

1. Efectes neuroconductuals derivats de l'exposició oral crònica a urani i estrès en rates mascle adultes

L'urani empobrit és un element potencialment tòxic des del punt de vista químic i radiològic. Els efectes per a la salut depenen de la naturalesa física i química de l'urani al qual l'individu hagi estat exposat, així com de la concentració i durada de l'exposició.

S'han realitzat diferents estudis que avaluen els efectes d'aquest metall. Els resultats obtinguts no són unànimes. Recentment Briner i Murray (2005) han posat de manifest que el DU és una toxina que traspasa la barrera hematoencefàlica i s'acumula a l'SNC, on s'han observat canvis electrofisiològics que provoquen alteracions en la conducta de rates mascle (Pellmar i col·ls., 1999b; McClain i col·ls., 2001). Briner (2002) va trobar que l'exposició a DU en l'aigua de beguda altera el desenvolupament i el comportament de ratolins i de rates. En canvi en aquest treball només hem trobat alteracions puntuals en algun grup dels exposats a l'urani. No s'ha trobat cap empitjorament ni en l'activitat motora (camp obert), ni en l'aprenentatge (laberint d'aigua), ni en la memòria recent (*passive avoidance*).

McDiarmid i col·ls. (2004) han fet un seguiment mèdic sobre els efectes del DU en veterans de la guerra del Golf deu anys després de l'exposició. D'acord amb els nostres resultats tampoc han observat diferències estadístiques entre els grups exposats a baixes i altes dosis d'urani sobre els paràmetres neurocognitius realitzats.

A més a més de l'estudi dels efectes de l'urani hem avaluat la influència de l'estrès per immobilització sobre aquests. L'estrès crònic indueix efectes deleteris en l'hipocamp (Sousa i col·ls., 2000). L'hipocamp està implicat en la memòria espacial i l'eix hipotalamohipofític adrenal, en el cicle dia-nit i l'ansietat. Els efectes neurològics observats després de l'exposició crònica a l'urani són similars als produïts per l'estrès crònic (Houpert i col·ls., 2005). S'ha vist que l'estrès crònic induïa un perfil ansiogènic (Weiss i col·ls., 2004) de la mateixa manera que fa l'urani. A diferència d'aquests treballs, en l'actual estudi, l'estrès no ha potenciat els efectes de l'urani per a cap dels grups d'animals exposats. Aquest fet també s'ha observat en estudis realitzats amb altres metalls com l'alumini i el manganès (Torrente i col·ls., 2005).

2. Efectes sobre la reproducció en rates mascle adultes tractades amb urani i estrès

Fins fa pocs anys, s'ha prestat poca atenció als possibles efectes adversos de l'exposició a l'urani (incloent-hi DU) sobre la reproducció humana. No ha estat fins l'inici de la guerra del Golf que s'han dut a terme estudis més exhaustius sobre la toxicitat d'aquest metall.

En un estudi sobre la ràtio del sexe en la descendència d'homes miners es va veure més descendència femenina de l'esperada, la qual cosa suggeria una possible alteració en l'esperma (Müller i col·ls., 1967). També s'ha descrit una disfunció del sistema endocrí-gonadal, amb una reducció significativa dels nivells de testosterona, en miners de Namíbia, comparats amb individus sense relació ocupacional amb la mina (Zaire i col·ls., 1997).

En aquest treball hem avaluat diferents paràmetres reproductors: concentració, funcionalitat i morfologia de l'esperma de rates mascle exposades a urani i estrès. S'han trobat alteracions en la morfologia i la producció d'espermatozoides com a conseqüència del tractament, però independents de la dosi d'urani. Al igual que en els resultats obtinguts per Llobet i col·ls. (1991), la funció testicular/espermatogènica no s'ha afectat per a cap dosi d'AUD. Això s'ha fet evident per als pesos normals dels testicles i epidídimis i una espermatogènesi normal. La principal afectació trobada és una disminució significativa (no relacionada amb la dosi) en el percentatge de femelles prenyades. Estudis dels mateixos

paràmetres en humans (McDiarmid, 2001) han mostrat unes característiques seminals normals, sense evidències clíniques que afectessin la fertilitat de la persona.

A diferència d'estudis previs realitzats (Llobet i col·ls., 1991; McDiarmid i col·ls., 2004) també hem avaluat la possible interacció de l'estrès sobre els efectes d'aquest metall. En aquest cas, s'ha observat que per a les dosis i període d'exposició establert, l'estrès no ha modificat cap dels paràmetres reproductors avaluats. Recentment s'ha demostrat que l'estrès matern augmenta la toxicitat induïda per l'urani, sembla ser però, que no provoca els mateixos efectes sobre la fertilitat en els mascles (Colomina i col·ls., 1998; Albina i col·ls., 2003; Domingo i col·ls., 2004).

3. Efectes de l'urani i l'estrès sobre diferents òrgans diana. Avaluació de l'estat antioxidant en aquests òrgans

En determinar la concentració d'urani als diferents òrgans (ronyó, testicles i cervell) hem comprovat que efectivament s'acumula i, a més, els nivells més alts es corresponen a les dosis més elevades emprades (40 mg/kg/dia). A més, i de forma significativa, l'òrgan amb més contingut d'urani ha estat el ronyó, seguit del cervell i el testicle. En aquests resultats no s'ha observat cap variació significativa de la concentració d'urani a causa de l'estrès. Aquest fet també s'ha observat en estudis realitzats amb altres metalls com el manganés (Chandra i col·ls., 1979; Torrente i col·ls., 2002).

Un dels efectes tòxics més descrits de l'urani és la nefrotoxicitat. Els ronyons excreten més del 90% dels components solubles de l'urani i menys d'un 1% és excretat a través de les femtes. Estudis realitzats tant amb animals (Diamond i col·ls., 1989; Gilman i col·ls., 1998a) com epidemiològics (Singh i col·ls., 1987; Kathern i col·ls., 1989) demostren que els ronyons són el primer reservori de l'urani. Tot i així, no han trobat un increment de la mortalitat en treballadors exposats al metall com a conseqüència del dany renal (Polednak i Frome, 1981; Checkoway i col·ls., 1988). Tot i que l'efecte més comú que provoca l'exposició a urani és una alteració tant dels túbuls proximals com dels glomèruls (Craft, 2004), en el present treball les alteracions més importants s'han trobat a nivell vascular. La transformació angiomasosa descrita s'ha fet més evident a les dosis d'urani més elevades (20 i 40 mg/kg/dia). Altra

alteració observada és un augment progressiu de la peroxidació lipídica renal segons augmenta la dosi d'exposició. Aquesta podria alterar la conductància iònica, fluïdesa de la membrana cel·lular o altres funcions cel·lulars (Schaich, 1992). A més hi ha una inducció de l'activitat de l'SOD a la dosi de 40 mg/kg/dia + estrès. Aquest és l'únic paràmetre renal afectat per l'estrès. L'increment en la producció dels TBARS reflexa la toxicitat cel·lular provocada per aquest metall. Possiblement les alteracions renals són la manifestació subclínica de la toxicitat provocada per l'urani. Hi ha certa ambigüitat sobre quines són les conseqüències sobre la salut d'aquestes manifestacions. D'altra banda, un estudi realitzat per Kurttio i col·ls. (2002), així com altres treballs sobre la cinètica de l'urani (WHO, 2001), descarten que els efectes de l'urani siguin acumulatius; és a dir, que tant en humans com en animals d'experimentació l'urani provoca una nefrotoxicitat reversible (Bentley i col·ls., 1985; Pavlakis i col·ls., 1996).

Respecte l'efecte de l'urani i l'estrès sobre els testicles i epidídim, l'avaluació histopatològica ha mostrat una alteració progressiva dels teixits. Hi ha alteracions tubulars i intersticials, sobretot pèrdua cel·lular, de cèl·lules de Sertoli, amb vacuolització citoplasmàtica. A diferència d'estudis previs realitzats per Llobet i col·ls. (1991), on no va ser fins la dosi de 80 mg/kg/dia que es va observar la vacuolització, en aquest treball les alteracions testiculars s'han detectat a dosis més baixes.

En relació a l'estat antioxidant, l'urani ha provocat una disminució significativa dels nivells testiculars de GSH i un augment força significatiu dels valors de l'SOD. A més a més, s'ha observat una disminució significativa de la GR testicular, la qual aporta GSH als espermatozoides (Gandy i col·ls., 1990; Kaneko i col·ls., 2001, 2002). Sembla ser que l'urani provoca alteracions en els valors de GSH, bé per disminució directa, bé per inhibició de la síntesi. Aquest fet, acompanyat de la disminució de l'activitat de la GR, provoca una menor activitat catalitzadora en la reducció del GSSG a GSH. El GPx, que rep electrons del GSH, i l'SOD són enzims que "segresten" ROS en els òrgans reproductors masculins (Fujii i col·ls., 2003). L'activació de l'SOD, en aquest treball és conseqüència d'un augment dels radicals lliures en aquest teixit a causa de les diferents dosis d'urani. A diferència d'altres metalls, com el cadmi i l'arsènic, la peroxidació lipídica en aquest teixit no és significativa. L'estrès no ha provocat cap alteració significativa d'aquests paràmetres. En cap cas s'ha apreciat una interacció entre l'estrès i l'urani.

A diferència del que succeeix al tracte reproductor, a les diferents fraccions del cervell s'observa una inducció de la peroxidació lipídica a causa de l'exposició a l'urani. Aquests resultats segueixen la línia dels efectes obtinguts per Briner i Davis (2002) en ratolins. En el present treball s'han trobat correlacions positives entre el contingut d'urani i els TBARS, tant en l'escorça com al cerebel. No obstant això, i discrepant resultats obtinguts per Briner i Murray (2005) en dues setmanes

d'exposició, no s'ha trobat cap correlació entre la peroxidació lipídica observada al cervell i l'activitat motora dels animals exposats durant tres mesos. La resta de sistemes antioxidants estudiats han mostrat pautes comunes en les tres regions d'estudi. La GR disminueix de forma significativa en la majoria dels teixits. S'ha descrit que l'estrès crònic per immobilització disminueix els nivells de GSH (Liu i col·ls., 1996; Madrigal i col·ls., 2001). No obstant això, en aquest treball, no hem apreciat cap alteració addicional a la obtinguda pel metall. A l'hipocamp també s'ha apreciat una correlació positiva entre el contingut d'urani i l'activitat de la SOD i la CAT, el que demostra clarament que l'augment de l'activitat antioxidant és la conseqüència de l'excés d'oxidació en un intent de restaurar parcialment l'homeostàsia cel·lular alterada com a conseqüència de l'exposició a l'urani. Aquests efectes també s'han observat amb altres metalls com l'alumini (Gómez i col·ls., 2005). L'activació diferenciada observada del sistema antioxidant en el cervell, probablement ve determinada per una vulnerabilitat d'aquest cap al dany oxidatiu, específica de cada regió (Kovacs i col·ls., 1996; Kaushik i Kaur, 2003).

4. Efectes tòxics embriofetals per l'exposició prenatal a urani i estrès, en rates mascle

En l'estudi realitzat per avaluar els efectes embriofetals per exposició a l'urani, no s'han observat diferències significatives en el nombre d'implantacions no viables, pes de l'úter gràvid o nombre d'implantacions per ventrada entre els animals exposats o no a l'urani. Les diferències entre grups de tractament han estat mínimes. Aquests resultats concorden amb un estudi previ realitzat amb ratolins (Llobet i col·ls., 1991) també exposats a urani a través de l'aigua de beguda. No obstant això, altres estudis on l'urani ha estat administrat a través de sonda intragàtrica (*gavage*) han mostrat signes d'embriofetalitat a la dosi de 25 mg/kg/dia (Paternain i col·ls., 1989).

Estudis realitzats per valorar la influència de l'estrès matern suggereixen que la immobilització pot augmentar la toxicitat induïda pel metall i afectar el desenvolupament postnatal i la conducta de les cries especialment a les dosis que són també tòxiques per a les mares (Torrente i col·ls., 2005). En el present estudi no s'han observat influències evidents de l'estrès en cap dels paràmetres avaluats. És evident que són molt diferents els efectes embriofetals provocats causats per l'estrès exercit sobre mares gestants, que els obtinguts al estressar les rates mascle abans de la fecundació, ja que durant la gestació les mares gestants no són sotmeses a estrès. L'únic efecte tòxic que podríem esperar vindria donat per una alteració dels paràmetres seminals.

5. Efectes postnatsals del desenvolupament i neuroconductuals en cries de rates mascle exposades a urani i estrès

Tot i que s'han dut a terme moltes investigacions on s'ha demostrat que l'estrès matern potencia la toxicitat embriofetal a nivell del desenvolupament i de la neuroconducta, induïda per metalls tals com l'alumini, l'arsènic o metilmercuri (Colomina i col·ls., 1996, 1997, 1998), en canvi no hi han dades sobre els efectes de la interacció metall + estrès sobre cries de mascles tractats abans de l'encreuament.

En aquest estudi, l'administració d'urani no ha provocat efectes significatius en els desenvolupament físic de les cries. No s'han observat diferències en l'índex de viabilitat, l'índex de lactància, dia del desplegament del pavelló auditiu, entre d'altres. Les úniques diferències han estat en el dia de l'erupció dels incisius en les dosis més elevades d'urani + estrès.

En relació a la maduració neuromotora de les cries, no es van trobar diferències significatives en els resultats del reflex d'adreçament i força en les extremitats anteriors. Al igual que en estudis realitzats amb el manganès (Torrente i col·ls., 2002), les úniques diferències entre grups s'han trobat en la geotaxi (només en femelles), van ser aïllades i no estaven relacionades amb la dosi. En l'avaluació de la conducta de les cries, no es van trobar diferències entre grups. Només i de forma aïllada, no relacionada amb la dosi, es van observar diferències en la distància

recorreguda o el temps en el test del *Water maze* (dies 1-3) i en el temps en el *Trial Probe* (dia 4).

Els resultats d'aquests experiments, juntament amb els d'estudis previs amb altres elements (Colomina i col·ls., 1995, 1999) indiquen que la influència de l'estrès en els efectes de l'exposició prenatal als metalls sobre la toxicitat embriofetal, el desenvolupament postnatal i posterior conducta, depenen de cada element de manera específica, més que d'una influència general d'una situació comuna.

DISCUSSIÓ GLOBAL

En termes generals, els resultats obtinguts en aquest treball demostren que l'estrès no potencia els efectes provocats per l'exposició a l'urani. De fet hi ha diversos factors que influeixen tant sobre el tòxic com sobre l'estrès i que podrien contribuir a que aquests resultats no hagin estat els esperats. Un d'aquests factors és la via d'administració de l'urani. En aquest treball la via d'elecció ha estat la via oral per la facilitat a l'hora d'administrar-la tenint en compte que el tractament ha estat crònic. Possiblement, la via optada no és la més homogènia donat que el volum d'aigua ingerit pels animals no és el mateix i per tant, la quantitat d'urani que reben tampoc és idèntica. També s'ha de tenir en compte que les rates estan engabiades de dos en dos de forma que no es pot discriminar la diferència de beguda ingerida per cada animal. A més a més hi ha moltes variables implicades en el procés d'absorció i per tant d'incorporació del metall en l'organisme. Aquests fets podrien explicar, en part, l'elevada variabilitat obtinguda en els resultats de diversos paràmetres estudiats. Una forma de reduir aquesta variabilitat podria ser l'augment del nombre d'animals per grup. No obstant això, l'elevada variabilitat també es veuria reflectida si féssim un estudi en la població humana (Taylor i Taylor, 1997; Arfsten i col·ls., 2005).

Un altre punt de discussió seria la baixa afectació de les dosis emprades i la possibilitat d'augmentar-les. En aquest treball es va optar per les dosis de 10, 20 i 40 mg/kg/dia que es corresponen a la 1/20, 1/10 i 1/5 de la DL₅₀ (Domingo i col·ls., 1987). Aquestes dosis es van basar en

estudis previs (Paternain i col·ls., 1989; Llobet i col·ls., 1991) on es van establir els efectes adversos de l'urani sobre la reproducció i el desenvolupament. El nivell màxim contaminant (NMC) que la US EPA 2000 estableix per l'urani en l'aigua de beguda és de 30 µg/L (US EPA, 2002). Això significa que un home adult de 70 kg consumint 2L/dia d'aigua, no hauria d'ingerir més de 60 µg d'urani per dia. Tenint en compte que aquesta quantitat és equivalent a 1,42 µg AUD/kg/dia i comparant-la amb la dosi més baixa emprada en aquest estudi (10 mg/kg/dia), el marge d'exposició és de 10.000 respecte els nivells d'urani permesos en la població humana, pel que seria incomprendible un augment molt elevat de les dosis de l'estudi. De totes maneres, s'ha de tenir en consideració que l'extrapolació entre espècies és un pas susceptible en l'avaluació de riscos.

D'altra banda, un altre factor a tenir en compte és el tipus d'estrès aplicat (per immobilització). És possible que al ser un estudi a llarg termini, i al aplicar l'estrès sempre a la mateixa hora, els animals hagin desenvolupat processos adaptatius a la immobilització; és a dir, s'hagin adaptat a la situació estressant. No obstant això, tot i que els efectes obtinguts per l'estrès en el present treball no són molt accentuats, en molts dels paràmetres avaluats (pes dels animals, anormalitats histopatològiques i altres), la tendència de l'estrès ha estat potenciar els efectes de l'urani, tot i que no de forma significativa. En estudis realitzats per avaluar el model d'estrès més adient en la interacció amb metalls (immobilització, soroll, administració d'hidro cortisona), no

sembla haver-hi masses diferències entre aquests. El que s'obté és una alteració en l'activitat més accentuada en els animals sotmesos a soroll de manera intermitent i, al igual que en el present treball, hi ha una variabilitat d'afectació interindividual molt elevada (Sapolsky RM, 1994b; Torrente i col·ls., 2002). Possiblement el soroll podria semblar-se més a les situacions reals que experimenta la població humana diàriament, la qual també presenta una susceptibilitat clarament diferenciada a l'estrès.

En relació als mètodes emprats per avaluar el comportament dels animals (Camp obert, Evitació passiva i laberint d'aigua de Morris), tot i que són els més habituals, no podem descartar que aplicant altres tipus de tests (T-maze, Y-maze, braç radial, test d'habitució, test de la cinta adhesiva, test del cilindre, escala horitzontal i d'altres) podríem confirmar els resultats obtinguts i a més obtenir més informació dels processos d'afectació del comportament dels animals.

Respecte l'estat oxidatiu dels diferents teixits avaluats, les variacions observades en els nivells d'enzims antioxidants poden ser degudes a una acció directa de l'urani sobre la seva activitat o bé per una acció del metall sobre els gens que els codifiquen, provocant una activació o inhibició d'aquests. Mitjançant tècniques d'expressió gènica es podrien conèixer els mecanismes bàsics d'acció de l'urani.

Els resultats d'aquest treball poden ser la base de estudis posteriors que contribueixin a aportar més informació sobre els mecanismes d'acció de l'urani, així com els efectes provocats per la interacció de l'estrès.