

“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 MnCl₂ 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'adultesa 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 (Darnaüdäery 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 elicitador, 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.