

I. Materials

1.1 Animals d'experimentació

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

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

1.2 Reactius

- **Per al tractament**

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

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

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

- **Per a l'estudi anatomopatològic**

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

- **Per a les digestions**

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

- **Per al sacrifici dels animals**

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

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

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

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

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

1.3 Material específic

a. Gàbies d'immobilització

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

b. Aparells per la realització dels diferents tests als animals

- *Mesurador de força*. Per mesurar la força a les extremitats anteriors de les rates es va utilitzar un mesurador de força *Grip Strength Meter* (Ugo Basile, Itàlia). L'animal es posa sobre una base plana on al davant té un triangle metàl·lic o agafador, connectat a un transductor de força. Quan estirem l'animal per la cua, aquest agafa instintivament el triangle metàl·lic fins que la força que fem nosaltres sobrepassa la força de l'animal per agafar-se.

Un cop l'animal deixa el triangle metàl·lic, l'amplificador guarda el valor més alt de força de l'animal.

- *Evitació passiva (Passive avoidance)*. L'aparell d'evitació passiva consisteix en una caixa fabricada amb *perspex* i dividida en dues seccions: el compartiment de sortida i el d'escapament. El compartiment de sortida és blanc i il·luminat (bombeta de 24 V – 10 W). El compartiment d'escapament és fosc. Entre els dos compartiments hi ha una porta de guillotina. La base és una reixeta, a través de la qual s'administra el xoc elèctric a l'animal quan aquest canvia del compartiment clar al fosc. Les dimensions de l'aparell per a rates són de 40x20x20cm (ref. 7550). Aquest està connectat a un controlador que registra la latència d'entrada de l'animal al compartiment fosc, en el qual es pot fixar el temps que passa entre que introduïm l'animal i s'obre la porta, la duració i la intensitat del xoc, a més del temps màxim per a cada intent (Passive Avoidance Apparatus, Panlab SL, Ugo Basile, Itàlia).
- *Camp obert (Open field)*. Per a la realització del test del camp obert, el recinte utilitzat per col·locar l'animal és de fusta plastificada, amb una superfície de 80x80cm per a rates amb unes parets d'alçada de 47cm i obert per la part superior.

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

- *Laberint d'aigua de Morris (Water maze)*. Per la realització de la prova del laberint d'aigua, descrit per primera vegada per Morris (Morris, 1984), el recinte és una piscina de 160 cm de diàmetre, amb una paret de 60 cm d'alçada. Dins de la piscina i submergida a 1 cm del nivell de l'aigua, hi ha dipositada una plataforma cilíndrica de 12 cm de diàmetre i 20 cm d'alçada de plàstic transparent. Les parets que envolten la piscina són de rajola blanca amb senyals geomètrics diferents a cadascuna d'elles. La temperatura de l'aigua durant la prova era de $23 \pm 2^\circ$ C. A 2,5 metres de la base i centrada, es troba col·locada la càmera per al registre d'imatges.

Per al registre de totes les accions es va utilitzar l'equip Ethovision, versió 1.70, de Noldus Technology per a PC, i una càmera model Sony CCD-IRIS, connectada a un vídeo VHS model Panasonic AG-5700. Aquest equip és un sistema integrat de gravació en vídeo, anàlisi de moviments i reconeixement de patrons de conducta.

c. Altres materials i instruments

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

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

II. Metodologia

2.1 Aparellament i identificació dels animals

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

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

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

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

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

2.2 Preparació i administració de l'urani

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

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

2.3 Estudis amb els mascles adults

2.3.1 Tests d'aprenentatge (valoració conductual)

- *Camp obert (Open field)*. Aquesta prova permet estudiar diferents paràmetres de l'activitat motora dels animals. Es valora la distància total recorreguda (activitat horitzontal) i el nombre d'aixecaments realitzats (activitat vertical) en períodes de temps determinats. L'animal es col·loca en el centre del recinte sota la llum que l'il·lumina. A partir d'aquest moment comença l'observació de l'animal durant quinze minuts. En els nostres estudis registrem la distància recorreguda com a índex d'activitat horitzontal i el nombre d'aixecaments com a índex d'activitat vertical durant quinze minuts, que subdividim en períodes de cinc minuts per a la valoració de l'habitació.

- *Evitació passiva (Passive avoidance)*. Amb aquest test es pot valorar la memòria recent dels animals. El rosegador se situa en el compartiment clar o de sortida, i després d'un període variable (60 segons, en què considerem que hi ha habituació, o 30 segons sense habituació), s'obre la porta de separació entre els compartiments, de manera que l'animal pot accedir al compartiment fosc (pel qual es sent atret per la seva condició d'animal nocturn). Transcorreguts alguns segons, l'animal entra de forma espontània al compartiment fosc. El temps que tarda a accedir al compartiment fosc es coneix com a període de latència d'adquisició (T1). Un cop dintre, un segon després i de forma automàtica, es tanca la porta de separació i es produeix una descàrrega d'1 mA/3s. Transcorregudes 24 hores, se sotmet l'animal a la mateixa prova, però sense que es produeixi descàrrega elèctrica. Es va fer una valoració de la memòria calculant el temps que tardava l'animal a accedir al compartiment fosc, latència de record (T2) (Thorne i col·ls., 1987; Roozendaal i McGaugh, 1997; Colomina i col·ls., 2002). El període de latència és més gran en els animals que recorden que l'accés al compartiment fosc suposa una situació aversiva (descàrrega elèctrica), en la fase de record. En aquest estudi, el període de latència es va limitar a 5 minuts, transcorreguts els quals es considera que l'animal ha après la tasca de forma significativa.

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

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

Per valorar l'aprenentatge, cada animal té cinc intents o *trials* cada dia durant tres dies consecutius. Al quart dia té un intent sense plataforma (també anomenat *trial probe*), en què valorem el temps que l'animal neda en el quadrant on estava anteriorment situada la plataforma i la distància recorreguda dins d'aquest quadrant.

En els trials amb plataforma mesurem el temps que tarden els animals a trobar la plataforma, la velocitat a què neden i la distància recorreguda en cada intent fins que la troben.

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

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

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

2.3.2 Efectes sobre la reproducció

- *Valoració de la mobilitat de l'esperma*

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

- *Anàlisi morfològica de l'esperma*

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

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

- *Avaluació de la producció d'esperma*

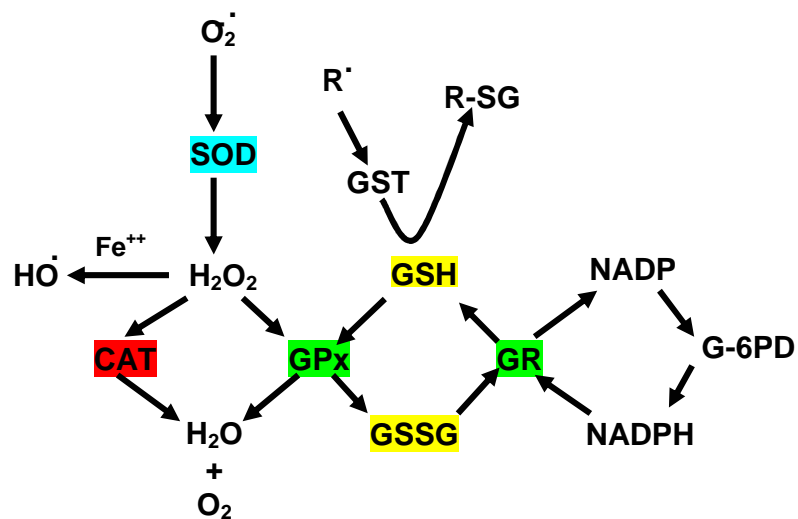
Un cop extrets els epidídim, es va prendre una fracció de l'epidídim dret i, després de pesar-la, immediatament es va congelar a -20° C fins al moment de la observació. Per tal d'avaluar la producció de l'esperma, es va descongelar la mostra a temperatura ambient i es va homogeneïtzar amb 0,5 ml de la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

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

2.3.3 Avaluació de la peroxidació lipídica i sistemes antioxidants

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

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



- *Avaluació de la peroxidació lipídica*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

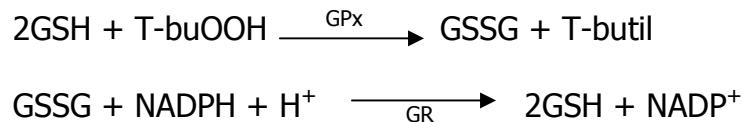
Es mesura amb el mateix mètode que l'apartat anterior (Hissin i Hilf, 1976).

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

- *Determinació de la catalasa (CAT)*

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

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

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

- *Determinació de la superòxid dismutasa (SOD)*

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

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

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

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

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

- *Determinació de la concentració de proteïnes*

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

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

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

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

2.3.4 Valoració anatomopatològica

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

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

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

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

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

Es va agafar 0,5 g de teixit per a l'anàlisi. S'apuntava el pes de cada mostra i es col·locaven en tubs de vidre Pyrex, degudament identificats. Es posaven en cada tub 2 ml d'àcid nítric al 65% i es deixaven en predigestió a temperatura ambient aproximadament 24 hores.

Un cop finalitzada la predigestió, es digeria el contingut a 80° C, un temps variable (aproximadament 10 hores), fins que el teixit estava dissolt. A continuació, es pujava la temperatura fins a 135° C per facilitar l'evaporació, a fi de deixar aproximadament 0,5 ml de volum de mostra. A continuació, es diluïa fins a un volum total de 10 ml amb aigua bidestil·lada (MQ).

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

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

2.4 Estudis amb les cries

2.4.1 Toxicitat embríofetal

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

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

2.4.2 Valoració del desenvolupament

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

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

Amb aquests paràmetres es va calcular l'índex de viabilitat (nombre de cries vives al dia 4/nombre de cries vives al naixement) i l'índex de lactància (nombre de cries vives al dia 21/nombre de cries vives al dia 4).

- *Sexe*
- *Pes de cada cria*

De cada ventrada, sempre que va ser possible, i de forma aleatòria, es van deixar amb la mare quatre mascles i quatre femelles. A aquestes vuit cries es va seguir controlant el pes els dies 4, 12 i 21. A banda del control del pes, es va valorar el desenvolupament físic i funcional durant el període postnatal, i es van controlar alguns paràmetres ja descrits per Fox el 1965 i ampliat per altres autors (Altman i Sudarshan, 1975; Suter i Schön, 1985; Draski i col·ls., 1989; Rivera i col·ls., 1990; Hass i col·ls., 1995; Kishi i col·ls., 1995; Bignami, 1996; Colomina i col·ls., 1999; Torrente i col·ls., 2002).

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

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

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

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

2.4.3 Tests d'aprenentatge (valoració conductual)

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

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

2.5 Tractament estadístic de les dades

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

Per evitar atribuir al tractament diferències degudes a l'atzar es va treballar amb un nivell de significació del 5% ($p < 0,05$). D'aquesta manera, quan s'afirma que existeixen diferències entre els grups de tractament, es fa amb una probabilitat d'encert del 95%. Es van calcular, en primer lloc, els descriptius de totes les variables (mitjanes i desviacions estàndard). Quan les dades estudiades seguien una distribució normal, es va aplicar el test de Levene per avaluar si existia homogeneïtat en la variància.

Quan s'acceptava la hipòtesi nul·la, és a dir, que no existien diferències entre les dades, volia dir que estàvem davant d'unes dades homogènies. S'aplicava llavors una ANOVA (anàlisi de variància). En els casos en què l'ANOVA donava diferències significatives entre els grups, es feien proves de comparacions múltiples entre grups o proves *post-hoc*: Tuckey.

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

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