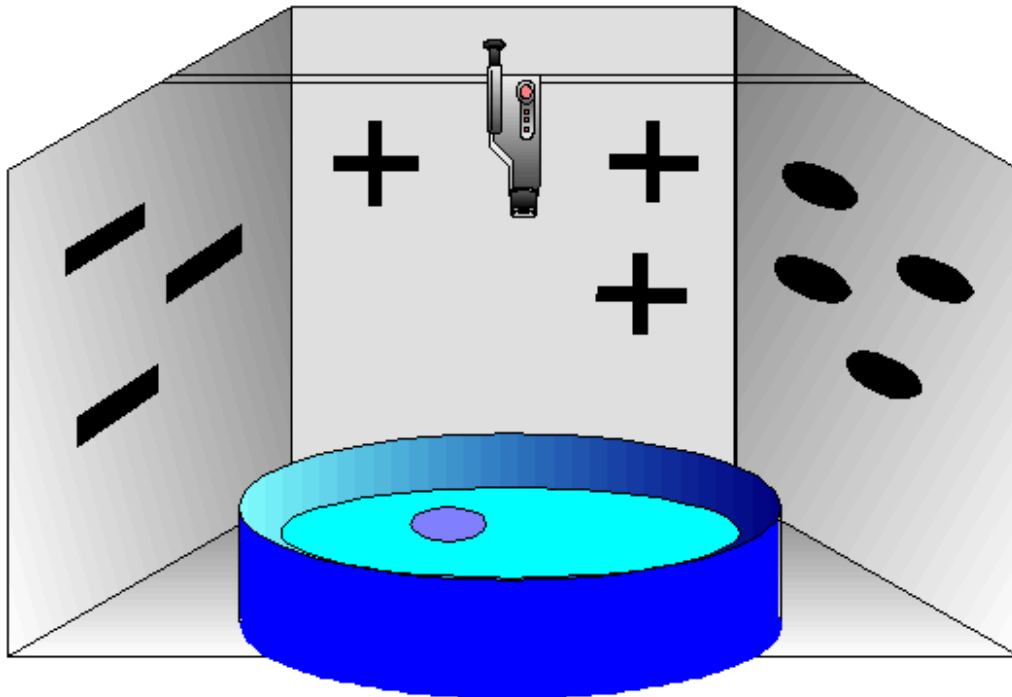
- *Camp obert “Open field”*. Per la realització del test del camp obert, el recinte utilitzat per col·locar l’animal era de fusta plastificada amb una superfície de 80 x 80 cm per rates i 38 x 38 cm per ratolins, amb unes

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



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

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



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

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

d) Altres instruments

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

## 2. Metodologia general.

### 2.1. Aparellament i identificació dels animals.

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

### 2.2. Preparació i administració de solucions.

- Hidrocortisona (HC)

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

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

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

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

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

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

### 2.3. Recollida de dades i tests.

#### I. *Toxicitat materna*

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

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

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

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

#### II. *Toxicitat embriofetal*

Per avaluar la toxicitat embriofetal es va controlar:

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

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

- Pes
- Sexe
- Relació mascles / femelles

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

➤ Transparentació i examen dels fetus

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

➤ Examen visceral

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

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

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

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

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

➤ Examen esquelètic

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

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

### III. Valoració del desenvolupament

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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

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

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

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

#### V. Altres tests

- *Bateria d'observació funcional "FOB"*

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

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

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

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

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

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

3- Anormalitats de la marxa

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

4- Estat de vigilància ("Arousal")

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

c) Deprimit, alguns moviments exploratoris estan presents amb períodes de immobilitat **(puntuació 3)**

d) Normal **(puntuació 4)**

e) Alt (“freezing” espontani ) **(puntuació 5)**

f) Molt alt (salts bruscos, o corre ) **(puntuació 6)**

5- Tancament palpebral

a) Ulls oberts **(puntuació 1)**

b) Ulls una mica tancats **(puntuació 2)**

c) Ulls tancats fins la meitat **(puntuació 3)**

d) Ulls completament tancats **(puntuació 4)**

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

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

8- Moviments clònics

a) No existeixen **(puntuació 1)**

b) Tremolors en les extremitats, orelles, cap o pell **(puntuació 2)**

c) Moviments repetitius de la boca o mandíbules **(puntuació 3)**

d) Tremolor lleuger **(puntuació 4)**

e) Tremolors severos o generalitzats **(puntuació 5)**

f) Sacsejades seques **(puntuació 6)**

g) Mossegades mioclòniques **(puntuació 7)**

h) Convulsions clòniques **(puntuació 8)**

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

a) Absència **(puntuació 1)**

b) Contracció dels extensors (extremitats rígides i estirades)  
**(puntuació 2)**

c) Opistòtons (cos arquejat cap a l'esquena) **(puntuació 3)**



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

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

10- Facilitat per treure l’individu del recinte.

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

11- Reactivitat a la manipulació

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

12- Salivació

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

13- Llagrimeig

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

c) Severa (**puntuació 3**)

14- Piloerecció

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

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

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

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

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

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

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

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

volum inicial. A continuació, deixàvem refredar les mostres i afegíem en cada tub 0.5 ml d'àcid perclòric ( $\text{HClO}_4$ ) i es calentaven els tubs a  $100^\circ\text{C}$  durant 2 hores. Després, es pujava la temperatura a  $180^\circ\text{C}$  per permetre la seva evaporació a fi de deixar aproximadament 1 ml de volum de mostra. A continuació, diluïem fins un volum total de 10 ml amb aigua bidestil.lada (MQ). Es procedia a l'emmagatzematge a  $-20^\circ\text{C}$  fins al moment de la seva lectura (Sánchez i cols, 1997; Gómez i cols, 1998).

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

#### VII. Anàlisi de corticosterona en sang

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

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

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

*VIII. Valoració del pes de les glàndules adrenals*

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

### **3. Metodologia específica.**

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

### 3.3. Estudis amb adults.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*“Primer observa, argumenta  
després”*

*Jean H.C. Fabre*



## IV. RESULTATS

### 1. Efectes materno i feto-tòxics de l'exposició prenatal a hidrocortisona (HC) i manganès (Mn).

Es va valorar la toxicitat materna (*taules IV.1, IV.2, IV.3*), i la toxicitat embriofetal (*taules IV.4, IV.5*) en ratolins exposats del dia 6 al 17 de gestació a hidrocortisona (HC), manganès (Mn), i HC combinada amb Mn, a dosis de 0 i 5 mg/kg/dia d'HC i 0, 1, 2 i 4 mg/kg/dia de clorur de manganès.

#### *Toxicitat materna*

A la *taula IV.1* es pot veure el guany de pes corporal dels ratolins gestants per cada grup de tractament. En els dies 0-6 de gestació, en que els animals no havien començat el tractament, no existeixen diferències significatives entre grups. Tanmateix, sí existeixen diferències entre grups durant els dies 7-18 de gestació. En aquest sentit, el grup control té un guany de pes més alt, diferint significativament del grup tractat amb la dosi de 4 mg/kg/dia de Mn, el qual té un guany de pes corporal més baix. Quan el grup tractat amb la dosi 4 mg/kg/dia rep a més a més HC (5 mg/kg/dia), aquest difereix encara més del grup control, ja que el guany de pes corporal és encara més baix.

Si dividim el període dels dies 7 al 18 de gestació en subperíodes: del 7 al 9, del 10 al 12, del 13 al 15 i del 16 al 18, veiem que apareixen diferències significatives respecte al grup control en quasi tots els subperíodes de tractament. Existeix un efecte significatiu del Mn en els subperíodes dies 7-9, 13-15 i 16-18 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) i un efecte de la HC en els mateixos períodes (7-9, 13-15, 16-18) ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). També existeix un efecte significatiu de la interacció (Mn x HC) durant aquests períodes ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ).

Taula IV.1. Guany de pes corporal en ratolins exposats a Mn i hidrocortisona durant els dies de gestació 6-18.

Hidrocortisona (mg/kg/dia)	0	0	0	0	5	5	5	5
Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	4	0	1	2	4
Nombre d'animals gestants	11	8	11	11	10	7	11	9
Dies de gestació	Guany de pes corporal (g)							
0-6	4.09±1.04	3.50±0.76	3.82±0.87	4.55±1.29	4.80±1.32	3.86±0.69	4.55±0.69	4.33±1.22
7-9	1.73±0.65 <sup>ac</sup>	1.88±0.64 <sup>a</sup>	0.45±0.69 <sup>b</sup>	1.64±1.12 <sup>ac</sup>	1.73±1.17 <sup>acb</sup>	0.43±0.53 <sup>cb</sup>	0.45±0.82 <sup>b</sup>	0.22±0.67 <sup>b</sup>
10-12	3.55±1.13	4.50±0.93	4.00±1.26	3.45±1.04	3.10±1.17	3.86±0.38	3.82±1.25	4.78±1.72
13-15	4.82±0.98 <sup>ac</sup>	6.50±0.93 <sup>a</sup>	5.73±1.01 <sup>ad</sup>	3.27±1.56 <sup>c</sup>	4.40±0.70 <sup>dce</sup>	5.57±1.51 <sup>ae</sup>	4.55±0.69 <sup>cde</sup>	-0.22±1.86 <sup>b</sup>
16-18	5.73±1.49 <sup>ac</sup>	6.88±1.13 <sup>a</sup>	4.91±1.92 <sup>ac</sup>	0.09±2.84 <sup>b</sup>	5.40±1.35 <sup>ac</sup>	4.00±1.15 <sup>c</sup>	4.55±1.29 <sup>ac</sup>	0.11±0.93 <sup>b</sup>
7-18	22.27±2.94 <sup>ac</sup>	26.88±2.36 <sup>a</sup>	21.82±3.76 <sup>ac</sup>	13.64±5.4 <sup>b</sup>	20.40±3.13 <sup>c</sup>	19.86±4.30 <sup>c</sup>	18.64±3.44 <sup>c</sup>	7.33±2.06 <sup>d</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en una mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c, d, e</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Tot i que es van trobar diferències entre grups en quant al guany de pes corporal (*taula IV.1*), no es van detectar diferències significatives entre les mitjanes dels grups de tractament en la ingesta de menjar (*taula IV.2*).

En quant a la variable pes corporal al final de la gestació (*taula IV.3*), hi ha diferències degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.001$ ) i de la HC ( $p < 0.001$ ). El pes de l'úter gràvid també difereix significativament segons el grup de tractament. Els grups amb pes més baix han estat els tractats amb la dosi més alta de Mn (4 mg/kg/dia), i aquesta disminució encara és més important quan aquesta dosi va acompanyada d'HC (5 mg/kg/dia). En aquesta variable hi ha un efecte del Mn ( $p < 0.001$ ), de l'HC ( $p < 0.001$ ) i de la interacció (Mn x HC) ( $p < 0.01$ ).

Pel que fa al pes corporal corregit (*taula IV.3*), tot i que existeixen algunes diferències entre grups, no hi ha diferències entre les mitjanes dels grups tractats i el grup control.

El canvi de pes corporal corregit (*taula IV.3*) està afectat pel Mn i la HC, trobant diferències entre els grups tot i que no són significatives respecte el grup control.

Malgrat no haver-hi diferències entre grups respecte al pes del fetge (pes absolut), sí apareixen diferències en el pes relatiu d'aquest òrgan, afectat pel factor Mn ( $p < 0.001$ ) i per la interacció (Mn x HC) ( $p < 0.05$ ). El pes relatiu més alt correspon als animals tractats amb la dosi més alta de Mn (4 mg/kg/dia). De la mateixa manera tampoc es troben diferències entre grups en el pes dels ronyons (pes absolut), però quan valorem les mitjanes dels grups segons el pes relatiu, aquest està augmentat en els grups exposats a la dosi més alta de Mn (4 mg/kg/dia) respecte al grup control. Aquestes diferències eren degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.001$ ) i la HC ( $p < 0.001$ ) (*taula IV.3*).

Taula IV.2. Ingesta d'aliment en ratolins exposats a Mn i hidrocortisona durant els dies de gestació 6 al 18.

Hidrocortisona (mg/kg/dia)	0	0	0	0	5	5	5	5
Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	4	0	1	2	4
Nombre d'animals gestants	11	8	11	11	10	7	11	9
Dies de gestació	Menjar consumit (g)							
0-6	55.98±24.72	32.22±2.41	41.25±30.26	45.32±9.88	43.31±5.79	31.10±2.49	29.30±15.35	45.61±25.37
7-9	16.83±5.16	15.83±0.29	19.53±9.38	18.45±3.46	19.46±6.08	16.58±1.28	20.42±5.02	27.39±17.60
10-12	18.75±7.73	16.89±0.84	16.22±0.48	16.93±5.38	19.63±4.50	17.38±1.38	19.73±6.62	19.03±8.44
13-15	16.55±3.03	20.42±2.24	18.83±1.81	17.45±3.07	19.25±6.22	21.29±2.73	21.83±7.27	23.25±4.02
16-18	20.92±5.07	24.56±1.90	21.03±1.06	18.67±4.31	23.29±6.57	23.83±2.48	20.63±5.33	23.53±10.17
7-18	73.05±17.59	77.69±1.81	75.61±9.29	71.50±13.58	81.63±20.10	79.08±5.96	82.62±19.78	93.19±35.94

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.3. Efectes del Mn, l'hidrocortisona, i Mn més hidrocortisona en algunes variables maternes en ratolins gestants.

Hidrocortisona (mg/kg/dia)	0	0	0	0	5	5	5	5
Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	4	0	1	2	4
Nombre d'animals gestants	11	8	11	11	10	7	11	9
Pes corporal al final de la gestació (g)	54.73±3.20 <sup>ac</sup>	58.38±2.07 <sup>a</sup>	53.55±4.39 <sup>ac</sup>	46.55±6.09 <sup>bc</sup>	54.40±3.72 <sup>ac</sup>	52.00±5.29 <sup>ace</sup>	50.82±3.92 <sup>c</sup>	40.11±1.27 <sup>d</sup>
Pes de l'úter gràvid (g)	18.75±2.74 <sup>ac</sup>	22.66±2.70 <sup>a</sup>	17.50±3.60 <sup>ac</sup>	8.39±6.01 <sup>b</sup>	19.45±2.26 <sup>ac</sup>	18.24±2.90 <sup>ac</sup>	17.29±2.74 <sup>c</sup>	1.90±0.44 <sup>d</sup>
Pes corporal corregit (g)	35.98±1.51 <sup>ac</sup>	35.71±1.70 <sup>ac</sup>	36.04±1.70 <sup>ac</sup>	38.16±2.66 <sup>a</sup>	34.88±2.31 <sup>c</sup>	33.76±3.06 <sup>c</sup>	33.31±1.84 <sup>c</sup>	38.35±1.19 <sup>a</sup>
Canvi de pes corporal corregit (g)	7.62±1.08 <sup>abc</sup>	7.71±2.26 <sup>abc</sup>	8.13±1.24 <sup>abc</sup>	9.80±2.59 <sup>ac</sup>	5.99±2.29 <sup>b</sup>	5.47±2.57 <sup>b</sup>	5.61±1.27 <sup>b</sup>	9.98±1.63 <sup>c</sup>
Pes del fetge (g)	2.32±0.29	2.41±0.12	2.40±0.20	2.55±0.28	2.19±0.19	2.19±0.33	2.08±0.23	2.37±0.18
Pes relatiu del fetge (%)	4.20±0.50 <sup>a</sup>	4.10±0.30 <sup>a</sup>	4.50±0.40 <sup>a</sup>	5.50±0.80 <sup>b</sup>	4.00±0.20 <sup>a</sup>	4.20±0.50 <sup>a</sup>	4.10±0.30 <sup>a</sup>	5.90±0.30 <sup>b</sup>
Pes dels ronyons (g)	0.40±0.02	0.36±0.02	0.39±0.02	0.49±0.05	0.41±0.03	0.40±0.06	0.41±0.04	0.47±0.05
Pes relatiu dels ronyons (%)	0.70±0.10 <sup>ac</sup>	0.60±0.00 <sup>a</sup>	0.70±0.10 <sup>ac</sup>	1.10±0.20 <sup>b</sup>	0.70±0.10 <sup>ac</sup>	0.80±0.10 <sup>ac</sup>	0.80±0.10 <sup>c</sup>	1.20±0.10 <sup>b</sup>

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c, d, e</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

### *Toxicitat embriofetal*

Els efectes de l'administració de Mn, HC i de Mn combinat amb HC a ratolins gestants en les variables reproductives i fetals (externes) es mostren a la **taula IV.4**.

No s'observen diferències estadísticament significatives en el nombre d'implantacions, ni en la relació entre mascles i femelles pels diferents grups.

Es va observar un increment significatiu del nombre total de reabsorcions per ventrada i del percentatge de pèrdues postimplantació, així com una reducció del nombre total de fetus vius en els animals exposats a Mn a 4 mg/kg/dia. Aquest increment en el nombre total de reabsorcions va ser particularment notable en el grup que a més a més rebia 5 mg/kg/dia d'HC, en el qual no va aparèixer cap fetus viu ni mort. Aquestes diferències són degudes a l'efecte, estadísticament significatiu, del Mn en les reabsorcions ( $p < 0.001$ ), en les pèrdues postimplantació ( $p < 0.001$ ) i en el nombre de fetus vius ( $p < 0.001$ ); de la HC en les reabsorcions ( $p < 0.001$ ) i en les pèrdues postimplantació ( $p < 0.05$ ), i de la interacció (Mn x HC) en les reabsorcions ( $p < 0.001$ ), en el les pèrdues postimplantació ( $p < 0.001$ ) i en el nombre de fetus vius ( $p < 0.001$ ).

El pes corporal dels fetus també va disminuir en els animals que rebien Mn a 4 mg/kg/dia, o Mn a 2 mg/kg/dia combinat amb HC (5 mg/kg/dia). Aquestes diferències entre grups eren degudes a efectes del Mn ( $p < 0.001$ ) o de la HC ( $p < 0.001$ ), però no de la interacció.

En l'examen visceral dels fetus, no es va veure cap malformació, ni per tant, diferències entre grups.

Els resultats de l'examen esquelètic es mostren a la **taula IV.5**. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre els grups en el nombre total de retards en l'ossificació. En canvi, es van trobar alteracions en l'ossificació del parietal i l'occipital, així com el xifoide ( $p < 0.001$ ), caudal ( $p < 0.01$ ), costelles, metacarps i metatars ( $p < 0.001$ ), tots deguts al Mn. Es va observar també un efecte de la HC en l'ossificació de l'occipital, mentre que no es va trobar cap efecte de la interacció entre Mn i HC en els defectes esquelètics.

Taula IV.4. Efectes de l'administració d'hydrocortisona, Mn, i hydrocortisona més Mn a ratolins gestants en les variables reproductives i fetals.

Hydrocortisona (mg/kg/dia)	0	0	0	0	5	5	5	5
Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	4	0	1	2	4
Nombre de ventrades	11	8	11	11	10	7	11	9
Implantacions/ ventrada	12.09±2.17	13.50±1.41	11.55±1.51	9.36±3.85	14.40±1.26	12.57±1.90	13.09±2.34	11.67±3.04
Fetus vius/ventrada	11.27±1.9 <sup>ac</sup>	13.13±1.4 <sup>a</sup>	9.09±2.77 <sup>c</sup>	3.45±4.14 <sup>b</sup>	13.40±1.7 <sup>a</sup>	12.43±1.99 <sup>ac</sup>	11.82±1.83 <sup>ac</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Fetus morts/ventrada	0.36±0.50 <sup>a</sup>	0.13±0.35 <sup>a</sup>	1.64±1.63 <sup>a</sup>	1.45±2.34 <sup>a</sup>	0.10±0.32 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.55±0.93 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
Reabsorcions/ ventrada	0.45±0.69 <sup>a</sup>	0.25±0.46 <sup>a</sup>	0.82±0.87 <sup>a</sup>	4.36±4.76 <sup>b</sup>	0.90±0.88 <sup>a</sup>	0.14±0.38 <sup>a</sup>	0.73±0.65 <sup>a</sup>	11.67±3.04 <sup>c</sup>
Pèrdues postimplantació/ ventrada (%)	0.82±0.87 <sup>a</sup>	0.38±0.74 <sup>a</sup>	2.45±2.11 <sup>a</sup>	5.91±5.09 <sup>b</sup>	1.00±0.94 <sup>a</sup>	0.14±0.38 <sup>a</sup>	1.27±1.19 <sup>a</sup>	11.67±3.04 <sup>c</sup>
Mitjana del pes dels fetus/ventrada (g)	1.30±0.0 <sup>a</sup>	1.35±0.07 <sup>a</sup>	1.26±0.11 <sup>ac</sup>	0.97±0.09 <sup>b</sup>	1.16±0.06 <sup>cd</sup>	1.16±0.10 <sup>ac</sup>	1.12±0.04 <sup>d</sup>	----
Relació mascles- femelles (M/M+F)	0.43±0.15	0.45±0.08	0.44±0.12	0.57±0.27	0.52±0.14	0.47±0.08	0.43±0.15	----

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c, d</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.5. Efectes de l'administració d'hydrocortisona, Mn, i hydrocortisona més Mn en els defectes esquelètics dels fetus de ratolí.

Hidro cortisona (mg/kg/dia)	0	0	0	0	5	5	5	5
Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	4	0	1	2	4
Examen esquelètic								
Nombre de ventrades examinades esquelèticament (fetus)	12(70)	7(47)	11(53)	6(19)	10(66)	8(44)	11(69)	0(0)
Nombre total de retards en l'ossificació	12(48)	7(43)	10(35)	6(19)	10(55)	8(42)	11(66)	--
Parietal	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	5(7) <sup>b</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	--
Frontal	0(0)	0(0)	4(7)	3(6)	2(9)	3(4)	1(1)	--
Occipital	1(2) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	2(2) <sup>ac</sup>	5(7) <sup>bc</sup>	5(16) <sup>ac</sup>	5(14) <sup>ac</sup>	8(23) <sup>bc</sup>	--
Estèrnum	8(34)	6(37)	9(23)	6(16)	8(38)	8(40)	11(54)	--
Xifoide	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	3(3) <sup>b</sup>	1(1) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	1(1) <sup>a</sup>	--
Caudal	1(2) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	4(7) <sup>b</sup>	4(8) <sup>b</sup>	1(3) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	2(3) <sup>ab</sup>	--
Costelles	5(6) <sup>ab</sup>	0(0) <sup>a</sup>	4(5) <sup>ab</sup>	6(13) <sup>c</sup>	5(16) <sup>ab</sup>	0(0) <sup>a</sup>	5(12) <sup>ab</sup>	--
Primer metacarp	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	1(2) <sup>a</sup>	3(5) <sup>b</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	--
Segon metacarp	0(0) <sup>a</sup>	1(2) <sup>a</sup>	2(4) <sup>a</sup>	6(10) <sup>b</sup>	1(1) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	1(2) <sup>a</sup>	--
Tercer metacarp	3(7) <sup>a</sup>	3(8) <sup>ac</sup>	6(11) <sup>ac</sup>	6(16) <sup>bc</sup>	2(2) <sup>a</sup>	2(4) <sup>a</sup>	7(18) <sup>ab</sup>	--
Primer metatars	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	1(3) <sup>a</sup>	3(5) <sup>b</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	--
Segon metatars	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	4(7) <sup>a</sup>	6(14) <sup>b</sup>	1(2) <sup>a</sup>	1(1) <sup>a</sup>	1(3) <sup>a</sup>	--
Tercer metatars	1(1) <sup>a</sup>	1(2) <sup>a</sup>	6(11) <sup>ab</sup>	6(16) <sup>b</sup>	1(2) <sup>a</sup>	3(6) <sup>ab</sup>	5(9) <sup>ab</sup>	--

Resultats en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b, c</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).



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

En aquest experiment es va avaluar la toxicitat materna (*taula IV.6*), la toxicitat embriofetal, variables del desenvolupament (*taula IV.7, 8*) i altres paràmetres relacionats (*taules IV.9, 10, 11*), i els efectes en la conducta (*taules IV.12, 13, 18, 19; figures IV.14, 15, 16, 17, 20, 21, 22*) de cries de ratolins exposades prenatalment, del dia 6 al 17 de gestació, a estrès per immobilització ("restraint") 2 hores per dia, i a Mn injectat per via subcutània a dosis de 0, 1 i 2 mg/kg/dia o ambdós; és a dir, estrès per immobilització més Mn.

### *Toxicitat materna*

No es van observar diferències estadísticament significatives entre grups en quant al menjar consumit, el guany de pes i el pes al final de la gestació, deguts a l'efecte del Mn o de l'estrès, en els ratolins gestants exposats a Mn i/o a estrès (*taula IV.6*).

### *Toxicitat embriofetal, variables del desenvolupament i altres paràmetres relacionats*

No es van veure diferències significatives entre grups en la duració de la gestació, el nombre de fetus per ventrada i en l'índex de lactància (*taula IV.7*).

Per contra, sí es van observar diferències en l'índex de viabilitat (fetus vius al dia postnatal 4 / fetus vius al naixement) entre grups. Aquestes diferències eren degudes a l'efecte del Mn ( $p < 0.001$ ), i indicaven un alt percentatge de mortalitat postnatal en els animals tractats amb la dosi més alta de Mn (*taula IV.7*).

Taula IV.6. Ingesta de menjar i guany de pes corporal en ratolins exposats a Mn i estrès durant els dies 6 al 18 de gestació.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre d'animals gestants	12	11	8	10	11	11
Menjar consumit (g/animal) entre els dies 0-6 de gestació	35.00±10.58	35.67±9.07	35.40±8.85	38.07±5.34	31.00±6.44	39.43±5.77
Menjar consumit (g/animal) entre els dies 7-18 de gestació	80.83±5.88	71.00±5.20	79.80±14.18	83.86±7.73	76.80±5.36	79.43±8.12
Menjar consumit (g/animal) entre els dies 0-18 de gestació	115.83±12.59	106.67±14.22	115.20±22.69	121.92±12.49	107.90±9.30	118.86±11.68
Guany de pes corporal (g) entre els dies 0-6 de gestació	4.66±0.89	4.36±0.84	4.21±0.80	4.81±0.87	4.72±0.64	4.54±1.03
Guany de pes corporal (g) entre els dies 7-18 de gestació	25.20±4.59	23.27±3.41	23.07±5.58	22.30±5.70	21.82±5.19	22.64±3.29
Guany de pes corporal total (g) entre els dies 0-18 de gestació	30.10±4.43	27.27±3.69	27.14±5.50	27.10±5.78	27.18±5.17	27.09±3.73
Pes corporal en acabar la gestació (g)	54.20±5.63	50.55±3.50	51.79±5.66	52.30±6.72	50.64±6.53	52.73±4.27

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.7. Efectes del Mn, estrès, i la combinació de Mn i estrès en la maduració física de ratolins exposats prenatalment.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Durada de la gestació (dies)	19	19	19	19	19	19
Nombre de ventrades	12	11	8	10	11	11
Nombre de fetus per ventrada	11.67±2.64	11.09±2.17	8.75±2.66	12.70±2.11	11.09±3.01	10.64±2.54
Índex de viabilitat (%)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	91.80 <sup>b</sup>	99.09 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	94.00 <sup>b</sup>
Índex de lactància (%)	100	100	100	100	100	100
Número de dies pel desplegament del pavelló auditiu						
Mascles	4.28±0.62 <sup>a</sup>	5.27±0.47 <sup>b</sup>	4.38±0.42 <sup>a</sup>	3.93±0.30 <sup>a</sup>	4.10±0.47 <sup>a</sup>	4.24±0.59 <sup>a</sup>
Femelles	4.36±0.61 <sup>a</sup>	5.27±0.47 <sup>b</sup>	4.33±0.44 <sup>a</sup>	4.07±0.34 <sup>a</sup>	4.14±0.45 <sup>a</sup>	4.29±0.39 <sup>a</sup>
Número de dies per l'erupció d'incisius						
Mascles	5.58±0.71 <sup>a</sup>	5.51±0.50 <sup>a</sup>	6.04±1.24 <sup>ab</sup>	5.83±0.59 <sup>ab</sup>	6.69±0.86 <sup>b</sup>	5.71±0.76 <sup>ab</sup>
Femelles	5.66±0.83 <sup>ab</sup>	5.54±0.54 <sup>a</sup>	5.69±0.63 <sup>ab</sup>	5.90±0.54 <sup>ab</sup>	6.48±0.75 <sup>b</sup>	5.79±0.59 <sup>ab</sup>
Número de dies per l'obertura d'ulls						
Mascles	13.69±0.46 <sup>a</sup>	13.86±0.96 <sup>ab</sup>	14.57±0.86 <sup>ab</sup>	13.90±0.22 <sup>ab</sup>	14.44±0.58 <sup>ab</sup>	14.54±0.54 <sup>b</sup>
Femelles	13.72±0.37 <sup>a</sup>	14.03±0.71 <sup>ab</sup>	14.47±0.54 <sup>b</sup>	13.93±0.44 <sup>ab</sup>	14.51±0.48 <sup>b</sup>	14.39±0.44 <sup>b</sup>
Número de dies pel descens de testicles	23.11±1.17 <sup>ab</sup>	22.49±0.75 <sup>b</sup>	23.85±0.90 <sup>a</sup>	22.49±0.79 <sup>b</sup>	22.57±0.68 <sup>b</sup>	22.30±0.78 <sup>b</sup>
Número de dies per l'obertura de vagina	23.33±2.22	21.94±1.01	23.96±1.54	22.77±0.94	22.74±1.21	22.67±1.22

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a</sup>,<sup>b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).



Pel que fa a la mesura de la mitjana de dies que trigaven els animals en desplegar el pavelló auditiu, s'han trobat diferències entre grups tant en mascles com en femelles, observant un augment del nombre de dies del grup tractat amb 1 mg/kg/dia de Mn respecte al grup control. L'anàlisi estadístic per factors va revelar un efecte del Mn en mascles i femelles ( $p < 0.01$ ), de l'estrès en mascles i femelles ( $p < 0.001$ ), i un efecte de la interacció (Mn x estrès) també en tots dos sexes ( $p < 0.01$ ) (*taula IV.7*).

Es van observar diferències significatives entre grups en la mitjana de dies necessaris per l'erupció dels incisius, tant en mascles com en femelles. Aquestes diferències eren degudes a la interacció (Mn x estrès), tant en mascles ( $p < 0.05$ ) com en femelles ( $p < 0.05$ ). També es van observar diferències significatives entre grups en la mitjana de dies que trigaven els animals en obrir els ulls en els dos sexes, diferències degudes a l'efecte del Mn, tant en mascles ( $p < 0.01$ ) com en femelles ( $p < 0.01$ ). La maduració sexual només es va veure afectada en mascles, on es van apreciar diferències entre grups degudes a un efecte de l'estrès ( $p < 0.01$ ), i de la interacció (Mn x estrès) ( $p < 0.05$ ) sobre aquesta maduració sexual (*taula IV.7*).

Respecte al pes corporal de les cries durant el període de lactància avaluat els dies postnatsals 1, 4, 8, 12 i 21 (*taula IV.8*), tot i que sembla haver-hi una certa tendència cap a una disminució de pes en les mitjanes dels grups tractats, no es va veure cap diferència estadísticament significativa en femelles. En el pes corporal dels mascles apareixen diferències entre les mitjanes dels grups en els dies 4 i 8 postnatsals, degut a un efecte del Mn ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). L'anàlisi dels efectes del tractament mostra una interacció significativa entre l'edat i el Mn ( $p < 0.001$ ), la qual cosa indica que els efectes només es manifesten en els primers dies postnatsals, edat i sexe ( $p < 0.01$ ), la qual cosa indica que quan es detecten efectes en els primers dies, aquests només s'observen en mascles, així com passa també en la interacció entre l'edat, el Mn i l'estrès ( $p < 0.001$ ) (*taula IV.8*).

La ***taula IV.9*** mostra les mitjanes de temps que tardaven les mares dels grups de tractament en tornar al cau les seves cries (6 cries). No es van observar diferències significatives en la “cura materna” ni en el dia 1 ni en el 3 postpart.

No es van trobar diferències significatives entre grups en el reflex d'adreçament, ni en mascles ni en femelles, en els dies 9, 11 i 15. En canvi pel que fa al reflex de geotaxi mesurat els dies 10 i 12 postnatsals es van observar diferències significatives en mascles en les mitjanes dels grups el dia 12 (***taula IV.10***).

No es van detectar diferències significatives en cap dels dos sexes en la força a les extremitats anteriors mesurada els dies 9, 11 i 15 postnatsals (***taula IV.11***).

Taula IV.8. Efectes del Mn, estrès, i la combinació de Mn i estrès en el pes corporal de les cries.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 11	n = 11
Pes corporal (dia 1)						
Mascles	1.82±0.14	1.81±0.13	1.71±0.29	1.72±0.07	1.84±0.15	1.65±0.09
Femelles	1.77±0.13	1.73±0.11	1.71±0.11	1.66±0.11	1.76±0.15	1.67±0.09
Pes corporal (dia 4)						
Mascles	3.53±0.28 <sup>a</sup>	3.51±0.24 <sup>a</sup>	2.91±0.66 <sup>b</sup>	3.29±0.25 <sup>ab</sup>	3.51±0.24 <sup>a</sup>	3.08±0.52 <sup>ab</sup>
Femelles	3.47±0.27	3.35±0.22	3.03±0.33	3.13±0.31	3.41±0.31	3.26±0.31
Pes corporal (dia 8)						
Mascles	6.33±0.57 <sup>ab</sup>	6.24±0.55 <sup>ab</sup>	5.44±0.93 <sup>a</sup>	5.92±0.55 <sup>ab</sup>	6.23±0.55 <sup>b</sup>	5.78±0.72 <sup>ab</sup>
Femelles	6.32±0.53	6.14±0.45	5.74±0.64	5.77±0.64	6.18±0.55	6.00±0.43
Pes corporal (dia 12)						
Mascles	8.62±0.65	8.73±0.64	8.27±0.90	8.46±0.78	9.00±0.68	8.16±0.79
Femelles	8.63±0.53	8.55±0.52	8.43±0.67	8.40±0.97	8.93±0.82	8.38±0.76
Pes corporal (dia 21)						
Mascles	15.08±1.64	14.81±1.07	14.23±1.64	15.04±1.50	15.15±1.77	14.15±1.27
Femelles	14.36±1.09	14.10±0.55	14.03±1.03	14.20±1.61	14.44±1.39	14.18±1.16

n: nombre de ventrades

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a,b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.9. Efectes del Mn, estrès, i la combinació de Mn i estrès en la cura materna\*.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 11	n = 11	n = 8	n = 10	n = 11	n = 11
Cura materna (dia 1)	95.18±149.62	63.55±23.83	98.00±71.16	80.60±38.88	139.82±168.07	89.36±70.89
	n = 11	n = 11	n = 8	n = 10	n = 11	n = 10
Cura materna (dia 3)	89.55±169.83	49.18±25.97	49.88±32.26	83.10±125.83	106.82±164.76	115.30±191.70

n: nombre de ventrades

\*Cura materna, segons el nostre índex, temps que tarda la mare (en seg.) en tornar a col.locar les cries al seu cau.

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.



Taula IV.10. Efectes del Mn, estrès, i la combinació de Mn i estrès en la maduració motora de les cries (I)

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre de ventrades	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 12	n = 11
Reflex d'adreçament (s)						
Mascles						
Dia 5	10.48±15.77	8.59±4.19	7.52±7.37	9.33±4.41	3.97±3.23	5.70±3.85
Dia 7	3.52±5.49	1.60±1.51	1.81±0.98	1.70±1.34	1.47±1.35	2.74±3.42
Dia 9	1.08±0.28	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.09±0.30
Femelles						
Dia 5	11.57±9.73	8.09±4.30	6.67±8.35	5.63±4.23	6.50±4.23	5.21±3.33
Dia 7	3.30±3.18	2.24±2.28	6.82±7.89	2.50±4.39	1.82±1.39	3.18±3.69
Dia 9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.08±0.23	1.20±0.63	1.00±0.00	1.21±0.70
Geotaxi (s)						
Mascles						
Dia 10	7.00±2.88	4.43±1.84	3.73±1.75	6.48±2.15	5.83±1.87	6.27±2.67
Dia 12	5.45±3.05 <sup>a</sup>	3.93±2.96 <sup>b</sup>	6.02±3.75 <sup>a</sup>	5.05±2.12 <sup>a</sup>	3.05±1.41 <sup>b</sup>	6.61±2.87 <sup>a</sup>
Femelles						
Dia 10	9.25±5.85	4.33±1.55	5.37±1.31	9.62±5.97	5.93±3.25	5.09±2.61
Dia 12	6.86±1.85	4.12±1.84	6.56±2.34	6.35±2.17	3.58±1.06	6.19±3.29

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.11. Efectes del Mn, estrès, i la combinació de Mn i estrès en la maduració motora de les cries (II)

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre de ventrades	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 12	n = 11
Força a les extremitats anteriors (g)						
Mascles						
Dia 9	3.67±2.95	5.95±2.33	3.10±3.29	4.94±2.75	6.20±3.75	4.42±4.06
Dia 11	11.47±4.63	11.51±2.88	7.55±3.30	11.92±3.16	14.48±19.49	9.51±3.92
Dia 15	30.13±2.69	27.47±3.25	27.29±3.44	28.09±3.81	28.43±2.91	28.63±6.04
Femelles						
Dia 9	3.35±3.06	5.39±2.72	5.03±4.43	5.06±1.47	5.09±2.00	3.41±2.09
Dia 11	11.80±5.62	12.15±4.47	10.06±3.94	12.27±3.64	8.47±3.30	11.16±4.49
Dia 15	29.23±3.74	29.42±1.96	27.29±5.10	29.95±2.37	30.25±2.56	30.15±3.66

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

### *Efectes en la conducta posterior*

En relació al nivell d'activitat mesurat en un camp obert (agafant els 30 minuts i avaluant-los fraccionats de 10 en 10), l'anàlisi de la variància per mesures repetides va revelar en mascles un efecte del temps sobre la distància recorreguda a la zona centre, i en els aixecaments o "rearings" totals (en tot el camp obert), així com un efecte de la interacció entre el temps i el Mn ( $p < 0.05$ ) en la distància total recorreguda (en tot el camp obert) (**taula IV.12**). En femelles, l'anàlisi de la variància per mesures repetides va revelar un efecte del temps en la distància recorreguda a la zona centre, i en la distància i "rearings" totals (**taula IV.13**).

L'anàlisi més detallat de les dades dels diferents períodes, també es va portar a terme pels dos sexes. En mascles, no es van trobar diferències significatives entre grups en les variables: distància recorreguda a la zona centre, a la perifèria, i "rearings" totals (avaluant els 30 minuts totals en intervals de 10). Tampoc es van trobar diferències en les mitjanes de les defecacions en el Camp Obert (**taula IV.12**). En femelles, es van observar diferències en la distància recorreguda a la zona centre entre els 10 i els 20 minuts. Aquestes eren degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.05$ ). També es van observar diferències en la distància recorreguda a la perifèria durant els 10 primers minuts. L'anàlisi per factors va revelar que aquestes eren degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.05$ ) i de la interacció (Mn x estrès) ( $p < 0.05$ ) (**taula IV.13**). En femelles, també es van veure diferències entre la distància total recorreguda (en tot el camp obert) durant els primers 10 minuts, les quals eren degudes a un efecte del Mn ( $p < 0.01$ ) i de la interacció ( $p < 0.05$ ) (**figura IV.15**). No es van observar diferències en aquesta variable en els intervals 10-20 minuts, ni 20-30 minuts (**figura IV.15**). En mascles no es van apreciar diferències significatives entre els grups en la distància total recorreguda en cap dels 3 intervals (0-10, 10-20, 20-30 minuts) (**figura IV.14**).

Taula IV.12. Resultats per grup de tractament de les variables avaluades en la prova del Camp Obert en *muscles*.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre de ventrades	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 12	n = 11
Distància recorreguda a la zona centre, dels 0 als 10 minuts (cm)	530.43±227.20	481.91±208.84	493.57±197.94	425.48±240.40	445.54±151.58	375.65±171.93
Distància recorreguda a la zona centre, dels 10 als 20 minuts (cm)	444.54±173.62	370.49±133.82	342.80±168.07	369.47±169.46	374.17±114.61	281.31±153.73
Distància recorreguda a la zona centre, dels 20 als 30 minuts (cm)	281.86±185.83	337.36±158.73	331.81±175.77	301.11±141.47	349.87±140.05	260.16±132.45
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 0 als 10 minuts (cm)	3017.25±842.40	3594.44±549.02	2529.37±853.66	2699.20±1153.79	2876.42±551.39	2798.48±771.53
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 10 als 20 minuts (cm)	2573.37±1507.02	2157.68±321.48	1620.59±717.33	1980.02±612.52	1836.33±422.42	1882.50±667.21
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 20 als 30 minuts (cm)	2092.23±946.99	1993.76±501.68	1686.90±836.36	1598.61±555.77	1795.27±758.44	1562.83±524.38
“Rearings”, dels 0 als 10 minuts	88.33±8.81	94.73±8.97	90.63±14.32	87.70±14.88	93.83±10.36	89.18±10.11
“Rearings”, dels 10 als 20 minuts	85.42±5.99	87.36±9.67	83.50±10.82	85.70±13.89	85.58±12.69	79.64±13.43
“Rearings”, dels 20 als 30 minuts	79.67±21.15	83.18±10.30	80.25±14.65	79.20±15.58	86.67±12.72	73.91±10.77
Defecacions	9.25±3.70	10.18±4.51	9.38±4.24	9.00±3.56	8.67±2.93	10.18±3.03

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

Taula IV.13. Resultats per grup de tractament de les variables avaluades en la prova del Camp Obert en *femelles*.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre de ventrades	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 12	n = 11
Distància recorreguda a la zona centre, dels 0 als 10 minuts (cm)	403.65±112.25	515.53±165.26	489.80±155.39	549.76±116.61	553.55±160.57	443.16±124.46
Distància recorreguda a la zona centre, dels 10 als 20 minuts (cm)	280.52±133.41 <sup>a</sup>	494.43±146.66 <sup>b</sup>	362.76±144.97 <sup>ab</sup>	400.32±133.87 <sup>ab</sup>	409.62±156.86 <sup>ab</sup>	339.44±114.85 <sup>ab</sup>
Distància recorreguda a la zona centre, dels 20 als 30 minuts (cm)	262.60±131.25	366.02±142.26	374.64±174.38	297.32±97.31	347.06±144.34	267.44±150.20
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 0 als 10 minuts (cm)	2262.94±509.86 <sup>a</sup>	3150.11±642.74 <sup>b</sup>	2612.81±660.80 <sup>ab</sup>	2766.40±263.17 <sup>ab</sup>	2827.98±570.11 <sup>ab</sup>	2625.50±474.37 <sup>ab</sup>
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 10 als 20 minuts (cm)	1687.17±625.57	1936.06±422.73	1810.87±694.95	1755.02±250.66	1974.45±305.46	1708.59±855.83
Distància recorreguda a la zona de la perifèria, dels 20 als 30 minuts (cm)	1521.56±642.46	1905.77±515.77	1651.79±554.42	1568.95±239.81	1905.22±427.78	1529.45±521.09
“Rearings”, dels 0 als 10 minuts	82.67±12.36	92.45±3.61	93.25±9.59	93.90±9.77	88.08±9.23	89.00±7.21
“Rearings”, dels 10 als 20 minuts	82.25±14.52	86.36±8.11	87.63±12.61	84.40±6.67	83.67±7.73	84.00±7.08
“Rearings”, dels 20 als 30 minuts	78.08±11.87	85.91±8.51	84.62±15.43	76.20±12.27	82.42±8.63	83.64±10.14
Defecacions	9.25±3.70	9.64±3.11	9.37±5.21	9.30±4.62	9.00±3.36	9.60±2.72

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a, b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

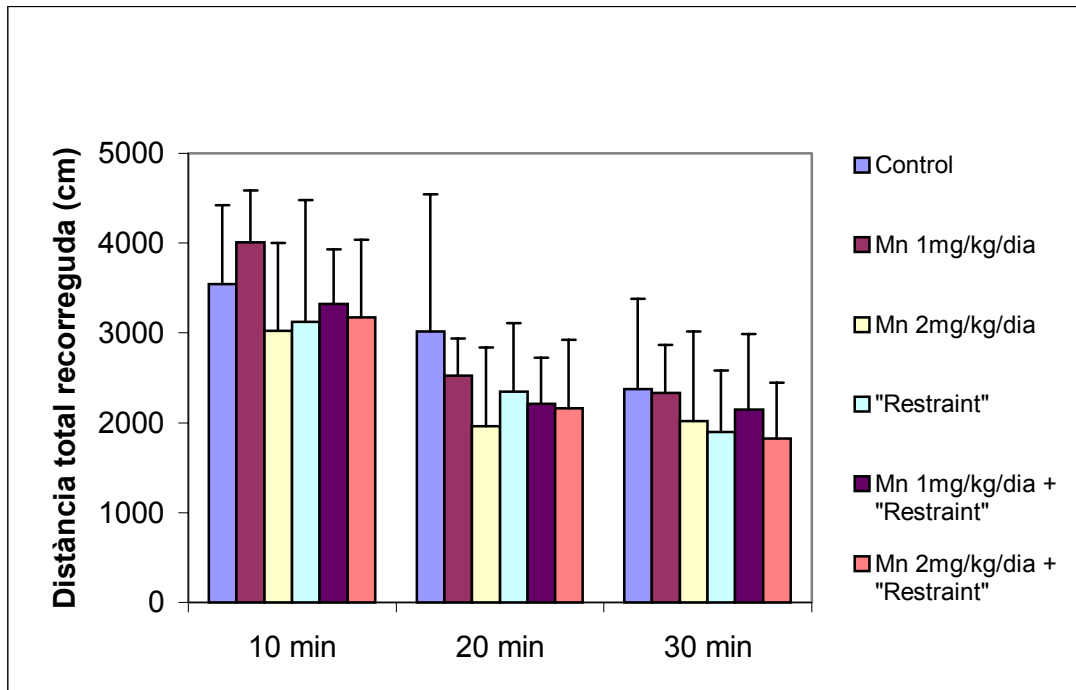


Figura IV.14. Distància total recorreguda pels mascles a la prova del Camp Obert els 30 primers minuts, dividida en intervals de 10 minuts.

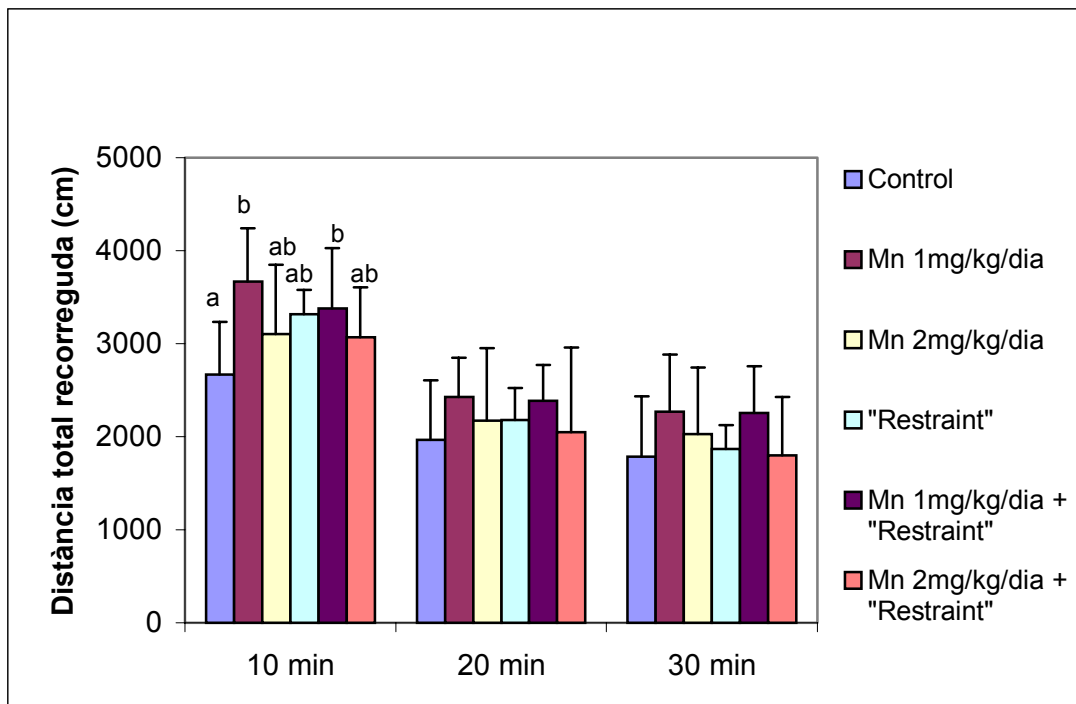


Figura IV.15. Distància total recorreguda per les femelles a la prova del Camp Obert els 30 primers minuts, dividida en intervals de 10 minuts.

Per tal de valorar els efectes novedosos del Camp Obert i l'habitució a aquest, es varen analitzar els resultats dels primers 15 minuts d'una forma més detallada, avaluant la distància total recorreguda (en tot el Camp Obert) durant els primers 15 minuts, dividint-los en intervals de 5 minuts.

L'anàlisi de la variància per mesures repetides va revelar un efecte del temps i de l'estrès ( $p < 0.05$ ) i una interacció entre el temps i el Mn ( $p < 0.05$ ), així com del Mn i de l'estrès ( $p < 0.05$ ) en mascles (*figura IV.16*). En femelles, també es va observar un efecte del temps i un del Mn ( $p < 0.05$ ) en la distància total recorreguda (*figura IV.17*). Es va efectuar un anàlisi més detallat de les dades en mascles i femelles d'aquests períodes. Es van trobar diferències entre grups en la distància total recorreguda durant els 5 primers minuts en mascles i femelles i en el període dels 5 als 10 minuts en mascles (*figures IV.16, 17*). No es va notar cap efecte del Mn, estrès, o de la interacció (Mn x estrès), en el nombre de "rearings" a través dels períodes o en el període total dels 15 minuts.

No hi ha diferències entre grups en les mitjanes dels valors del rotarod, avaluant la coordinació motora, ni en el pes dels animals al dia 75 postnatal. Sí es van trobar diferències significatives entre grups quan es va avaluar la força a les extremitats al dia 75 postnatal, encara que només en femelles, les quals eren degudes a un efecte de l'estrès ( $p < 0.01$ ) (*taula IV.18*).

Al dia 80 postnatal s'aplicava als animals un test d'evitació passiva. L'anàlisi de la variància per mesures repetides, utilitzant el dia del test com a mesura repetida, avaluava les diferències entre la latència en el dia d'adquisició (T1) i la latència 24h després, i el dia de retenció (T2). Es va observar una interacció entre el dia del test i l'estrès, tant en mascles com en femelles ( $p < 0.01$ ), així com un efecte de l'estrès en mascles ( $p < 0.01$ ). La latència per entrar al compartiment fosc va ser significativament més alta en tots els grups, excepte en els ratolins exposats a 1 mg/kg/dia de Mn i estrès (*figures IV.20, 21*). No hi ha diferències significatives en el nombre d'animals que van arribar al criteri d'aprenentatge de la tasca ( $T2 > 5$  min) 24h després de l'adquisició. No hi ha diferències significatives entre grups en cap dels dos sexes, en els valors absoluts de T1, T2, defecacions en el dia d'adquisició i defecacions en el dia de retenció (*taula IV.19*).

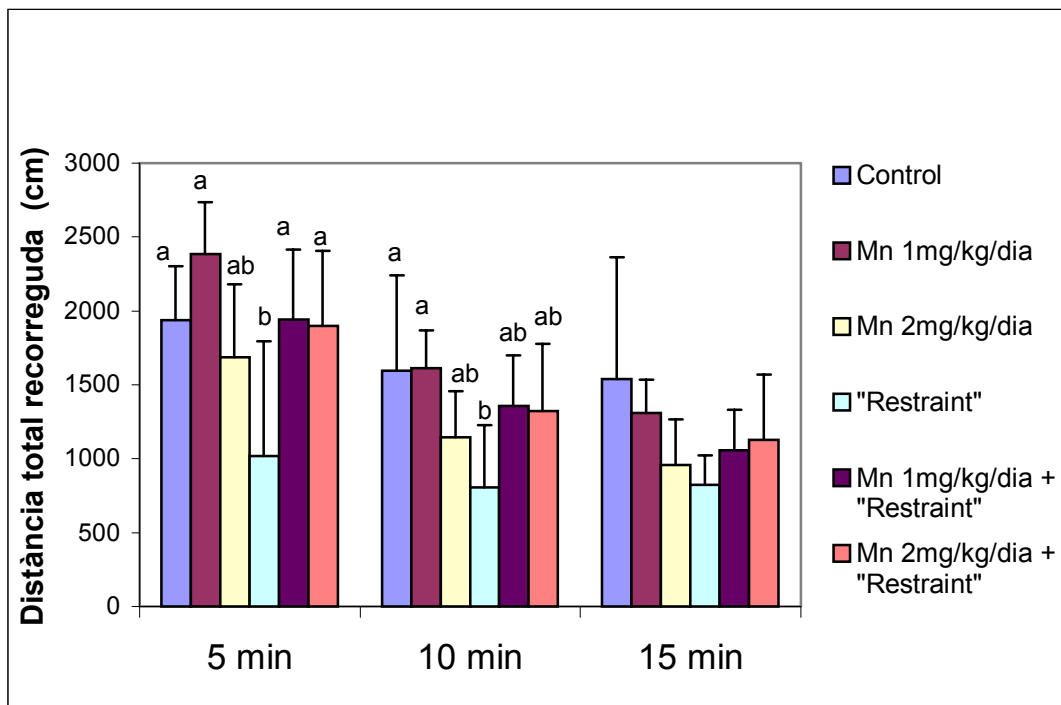


Figura IV.16. Distància total recorreguda pels mascles a la prova del Camp Obert els 15 primers minuts, dividida en intervals de 5 minuts.

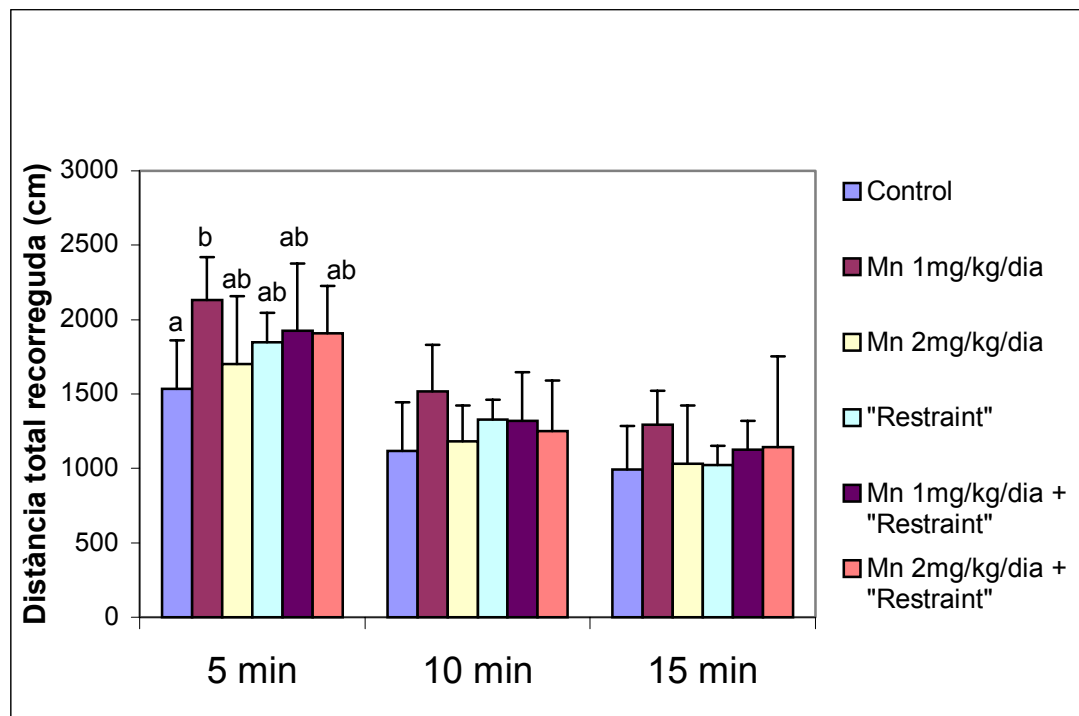


Figura IV.17. Distància total recorreguda per les femelles a la prova del Camp Obert els 15 primers minuts, dividida en intervals de 5 minuts.



Taula IV.18. Avaluació postdeslletament de ratolins exposats prenatalment a Mn i estrès.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 11	n = 11
Pes corporal el dia 75 (g)						
Mascles	40.33±5.42	41.27±5.04	43.00±6.46	44.10±4.60	45.17±4.72	43.54±5.72
Femelles	31.50±5.20	31.18±4.69	32.25±4.77	33.40±5.19	33.08±2.84	34.36±4.63
Força a les extremitats anteriors el dia 75 (g)						
Mascles	85.79±3.23	84.21±5.71	81.11±7.84	85.23±2.44	84.31±3.12	84.26±7.11
Femelles	83.30±5.91 <sup>ab</sup>	78.64±10.85 <sup>ab</sup>	75.12±7.78 <sup>a</sup>	83.57±6.48 <sup>ab</sup>	86.51±4.24 <sup>b</sup>	82.43±6.06 <sup>ab</sup>
Rotarod el dia 75 (s)						
Mascles	34.67±32.59	17.54±28.36	14.25±10.33	31.30±34.18	27.08±38.62	15.18±20.82
Femelles	52.08±60.99	25.73±34.01	41.12±31.41	31.00±22.96	43.42±42.71	24.54±22.72

n: nombre d'animals avaluats.

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard. Valors en la mateixa fila que mostren diferents superíndex (<sup>a,b</sup>) presenten diferències estadísticament significatives al 95% (p<0.05).

Taula IV.19. Mitjanes i desviacions per grup de tractament de les variables avaluades en la prova d'Evitació Passiva.

Clorur de Mn (mg/kg/dia)	0	1	2	0	1	2
Estrès per immobilització	-	-	-	+	+	+
Nombre d'animals	n = 12	n = 11	n = 8	n = 10	n = 12	n = 10
Temps en passar al compartiment fosc el 1er dia, mascles (T-1 en segons)	20.78±28.31	15.06±10.63	26.63±23.92	37.72±31.89	27.96±31.54	14.45±9.79
Temps en passar al compartiment fosc el 2on dia, mascles (T-2 en segons)	48.69±14.31	34.99±23.18	35.82±19.50	47.27±18.34	46.90±16.65	29.82±21.11
Defecacions en T-1, mascles.	0.17±0.58	0.42±1.16	0.63±1.41	0.60±0.84	0.42±1.16	0.20±0.63
Defecacions en T-2, mascles.	1.00±1.35	0.58±0.99	0.75±0.89	0.90±0.88	0.67±0.78	0.60±1.35
Temps en passar al compartiment fosc el 1er dia, femelles (T-1 en segons)	14.53±15.80	28.33±24.13	17.14±7.60	39.92±51.55	29.70±35.98	11.29±5.72
Temps en passar al compartiment fosc el 2on dia, femelles (T-2 en segons)	48.98±17.36	51.78±14.52	56.40±4.37	47.36±18.72	51.76±15.97	53.27±14.96
Defecacions en T-1, femelles	1.70±1.70	0.50±0.52	1.00±1.77	0.60±1.07	1.25±2.70	0.20±0.63
Defecacions en T-2, femelles	0.42±0.67	0.58±0.67	1.00±1.07	1.40±1.78	0.58±0.90	0.70±0.95

Els resultats estan expressats en mitjanes ± desviacions estàndard.

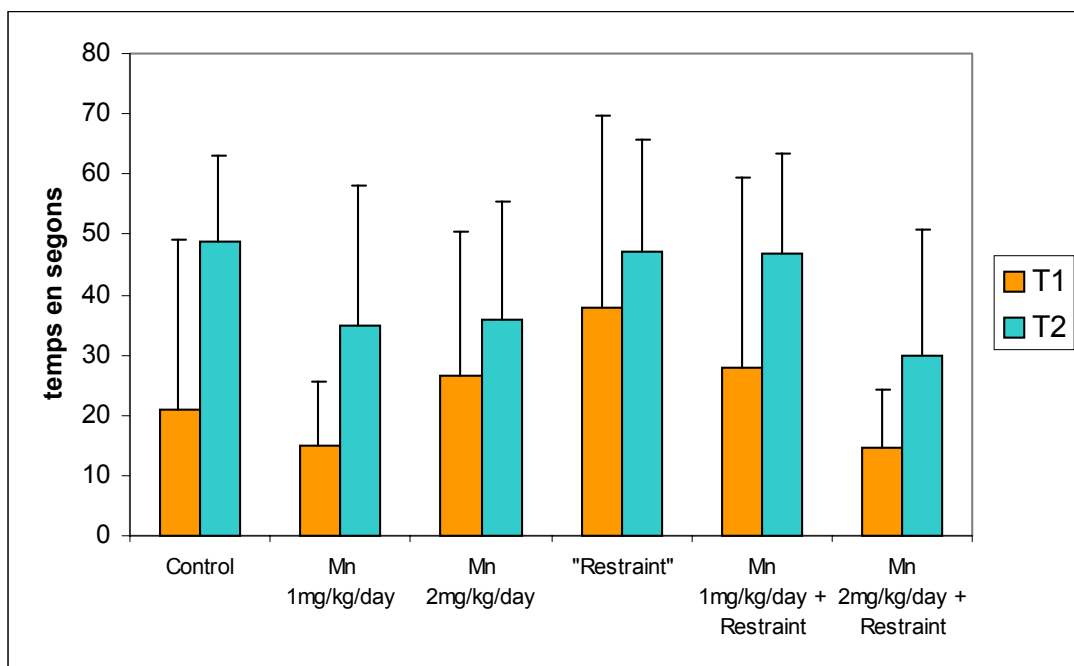


Figura IV.20. Evitació Passiva en mascles. Mitjanes de T1 (latència al primer dia en passar al compartiment fosc) i T2 (latència al segon dia en passar al compartiment fosc).

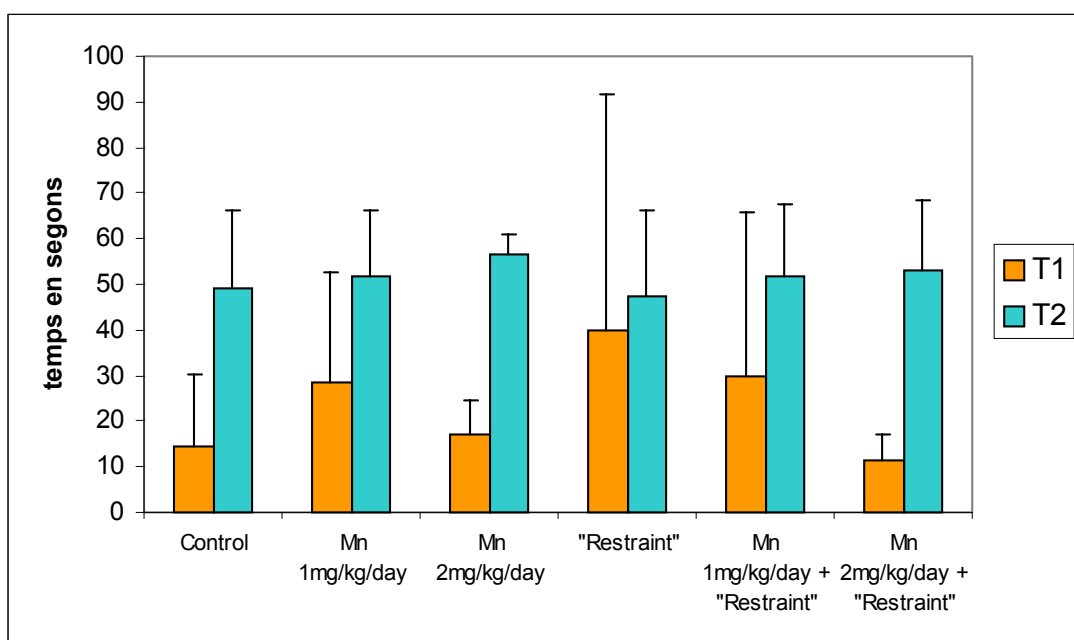


Figura IV.21. Evitació Passiva en femelles. Mitjanes de T1 (latència al primer dia en passar al compartiment fosc) i T2 (latència al segon dia en passar al compartiment fosc).

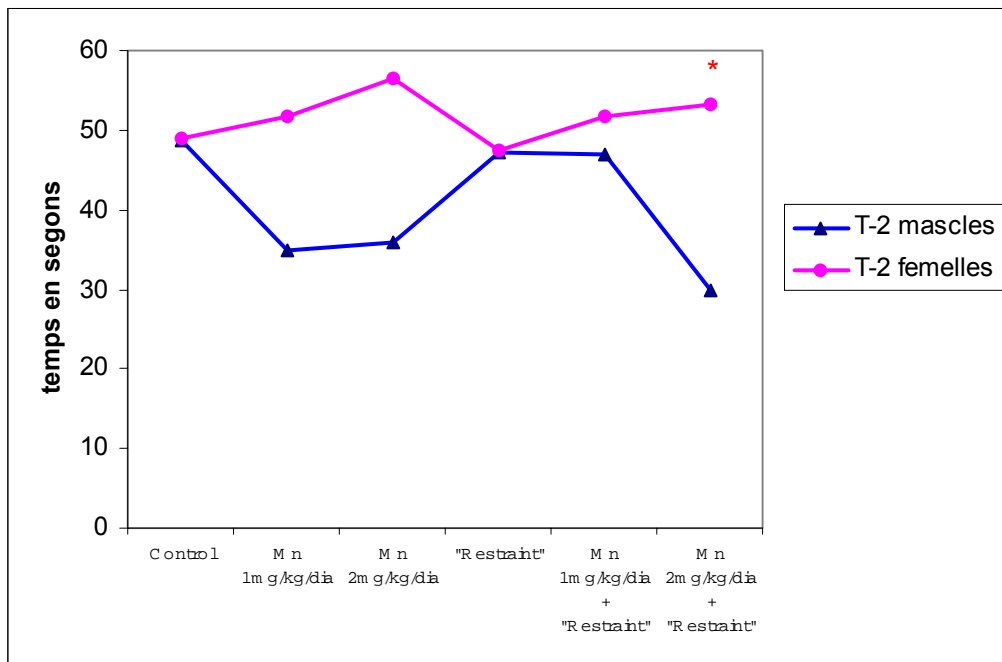


Figura IV.22. Mitjanes dels temps per sexes que triguen en passar al compartiment fosc el segon dia.

S'observen diferències significatives entre sexes en la latència al segon dia (T2) en els diferents grups de tractament (*figura IV.22*).

































































































































































