GABRIELA RODRIGUES

**Estudo dos efeitos toxicológicos em ratos Wistar alimentados
com ração contendo Urânio**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ICB, para a obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: João Dias de Toledo Arruda
Neto

Colaboradores: Sílvia Regina Kleeb
Rosa M. Rodrigues Pereira

São Paulo
2010

RESUMO

RODRIGUES, G. **Estudo dos efeitos toxicológicos em ratos Wistar alimentados com ração contendo Urânio**. 2010 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O urânio (U) é um elemento tóxico radioativo encontrado na natureza, normalmente presente na água e nos alimentos e acumula-se preferencialmente em ossos. Nestes, a medula óssea constitui o alvo com o maior risco radiobiológico. Foram utilizados 60 ratos Wistar recém desmamados, com vinte e dois dias de vida. Destes, trinta e cinco foram tratados com ração suplementada de 50ppm (parte por milhão) de Nitrato de Uranila e vinte e cinco foram mantidos como controle. Os animais tratados foram separados em seis grupos com cinco animais cada e os grupos controle com três animais. Foi feita a eutanásia dos 5 animais de cada grupo alimentado com urânio e 3 animais de cada grupo de controle com intervalo de tempo de 3 e 4 dias para avaliar alterações histopatológicas, hematológicas, na densidade mineral óssea e medir o teor de urânio acumulado em ossos, em função do tempo, utilizando a técnica de registro de traços de fissão SSNTD (Solid State Nuclear Track Detector). Nas avaliações histopatológicas foi observada congestão, fibrose e necrose hepática, degeneração vacuolar e desarranjo cordonal dos hepatócitos. Essas alterações iniciaram-se em animais alimentados durante três dias com ração contendo U e se intensificaram nos animais tratados durante onze dias, sugerindo que tenha ocorrido combinação de efeitos toxicológicos e radiobiológicos. Foi observada degeneração vacuolar, cilindros hialinos, fibrose e necrose nos rins dos animais alimentados com ração suplementada de U, a partir de quatorze dias de alimentação, decorrentes da nefrotoxicidade do Nitrato de Uranila. Foi observado que não ocorre alteração da densidade mineral óssea no curto prazo; porém, os animais tratados durante 21 e 28 dias, ou seja, expostos ao U por período mais longo, tiveram a densidade mineral óssea diminuída. Ocorreu substancial acúmulo de urânio nos ossos, onde foi observado $1,139 \pm 0,057$ ppm em ossos e $0,705 \pm 0,092$ ppm em dentes. Os animais dos grupos controle apresentaram teor de urânio praticamente constante no decorrer do estudo. Não foi observada alteração do teor de urânio em ração comercial.

Palavras-chave: ratos Wistar, Urânio, efeitos toxicológicos, efeitos radiobiológicos, Urânio em Ossos, detectores a traços

ABSTRACT

RODRIGUES, G. **Study of toxicological effects in Wistar rats fed with uranium.** 2010. 81p. Master thesis (Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Uranium (U) is a radioactive toxic element found in the environment, naturally present in water and food, with preference for accumulation in bone. In the latter, marrow is the target with the highest radiobiological risk. It was carried out a study with sixty Wistar rats, twenty two days old, starting at the post weaning period. From this total, thirty five animals fed with chow containing Uranyl Nitrate at a concentration of 50 ppm (parts per million) were selected as the treated group, while the remaining twenty five were the control group. Treated animals were divided into six groups with five animals each plus six control groups with three animals each. Five animals of the treated group and three of the control group were sacrificed at intervals of four days to observe histopathologic, hematologic, and bone mineral density (BMD) alterations, as well as to measure the uranium content in bone as function of time, using the Solid State Nuclear Track Detector technique. It was observed congestion, vacuolar degeneration, hepatocytes misalignment, fibrosis and necrosis in liver. These alterations were initiated in treated animals fed for three days with diets containing U and intensified in the animals treated for eleven days, suggesting the occurrence of an intertwining between radiobiological and toxicological effects. It was also observed vacuolar degeneration, hyaline cylinders, fibrosis and necrosis in the kidneys of the treated animals, all initiated after fourteen days of treatment, and these effects were attributed to the nephrotoxic character of the Uranyl Nitrate. It was found out that the BMD was not altered in the short range term of treatment, that is, treatments of twenty-one and twenty-eight days, but appreciably reduced in the long range term. There was substantial accumulation of uranium in bones and teeth, where it was measured concentrations of 1.139 ± 0.057 ppm and 0.705 ± 0.092 ppm, respectively. The uranium concentration in the bones of animals of the control group were low and approximately constant.

Key-words: Wistar rats, Uranium, toxicological effects, radiobiological effects, Uranium in bones, track detectors

1 INTRODUÇÃO

O urânio é um elemento químico encontrado na natureza sob forma de mineral, em rochas, solos, água superficial e subterrânea, no ar, plantas e em animais. É um dos elementos tóxicos radioativos mais pesados, além de ser um dos principais precursores de radionuclídeos e natural emissor de partículas alfa.

Rochas fosfáticas que são fontes de fósforo usadas na agropecuária como fertilizantes de liberação lenta e suplementos alimentares possuem o urânio como constituinte, a concentração de urânio presente em rochas fosfáticas brasileiras varia de 20 a 200 ppm (partes por milhão). Os humanos ingerem urânio indiretamente ao consumirem os produtos suplementados com essa fonte (AVELAR et al., 2007).

Com o desenvolvimento da indústria nuclear, além do urânio natural originou-se uma nova fonte de urânio conhecida como urânio empobrecido, que é considerado resíduo radioativo de baixa atividade.

Desde 1991 o urânio empobrecido na forma metálica tem sido utilizado militarmente para fabricar cápsulas de munição anti-tanque. No impacto do projétil ocorre liberação de aerossóis constituídos por partículas de óxidos de urânio podendo contaminar água, ar, solo e animais. Essas partículas atravessam facilmente o trato respiratório. As formas mais importantes de contato com o urânio é pela inalação ou ingestão. Quando acumulado em órgãos leva mais de dez anos para ser eliminado do organismo, sendo assim uma questão preocupante em termos radiológicos (BEM, 2004).

Uma vez na corrente sanguínea, os compostos de urânio são rapidamente distribuídos pelo organismo humano. O acúmulo de urânio é mais importante no osso, seguindo ao rim e posteriormente ao fígado, com relação 131:15, 5:1 respectivamente (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 1978).

O estudo da incorporação de urânio em órgãos foi descrito na literatura através de experimentos com animais adultos e em humanos. Tais experiências envolvem situações de incorporação aguda, bem como altas doses de radiação, e seus resultados são usados para estudos de avaliação de risco à saúde através de extrapolações para baixas doses ou para incorporações crônicas. Contudo, na fase de crescimento de um organismo altera-se a absorção e distribuição de qualquer substância. Surgiu então a necessidade de se saber ao certo as etapas dessa incorporação e seus efeitos em função

do tempo. E é justamente nessa fase de crescimento que existe uma lacuna científica sobre a incorporação do urânio (ARRUDA NETO et al., 2001).

Como o urânio está normalmente presente, em pequenas quantidades na água e nos alimentos e acumula-se preferencialmente em ossos, a motivação deste trabalho é verificar este acúmulo durante as diversas fases do desenvolvimento de ratos Wistar. Para tanto, o atual estudo analisará a distribuição de urânio nos ossos em decorrência da ingestão crônica deste e então serão avaliados seus efeitos nos órgãos através de técnicas histopatológicas. O urânio será misturado à ração de ratos, sendo oferecido a partir do desmame, animais com 22 dias, até a fase adulta, animais com 50 dias de vida, estabelecendo-se a biocinética do urânio de acordo com o crescimento desses animais.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que as lesões histopatológicas foram observadas somente nos animais tratados, intensificando-se e tornando-se crônica ao longo da vida do animal, indicando possivelmente processos tóxicológicos causados pela ingestão de urânio.

Esses resultados permitiram concluir que a ingestão crônica de urânio, desde o desmame dos animais:

- 1) Não altera (não diminui) a densidade mineral óssea em curto prazo de contaminação, mas que essa alteração pode ser observada em animais expostos ao U por um período mais longo;
- 2) Ocasiona discreta degeneração renal em animais alimentados durante quatorze dias com ração contendo urânio, intensificando-se com o tempo de alimentação. Essas lesões são decorrentes do caráter nefrotóxico do Nitrato de Urânio;
- 3) Resulta em lesões hepáticas, reversíveis no início (com até 11 dias de alimentação) e irreversíveis (cirrose) a partir de 14 dias de alimentação. Alterações na função hepática também foram observadas (ALT e Fosfatase Alcalina). Essas alterações patológicas sugerem que tenha ocorrido uma combinação de efeitos tóxicológicos e radiobiológicos;
- 4) Leva a um substancial acúmulo de urânio nos ossos, tornando esse material disponível para o organismo do animal como um todo. Verifica-se que há uma bioacumulação progressiva de urânio em amostras de ossos de ratos Wistar quando alimentados, por diferentes períodos de tempo, com ração contaminada com 50 ppm de urânio;
- 5) Acumula-se preferencialmente em osso, e uma menor parte acumula-se em dentes.

COMENTÁRIOS FINAIS

Observou-se que não há uma presença significativa de urânio na ração comum utilizada para a alimentação animal, em conformidade com os resultados obtidos para o

grupo controle. Neste grupo, não foi observada uma diferença apreciável entre os teores de urânio nas amostras de ossos, para os animais alimentados apenas com ração comum.

Observou-se que as lesões hepáticas se intensificaram com o tempo de consumo de urânio, indicando que o consumo prolongado desse metal em pequenas doses causa lesão hepática crônica, culminando com cirrose.

Verificou-se que as lesões renais surgiram após as lesões hepáticas, sugerindo que o Nitrato de Uranila causa lesão tóxica inicialmente em fígado e posteriormente em rim.

A bioacumulação crônica de urânio se comportou como uma função sigmoideal, observada em curvas de crescimento do esqueleto, indicando que o U acumula-se como se fosse o cálcio.

Essa bioacumulação pode causar graves danos ao ser humano. O prejuízo à saúde da população se dá em virtude das características de absorção pelo organismo e dos efeitos radiotóxicos do referido metal que, normalmente, se apresenta em quantidades de traços nos diversos compartimentos ambientais da natureza.

Finalmente, o presente estudo é o primeiro a demonstrar a ocorrência desses efeitos radiobiológicos e toxicológicos decorrentes da ingestão prolongada de urânio.

REFERÊNCIAS

- AGUDO, E.D. Materiais radioativos e radiações ionizantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 474p.
- ALPEN, E.L. **Radiation biophysics**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990. 392 p.
- ARRUDA NETO, J. D. T. et al. Concentrations of uranium in animal feed supplements: measurements and dose estimates. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 221, p. 97-104, 1997.
- ARRUDA NETO, J. D. T. et al. Transfer coefficient measurements of uranium to the organs of Wistar rats, as a function of the uranium content in the food. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 54, p. 947-956, 2001.
- ARRUDA NETO, J. D. T. et al. Long-term accumulation and microdistribution in the bone and marrow of beagle dog. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 80, n. 8, p. 567-575, 2004.
- ARRUDA NETO, J. D. T. et al. Long-term accumulation of uranium in bones of wistar rats as a function of intake dosages. **Radiat. Prot. Dosimetry**, v. 112, n. 3, p. 385-393, 2004.
- ARRUDA NETO, J. D. T. et al. Study of environmental burden of lead in children using teeth as bioindicator. **Environ. Int.**, v. 35, p. 614-618, 2009.
- AVELAR, A.C., et al. Contribuição dos fertilizantes agrícolas para a dispersão de urânio no meio ambiente. **Rev. Saúde Ambient.**, v. 8, n. 2, p. 37-42, 2007.
- BEM, H.; BOU-RABEE, F. Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. **Environ. Int.**, v. 30, n.1, p. 123-134, 2004.
- BITELLI, T. **Física e dosimetria das radiações**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 422 p.
- CHEIDA, J. E. **Biologia integrada**. São Paulo: FTD, 2002. 224 p.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **DOU**, v. 53, n. 1, p. 58-63, 2005.
- DICKSON, B.L.; SCOTT, K.M. Interpretation of aerial gamma-ray surveys-adding the geochemical factors. **J. Aust. Geol. Geophys.**, v. 17 n.2, p. 187-200, 1997.

FERREIRA, C. P. et al. **Bioquímica básica**. São Paulo: Luana, 1997. 363 p.
FLAMENBAUM, W. et al. Uranyl nitrate-induced acute renal failure in the rat: micropuncture and renal hemodynamic studies. **Kidney Int.**, v. 6, p. 408-418, 1974.

FREIRE-MAIA, N. **Radiogenética humana**. São Paulo: Edgard Blucher, 1972. 354 p.

GARCIA, F. et al. Uranium levels in the diet of São Paulo city residents. **Environ. Int.**, v.32, p. 697-703, 2006.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2000 p.

GIGLIO, M. J. et al. The mechanism of the transient depression of the erythropoietic rate induced in the rat by a single injection of uranyl nitrate. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 99, p. 260-265, 1989.

GUÉGUEN, Y. et al. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. **Arch. Toxicol.**, v. 80, p. 187-195, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 546 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Limits for intakes of radionuclides by workers. Oxford: Pergamon Press. v. 30, n. 1, 1978.

JONES, T.C ; HUNT, R.D. ; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. London: Academic Press, 2000. 756 p.

LIMA, F. R. et al. Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of phosphorus in animal nutrition. **Poult. Sci.**, v. 74, p. 1659-1670, 1995.

MURRAY, L. R. **Nuclear energy**. 3. ed. New York: Pergamon Press, 1988. 392 p.

NELSON, D.R. et al. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biol.**, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

PASANEN, M. et al. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. **Environ. Res.**, v. 70, p. 126-133, 1995.

PAVAN, C. et al. **A energia atômica e o futuro do homem**. 3.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1968. 539 p.

PENNA FRANCA, E. et al. Radioactivity in the diet in high background áreas of Brazil. **Health Physics**, v.19, p.657-662, 1970.

PFEFFER, I. J.; NIR, S. **Modern physics**. London: Imperial College Press. 2000. 544 p.

POUNDS, J. G.; LONG, G. J.; ROSEN, J. F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. **Environ. Health Perspect.**, v. 91, p. 17-32, 1991.

SANÍN, L. H. et al. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. **Salud Pública (México)**, v. 40, n. 4, p. 359-368, 1998.

SEBASTIAN, S. et al. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 75, p. 1516-1523, 1996.

SWENSON, M. J. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 902 p.

WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. Radiation biology. In: WHITE, C.S.; PHAROAH, M.J. **Oral radiology: principles and interpretation**. St. Louis: Mosby, 1999. p. 22-40.

YAMAZAKI, I. M.; GERALDO, L. P. Uranium content in phosphate fertilizers commercially produced in Brazil. **Appl. Radiat.Isot.**, v. 59, p. 133-136, 2003.

ZAMORA, M. L. et al. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. **Toxicol. Sci.**, v. 43, p. 68-77, 1998.