

# Bioacumulació de $^{210}\text{Po}$ a nivell subcel·lular

---

Autora: López Boix, M.

Director: Dr. Jordi Garcia-Orellana

Setembre 2012

Llicenciatura ciències ambientals UAB

## Resum

---

S'ha analitzat la concentració de  $^{210}\text{Po}$  en les fraccions subcel·lulars en òrgans digestius per diferents espècies de peixos. S'ha determinat que al voltant d'un 50% del  $^{210}\text{Po}$  es concentra en la fracció de citoplasma. La fracció de citoplasma es va separar en diferents especiacions químiques on es va determinar que la fracció de proteïna era la més enriquida en  $^{210}\text{Po}$  amb un 69%. Per un altra banda s'han estudiat les concentracions de metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg) en relació a la concentració de  $^{210}\text{Po}$  on s'ha trobat una correlació entre el  $^{210}\text{Po}$  i els metalls de Fe i Hg per al teixits de les espècies estudiades. També s'han analitzat les concentracions de metalls respecte a la fracció de citoplasma i s'ha relacionat amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ . Amb metalls com Fe, Cu, Ni i Hg analitzats s'ha trobat una relació front a la concentració de  $^{210}\text{Po}$ .

Paraules clau:  $^{210}\text{Po}$ , bioacumulació, proteïnes, metal·lotioneïnes (MTs)

## Resumen

---

Se han analizado la concentración de  $^{210}\text{Po}$  en las fracciones subcelulares en órganos digestivos para diferentes especies de peces. Se ha determinado que alrededor de un 50% del  $^{210}\text{Po}$  se concentra en la fracción de citoplasma. La fracción de citoplasma se separó en diferentes especiaciones químicas en las cuales se determinó que la fracción de proteína era la más enriquecida en  $^{210}\text{Po}$  con un 69%. Por otra parte se han estudiado las concentraciones de metales (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb y Hg) en relación a la concentración de  $^{210}\text{Po}$  donde se ha encontrado una correlación entre el  $^{210}\text{Po}$  y los metales de Fe y Hg para el tejidos de las especies estudiadas. También se han analizado las concentraciones de dichos metales con respecto a la fracción de citoplasma y se ha relacionado con la concentración de  $^{210}\text{Po}$ . En metales como Fe, Cu, Ni y Hg analizados se ha encontrado una relación frente a la concentración de  $^{210}\text{Po}$ .

Palabras clave:  $^{210}\text{Po}$ , bioacumulación, proteínas, metalotioneinas (MTs)

## Abstract

---

$^{210}\text{Po}$  concentration in the subcellular fractions were analyzed in digestive organs for different fish species. It has been determined that about 50% of  $^{210}\text{Po}$  was concentrated in the cytosol fraction. The cytosol fraction was separated into different chemical speciations which determined that the protein was the most enriched of  $^{210}\text{Po}$  with a 69%. Moreover the study shows the concentrations of metals (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb and Hg) in relation to the concentration of  $^{210}\text{Po}$  where a correlation was found between  $^{210}\text{Po}$  and Fe and Hg metals for tissues of the species studied. Also the concentrations of these metals were

examined in the fraction of cytosol and has been correlated with the concentration of  $^{210}\text{Po}$ . In metals like Fe, Co, Ni and Hg analyzed a relationship was found with  $^{210}\text{Po}$  concentration.

Keywords:  $^{210}\text{Po}$ , bioaccumulation, metallothioneins (MTs).

## Introducció

---

La distribució i el comportament dels radionúclids productes de la sèrie de desintegració del  $^{238}\text{U}$  en el medi marí ha esdevingut un focus d'estudi durant quasi 50 anys, especialment el poloni ( $^{210}\text{Po}$ ) i el plom ( $^{210}\text{Pb}$ ) que han atret l'atenció dels científics a causa de la seva relativa alta concentració observada en organismes marins respecte a organismes terrestres (Cherry i Shannon, 1974).

El  $^{210}\text{Po}$  és un radionúclid d'origen natural amb un període de semidesintegració de 138 dies que es produeix per la desintegració de  $^{210}\text{Pb}$  a través del  $^{210}\text{Bi}$  de vida curta. Està considerat un alt emissor de partícules alfa i produeix la major font de dosi interna en organismes marins (Cherry i Heyraud, 1982; Carvalho, 1988).

La bioacumulació del  $^{210}\text{Po}$  es refereix al procés pel qual aquest radionúclid s'acumula en diversos teixits d'un organisme viu. El nivell al qual un radionúclid s'acumula en un organisme depèn de les seves característiques químiques i de l'especiació en aigua o sediment, així com els processos biològics, incloent les taxes d'absorció d'aigua, la dieta, l'excreció i la transformació metabòlica. Aquest procés pot estar al seu torn, influït directament per la fisiologia de l'organisme, que a l'hora és afectat per diversos factors biològics, físics i químics, com poden ser l'hàbitat, la dieta i l'espècie (Stewart et al, 2008).

Degut a la capacitat del  $^{210}\text{Po}$  a unir-se fàcilment a partícules permet que aquest radionúclid quedi unit a cèl·lules

fitoplanctòniques que posteriorment s'incorporen a l'interior de la cèl·lula associat a les proteïnes. Un cop incorporat a la cèl·lula, el  $^{210}\text{Po}$  pot ser assimilat pels teixits d'animals que ingereixen aquestes cèl·lules fitoplanctòniques com per exemple mol·lusc, zooplàncton o peixos. La característica del  $^{210}\text{Po}$  de penetrar a l'interior del citoplasma de la cèl·lula (Fisher et al., 1983; Cherrier et al., 1995; Durand et al., 1999; Stepnowski et al., 2000; Stewart i Fisher, 2003), produeix una forta assimilació d'aquest radionúclid en el zooplàncton, amb una eficiència aproximada del 40% (Stewart i Fisher, 2003b). Fet que produeix l'assimilació del poloni a través de la cadena tròfica, d'herbívoros a carnívors que els consumeixen i per tant queda bioacumulat en teixits de diversos animals marins en nivell tròfics superiors. S'han trobat que el  $^{210}\text{Po}$  no està distribuït uniformement en els òrgans de les espècies marines. La major concentració d'aquest radionúclid es troba en els òrgans implicats en la digestió, com l'hepatopàncrees d'invertebrats marins (Swift et al., 1994), intestí, estómac i melsa de peixos (Skwarzec, 1988), sent la ingesta la via principal d'entrada del  $^{210}\text{Po}$  en aquests organismes (Carvalho i Fowler, 1994).

Tant el  $^{210}\text{Po}$  com el  $^{210}\text{Pb}$  no tenen definida ninguna funció biològica al interior de l'organisme com es el cas d'altres elements essencials. Per aquesta raó els organismes no haurien d'incorporar-los per cap mecanisme conegut com: l'acció enzimàtica, canals específics de membrana o altres mecanismes (Williams, 1981; Simkiss i Taylor, 1995). Tot i els nombrosos estudis sobre  $^{210}\text{Po}$ , el mecanisme específic d'absorció per part de les

cèl·lules encara no estan clarificats. El  $^{210}\text{Po}$  sembla ser absorbit per les cèl·lules com un anàleg d'algun element necessari. La seva posició en el grup VI de la taula periòdica i la seva unió a proteïnes, ha suggerit que el  $^{210}\text{Po}$  actua com un anàleg del sofre o el seleni, però en qualsevol cas, principalment associat a proteïnes en els organismes vius (Schwarz, 1976; Cherrier et al, 1995; Stewart i Fisher, 2003; Durand et al., 2002). Les proteïnes a les quals s'ha trobar forta afinitat per el poloni són la ferritina proteïna caracteritzada per tenir ferro i les proteïnes metal·lotioneïnes (MTs) que contenen una alta capacitat d'enllaçar ions metàl·lics.

L'objectiu principal d'aquest projecte pretenia determinar en quina fracció subcel·lular el  $^{210}\text{Po}$  presentava major bioacumulació.

L'objectiu principal del projecte va suggerir diversos objectius específics:

- Establir un mètode de separació de les diferents fraccions subcel·lulars.
- Determinar en quina fracció subcel·lular es concentra el  $^{210}\text{Po}$ .
- Relació entre el contingut de metalls en hepatopàncrees i citoplasma de cèl·lules d'hepatopàncrees (ex. Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg) amb el  $^{210}\text{Po}$ .
- Establir un mètode de separació de proteïnes de la fracció citoplasmàtica per a l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$ .
- Determinar en quina especiació química s'acumula el  $^{210}\text{Po}$  a nivell subcel·lular (proteïna, sal o ió).

## Mètodes

---

Les espècies utilitzades per a l'estudi va ser obtingudes de llocs de venda destinada al consum humà.

Durant aquest projecte es van realitzar tres tipus d'assajos:

El primera assaig es va dur a terme amb l'hepatopàncrees de 10 sardines.

El segon assaig es va realitzar amb l'estudi de fetge de Bonítol, és va analitzar el teixit i també els orgànuls cel·lulars.

El tercer assaig es va fer amb òrgans de diferents espècies: hepatopàncrees i gònades de verat, hepatopàncrees i gònades de tallahams, intestí i fetge de turbot, hepatopàncrees de sardines i hepatopàncrees de rap.

Per separar les fraccions subcel·lulars es va realitzar el fraccionament cel·lular. Aquesta tècnica s'inicia amb la homogeneïtzació. El teixit es tritura en un homogeneïtzador de manera que les cèl·lules es comprimeixen i s'allibera el seu contingut. Posteriorment amb aquest extracte es sotmet a diferents centrifugacions a diferents velocitats i temps, de manera que s'obtenen fraccions enriquides dels distints orgànuls.

El procediment consta de l'homogeneïtzació en un Potter-Elvehem, 0,5 g de fetge en pes humit amb 7 mL de solució tampó, es fan 40 pujades i baixades de l'èmbol del Potter i a continuació s'utilitza una xeringa per xuclar i expulsar 10 vegades més.

La solució tampó esta formada per Tris-HCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM i sacarosa 0,5 M. També s'afegeixen inhibidors de proteases, Apoproteïna 3  $\mu\text{L}/10$  mL, Leupeptin 3  $\mu\text{L}/10$  mL, fluorur fenilmetanosulfonil (Pmsf) 100  $\mu\text{L}/10$  mL i Sodi ortovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 100  $\mu\text{L}/10$  mL.

La primera centrifugació es realitza a 2500rpm durant 10 minuts. En aquesta centrifugació s'obté la fracció de nuclis. Amb la resta d'òrgànuls es fa la següent centrifugació.

La segona centrifugació és realitza a 9300 rpm durant 10 minuts, on s'obtenen els mitocondris. Amb la resta es realitza la tercera centrifugació.

La tercera centrifugació 1300 rpm durant 15 minuts. S'obté la fracció dels lisosomes i en el sobrenedant es realitza una ultracentrifugació.

La quarta ultracentrifugació es realitza a 33000 rpm durant 60 minuts a temperatura de 14 °C. Es va fer servir optima TLX ultra centrifuge Beckman coulter 120,000rpm. En aquesta ultracentrifugació s'obté la fracció dels microsomes que són les fraccions de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i la fracció del citoplasma.

El protocol de precipitació de proteïnes TCA. s'utilitza per concentrar proteïnes per a realitzar l'electroforesi de gel de poliacrilamida, aquests protocol separa les proteïnes d'altres substàncies no necessàries. El protocol consta de successius passos.

1. Afegim  $\frac{1}{4}$  de volum de àcid tricloroacètic (TCA) en funció del volum de la mostra.
2. Incubem 10 minuts a 4 °C.
3. Centrifuguem a 14 krpm durant 10 minuts.
4. S'extreu el sobrenedant i deixem el pelet.
5. Netegem amb 200 µL d'acetona freda.
6. Tornem a centrifugar a 14 rpm durant 10 minuts.
7. Repetim els passos 5 i 6.

8. Extraïem l'acetona amb molta cura i assequem a 95 °C en tap obert durant 5 o 10 minuts.

9. Afegim 25 µL de Laemli buffer i per finalitzar es bull a 95 °C tapat durant 10 minuts.

L'electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants es va utilitzar en la separació de proteïnes, permet separar molècules carregades que presenten diferències en mobilitat quan se les sotmet a un cap elèctric.

En l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE), s'inclouen agents desnaturalitzants com detergents. Quan les proteïnes es solubilitzen en presència del detergent, aquest s'uneix a les proteïnes, trencant interaccions hidrofòbiques i desnaturalitzant-les. Les proteïnes adoptaran una estructura en forma de bastonet amb una sèrie de molècules de SDS carregades negativament al llarg de la cadena polipeptídica. Com a mitjana, s'uneix una molècula de SDS per cada dos residus d'aminoàcids. Com que la quantitat de SDS és pràcticament proporcional a la mida de les proteïnes, els complexos SDS-proteïnes presenten un valor càrrega/massa constant i per tant se separen d'acord a la seva grandària de més grans a més petites.

Preparació del segon gel de poliacrilamida 10 mL es necessiten 4,8 mL H<sub>2</sub>O milliQ, 2,5 mL de Tris HCl Ph8 1,5M, 2,5 mL de Bis-acrilamida 40%, SDS 100µL, APS, 100µL i 4µL TEMED.

Preparació del primer gel (stacking) 10ml : 25 µL SDS 10%, 312 µL de acrilamida, 1,85 mL H<sub>2</sub>O milliQ, 25 µL APS i 2,5 µL de TEMED.

Els gels s'introduran en el suport i després en el tanc, s'afegeix 10 mL de SDS-Page running Buffer en 1000 mL H<sub>2</sub>O miliQ. Seguidament es carreguen les proteïnes en els pous on posteriorment

les proteïnes migraran formant carrils durant dos hores amb una diferència de potencial de 50mA. En aquest cas es necessitarà un carril de proteïnes que analitzarem per espectrometria de masses i un altra carril que utilitzarem per mesurar el  $^{210}\text{Po}$ . Les proteïnes ja separades en el gel no es poden visualitzar. Per tant s'inicia un procés de tinció i posteriorment de destinació.

En el procés de tinció s'introdueix el gel amb 40 mL de metanol, 2 mL d'àcid acètic i 58 mL  $\text{H}_2\text{O}$  en agitació durant una hora. Durant la nit es manté el gel amb agitació amb una dissolució de col·loïdal Coomassie. El stock de col·loïdal Coomassie es dilueix 1:5 amb aigua. Després es mescla 40 mL d'aquest dissolució amb 10 mL de metanol.

Una vegada les proteïnes tenyides es van dividir cada carril en dotze fraccions. les dotze fraccions del primer carrils es va analitzar per  $^{210}\text{Po}$ , i les dotze fraccions del segon es va emmagatzemar per realitzar el posterior anàlisi d'espectrometria de masses.

Un altra tècnica utilitzada per a la separació de proteïnes va ser la cromatografia líquida d'alta resolució o *high performance liquid chromatography* (HPLC) és un tècnica de cromatografia en columna. Aquesta tècnica es utilitzada per separar els compostos d'una mescla basats en diferents tipus d'interaccions químiques entre les substàncies analitzades i la columna cromatogràfica.

El tipus de separació que té lloc és cromatografia d'exclusió molecular, també coneguda com cromatografia per filtració en gel, separa les partícules de la mostra en funció de la seva mida. En aquesta separació la fase estacionària consisteix en llargs polímers entrecruats que formen una xarxa tridimensional porosa. Quan es fa passar una barreja de molècules de diferents capacitat, a través d'una columna de filtració, aquelles molècules amb una grandària major que el diàmetre dels porus de les partícules, només podran

moure's en el seu camí, a través de la fase estacionària, en l'espai que queda entre les partícules, i per tant, no es veuran retardades en el seu descens. En canvi les molècules més petites capaces de penetrar en les partícules es veuran retardades per la fase estacionària, en major mesura, com menor sigui la seva mida.

L'anàlisi del  $^{210}\text{Po}$  es va realitzar per espectrometria alfa, realitzant anteriorment dos tipus de digestió de les mostres, digestió en vas obert i digestió en microones.

La digestió en vas obert de les mostres es va realitzar dipositant les mostres en beakers de vidre amb 5mL de  $\text{HNO}_3$  i 2mL de HCl i el traçador intern el  $^{209}\text{Po}$  (0,05mL) amb activitat  $0,703 \pm 0,015$  Bq·mL<sup>-1</sup> a dia 04/11/2009, per avaluar les pèrdues de poloni del procediment radioquímic. S'escalfen les mostres a 75°C amb agitació. S'afegeixen gotes de peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) per ajudar a la digestió de la mostra.

Quan ja totes les mostres estan digerides s'evaporen totalment (sense arribar a ebullició), quan es queda un fons sòlid s'afegeix 1mL de HCl i es tornar a evaporar, aquest procediment es realitza 3 vegades. Després s'afegeix 100mL de HCl 1M i s'afegeix àcid ascòrbic perquè el  $\text{Fe}^{+3}$  es redueixi a  $\text{Fe}^{+2}$ , per minimitzar interferències en la deposició del Po. Després el  $^{209}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Po}$  de la solució són espontàniament dipositats en discs de plata de 25mm de diàmetre a una temperatura de 80°C i es manté en agitació durant un període de 6 a 8 hores per a que el poloni es diposití de manera espontània en els discs. Finalment s'extrauen els discs de la solució, es netegen amb aigua Milli-Q i es deixen assecar.

En la digestió amb microones es van digerir amb aquest mètode teixits directament i fraccions de citoplasma, necessàries per l'anàlisi de metalls i per l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$ . En aquest cas es van transferir 0,2 mg de mostra en pes sec als

tubs digestió de tefló (*liners*), es van dissoldre amb 10 mL HNO<sub>3</sub> 65% i es van digerir per microones a alta pressió i temperatura. Les mostres es van escalfar al microones a una pressió de 800 psi durant 15 minuts a 200°C.

Un cop refredats els *liners*, se'ls hi va afegir 15mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> per tal de dissoldre els compostos de fluor amb el microones a 50 psi durant 45 minuts, aquest procediment només es va dur a terme per a les mostres analitzades per Po no les d'anàlisi de metalls.

Les mostres analitzades per metalls com hem dit anteriorment es van digerir amb microones, 0,2 g de massa seca, una vegada digerides, es van diluir 1:1, 10 mL de la mostra per 10 mL H<sub>2</sub>O milliQ, i es van portar al Servei d'Anàlisi Químic de la UAB. Es va analitzar el contingut de Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg en les mostres de hepatopàncrees de verat, Gònades de verat, fetge de turbot, intestí de turbot, hepatopàncrees de tallahams, gònades de tallahams, hepatopàncrees de sardines i hepatopàncrees de rap i també les fraccions de citoplasma de les mostres anteriors.

## Resultats i discussió

---

En el primer assaig que es va dur a terme es va realitzar amb deu hepatopàncrees de sardines. Es va realitzar el fraccionament cel·lular i es van separar els orgànuls, posteriorment les fraccions van ser analitzats per <sup>210</sup>Po.

Els resultats obtinguts van mostrar com el 50% de <sup>210</sup>Po es trobava al citoplasma el 22% a la fracció del nuclis, el 14% en els mitocondris, el 9% en els lisosomes i el 5% en els microsomes.

Els resultats mostren que la fracció subcel·lular que acumula més <sup>210</sup>Po és el citoplasma. Això està d'acord amb els estudis portats a terme per Durand et al. (1999) que indiquen que el 80% del <sup>210</sup>Po analitzat en fetge de verat es trobava en aquesta fracció. Observem,

però com una fracció significativa també s'acumula en les altres fraccions. Durand et al. (1999) va observar que la segona fracció amb més <sup>210</sup>Po eren mitocondris i lisosomes a diferències del resultats obtinguts on la segona major concentració de <sup>210</sup>Po va ser obtinguda en els nuclis molt probablement degut a que en aquest primer assaig moltes cèl·lules no es van arribar a separar i per tant es van quedar senceres, en la fracció de nuclis.

El segon assaig es va realitzar amb la mostra de fetge de bonítol. Es van analitzar cinc rèpliques de la mostra per <sup>210</sup>Po i es van observar resultats molt heterogenis. Els resultats mostren un rang d'activitats ampli amb concentracions que oscil·len entre els 527 i els 109 Bq·kg<sup>-1</sup> amb una activitat mitjana de 263,9 ± 158 Bq·kg<sup>-1</sup>. Aquestes diferències en les activitats de les mostres són degudes a que en el procés de digestió en vas obert, una fracció del greix de la mostra no es va digerir totalment, d'aquesta manera part del <sup>210</sup>Po podria haver-se quedat en aquesta fracció.

Comparant els resultats obtinguts de bonítol amb els resultats que va obtenir Carvalho, (2011) en fetge de tonyina, les dues espècies es caracteritzen per ser de la família dels escòmbrids que formen bancs, depredadors de la zona pelàgica i s'alimenten de peixos, calamars i zooplàncton. Les concentracions de <sup>210</sup>Po que va obtenir Carvalho, (2011) per fetge de tonyina van ser 268 Bq·kg<sup>-1</sup>. Comparat amb els resultats de bonítol tonyina veiem que la rèplica 3 i 4 estan al voltant de valor 268 Bq·kg<sup>-1</sup> mentre que les rèpliques 1, 2 i 5 tenen un valor de <sup>210</sup>Po molt diferent.

D'aquesta mostra de fetge es va realitzar el fraccionament cel·lular, separant els diferents orgànuls de la cèl·lula i es va analitzar el <sup>210</sup>Po. Els resultats van mostrar que l'activitat més elevada es troba en el citoplasma amb una concentració de 163,8 Bq·kg<sup>-1</sup>. Les altres fraccions mostren una concentració de

77,1 26,5, 11,4 i 8,7Bq·kg<sup>-1</sup> en nuclis, mitocondris, mesosomes, i lisosomes, respectivament.

El percentatge de <sup>210</sup>Po per a cada òrganul de fetge de bonítol va mostrar que la fracció del citoplasma era en on es concentra la major part del <sup>210</sup>Po amb una fracció del (57%). Seguidament les fracció que més <sup>210</sup>Po acumulava en forma decreixent: nuclis (27%), mitocondris (9%), microsomes (4%) i lisosomes (3%).

Comparant els resultats obtinguts de Bonítol amb els resultats que va obtenir Durand, (1999) en fetge de verat veiem que en tots dos casos el <sup>210</sup>Po tenia major concentració en la fracció citoplasmàtica. Per verat es va observar un major percentatge de 80% i un percentatge del 57% per bonítol. La fracció de mitocondris per verat també contenia lisosomes pesats amb un percentatge de 11,7% i en el cas del bonítol els mitocondris presentaven un percentatge menor, del 9%. Per la fracció de lisosomes de Verat també incloïa mitocondris, amb un percentatge de 4%. En el cas del bonítol també presentava un percentatge del 4%. Els resultats en la fracció de microsomes per verat es va obtenir un 3,5% a diferència de per bonítol on es va observar un 9% i per últim amb la fracció de nuclis on es presenta la major diferència entre els estudis, per verat es va obtenir un 0,8% del <sup>210</sup>Po en canvi per bonítol el percentatge era de 27%.

Amb aquestes resultats es va realitzar una separació de proteïnes mitjançant la tècnica de l'electroforesi de gel de poliacrilamida amb la fracció de citoplasma de bonítol. Es pretenia separar les proteïnes amb el gel i analitzar el <sup>210</sup>Po de les diferents fraccions del gel amb les proteïnes separades. Una vegada identificades les bandes del gel amb major contingut en <sup>210</sup>Po s'analitzaria per espectrometria de masses les proteïnes concretes.

Malauradament els resultats per <sup>210</sup>Po del gels van mostrar activitats molt baixes. Durant la realització del protocol de precipitació de proteïnes TCA es van recollir mostres del rentats amb acetona que es va fer en aquest protocol i es va veure que aquestes mostres presentaven més activitat que els propis gels. Això ens va indicar que possiblement el <sup>210</sup>Po havia sigut arrossegat per l'acetona abans de realitzar l'electroforesi. Un altra causa possible del desencadenat de la pèrdua del <sup>210</sup>Po podria ser la utilització del detergent SDS en l'electroforesi, aquest agent provoca la desnaturalització de les proteïnes i per tant modifica l'estructura de les proteïnes, que podria modificar també la posició del <sup>210</sup>Po, que podria haver-se dissolt en el detergent. Amb els resultats obtinguts es va concloure que per a l'estudi de <sup>210</sup>Po associat a les proteïnes de citoplasma, la separació de proteïnes mitjançant la tècnica de l'electroforesi de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no era un mètode viable.

El tercer assaig es va realitzar amb les mostres hepatopàncrees i gònades de verat, fetge i intestí de turbot, hepatopàncrees i gònades de tallahams, hepatopàncrees de sardines i de rap. Es va realitzar el fraccionament cel·lular en totes les mostres. Es va dur a terme l'anàlisi de <sup>210</sup>Po pels teixits i l'anàlisi de <sup>210</sup>Po per la fracció de citoplasma i per últim l'anàlisi de <sup>210</sup>Po per la fracció resta que contenia tots els d'òrganuls menys el citoplasma. També es van analitzar els metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg ) dels teixits i de les fraccions de citoplasma de les vuit mostres. Per últim amb la fracció de citoplasma d'hepatopàncrees de tallahams (HT) es va realitzar una separació de proteïnes mitjançant la cromatografia líquida d'alta resolució i es va separar tres fraccions amb tres espècies químiques, la primera fracció contenia les proteïnes per ser les molècules més pesades, la segona fracció contenia les sals i per últim la tercera fracció contenia els ions, la fracció més lleugeres.

Els resultats obtinguts del  $^{210}\text{Po}$  en els teixits de les mostres mitjançant la digestió en vas obert i en microones són molt heterogenis. En digestió amb vas obert algunes mostres no es va poder digerir a causa de la gran quantitat de greixos (Taula 1).

S'ha observat que les mostres hepatopàncrees de verat (HV) i intestí de turbot (IT) presenten resultats més alts per a la digestió en vas obert que per a la digestió en vas tancat, no obstant no hauria de ser així, com la resta de mostres indiquen una major concentració de  $^{210}\text{Po}$  per la digestió en vas tancat, ja que en aquesta digestió es digereix tot el contingut introduït en canvi en la digestió en vas obert els resultats haurien de ser menors a causa del complicat procés de digestió dels greixos i per tant part de la mostra es queda sense digerir.

Les mostres que presenten un major contingut en  $^{210}\text{Po}$  en vas tancat són hepatopàncrees de tallahams (HT) i hepatopàncrees de sardina (HS), les dues mostres amb gran quantitat de greixos, ja que no es van digerir correctament amb vas obert. Comparant els resultats obtinguts per Carvalho, (2011) també amb fetge de sardina  $599 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  (pes sec) s'acosta als resultats d'aquest estudi  $424 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  en fetge de sardina. Podem observar com els valors de  $^{210}\text{Po}$  per fetge de sardina mostren concentracions elevades, ja que es un espècies consumidor de zooplàncton. Segons els estudis de Durand et al. (2002) els resultats per fetge de verat mostraven una concentració de  $^{210}\text{Po}$  de  $36 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  i en l'estudi de Carvalho, (2011) el fetge de verat presentava unes concentracions de  $85 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  en aquest estudi el resultat d'hepatopàncrees de verat es localitzen entre els resultats de Carvalho, (2011) i Durand et al. (2002) amb un resultat de  $64 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les mostres amb les concentracions més baixes són fetge de turbot (FT), hepatopàncrees de rap (HR) i gònades de verat (GV).

L'anàlisi de metalls es va dur a terme amb les vuit mostres, per considerar si les concentracions de metalls podrien tenir algun correlació amb la quantitat de  $^{210}\text{Po}$ . Els resultats de Durand, (1999) apuntaven que les proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes, que són riques en ferro i metalls eren les que presentaven més concentració de  $^{210}\text{Po}$ , per aquest motiu es va voler observar la relació entre  $^{210}\text{Po}$  i alguns metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg ). L'assaig es va realitzar per a teixits també per la fracció de citoplasma.

Els resultats de la relacionen dels metalls dels teixits amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , s'observa una tendència de les mostres a acumular Fe i Hg (Figura 1 i 2), al contenir més concentració de  $^{210}\text{Po}$ . La resta de metalls Ni, Zn, Cu, Cd i Pb no mostraven aquesta tendència.

En canvi per als metalls de la fracció de citoplasma de les mostres amb relació amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ . S'ha observat que per metalls com el Fe, Cu, Ni i Hg (Figura 3,4,5 i 6) analitzats s'ha trobat una relació front a la concentració de  $^{210}\text{Po}$ . Els altres metalls analitzats com el Pb, Zn i Cd no presenten aquesta relació. D'aquesta manera la relació que s'ha vist entre el Fe i el  $^{210}\text{Po}$  tant per als teixits com per la fracció de citoplasma manté relació amb els resultats de Durand (1999) on es va trobar afinitat d'un 30% del  $^{210}\text{Po}$  amb la proteïna ferritina que conté un gran contingut de Fe. Les proteïnes metal·lotioneïnes (MTs) amb la seva capacitat de captar cations metàl·lics podria comportar una captació tan del  $^{210}\text{Po}$  com d'altres metalls. En canvi una relació entre Zn i  $^{210}\text{Po}$  podria ser esperada segons l'article de Durand (1999) on va trobar un 8% del  $^{210}\text{Po}$  associat en proteïnes amb enzims probablement amb Zn però no s'ha trobat una relació entre aquest metall i  $^{210}\text{Po}$  de les mostres estudiades.

Per últim es va realitzar la cromatografia líquida d'alta resolució per separar diferents especiacions químiques, es va separar una fracció amb les proteïnes,



una fracció amb sals i l'última amb ions (Figura 7.). Els resultats van mostrar una afinitat del  $^{210}\text{Po}$  per la fracció de les proteïnes d'un 69%, donant suport a altres articles que mostraven afinitat del  $^{210}\text{Po}$  per proteïnes amb un 66% com la ferritina i les metal·lotioneïnes i altres Durand et al. (1999).

## Conclusions

---

L'objectiu principal d'aquest projecte era la recerca basada en l'estudi del  $^{210}\text{Po}$  en espècies marines, utilitzades per al consum humà i centrant-nos en la seva transferència a l'interior de l'aparell digestiu i la seva distribució a l'interior de la cèl·lula.

En dos dels tres assajos realitzats els resultats mostren una major concentració de  $^{210}\text{Po}$  localitzat en la fracció del citoplasma. Al voltant del 50% del  $^{210}\text{Po}$  total de la cèl·lula pertany a aquesta fracció.

Respecte als resultats de metalls relacionats amb el contingut de  $^{210}\text{Po}$  en els teixits de les mostres de verat, turbot, tallahams, sardina i rap, i la seva fraccions de citoplasma. S'ha pogut relacionar el contingut de metalls de les mostres amb concentracions de  $^{210}\text{Po}$ . El Fe i el Hg presenten una relació lineal amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , en canvi la resta de metalls Ni, Cu, Zn, Cd i Pb, no presenten aquesta relació. Per a l'anàlisi de metalls per a la fracció de citoplasma de les mostres s'ha trobat una relació entre Fe, Cu, Ni i Hg amb el  $^{210}\text{Po}$ , aquests resultats es veu recolzats per l'estudi de Durand et al. (1999) que va trobar afinitat del  $^{210}\text{Po}$  amb les proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes (MTs).

Un altre dels objectius específics que es va plantejar va ser el desenvolupament d'un mètode per a l'extracció de proteïnes de la fracció de citoplasma de la cèl·lula útils per a realitzar el posterior estudi de  $^{210}\text{Po}$  d'aquestes proteïnes. Queda car per els resultats obtinguts que la tècnica de l'electroforesi de gels de

poliacrilamida permet la separació de les proteïnes però no manté el  $^{210}\text{Po}$  unit a aquestes sinó que queda dissolt en les molècules de detergent que s'utilitzen en aquesta tècnica inviabilitzant el procediment. El protocol de precipitació de proteïnes TCA que es va dur a terme abans de l'electroforesi de gel de poliacrilamida es va veure que també arrossega el  $^{210}\text{Po}$  per tant la utilització d'aquest protocol juntament amb la tècnica de l'electroforesi no són efectiu per al desenvolupament d'aquest mètode.

No obstant la cromatografia líquida d'alta resolució ha esdevingut el mètode mitjançant el qual s'ha pogut adquirir resultats en la separació de diferents especiacions químiques, fent possibles l'anàlisi del  $^{210}\text{Po}$  també. Aquesta tècnica va aconseguir separar diferents especiacions químiques com les proteïnes, sals i ions. Posteriorment es va poder realitzar l'anàlisi del  $^{210}\text{Po}$  on es va trobar que la major concentració de  $^{210}\text{Po}$  es va localitzar en la fracció de proteïnes de la mostra. Els resultats obtinguts donen suport a resultats d'altres estudis com el de Durand et al. (1999) (2002).

La unió de tots els resultats evidència la penetració del  $^{210}\text{Po}$  a l'interior de la cèl·lula, la seva bioacumulació en la fracció citoplasmàtica de la cèl·lula i la seva afinitat per les proteïnes. La relació trobada del  $^{210}\text{Po}$  amb alguns metalls té relació amb altres estudis que relacionen el  $^{210}\text{Po}$  amb proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes (MTs).

## Bibliografia

---

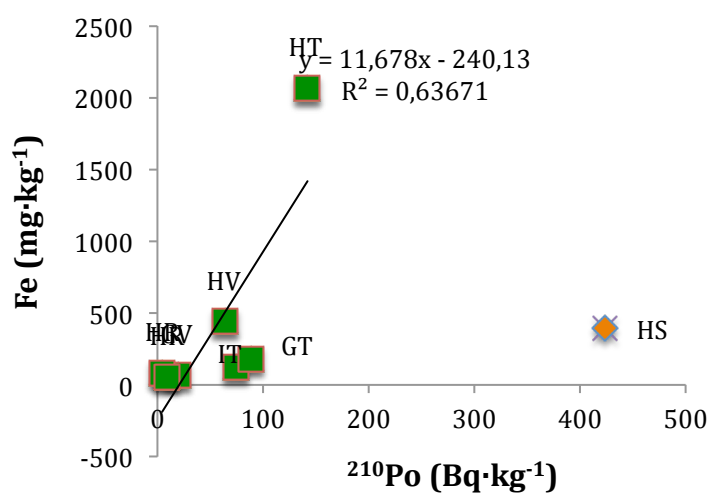
- Cherry, R.D., Shannon, L.V., (1974). The alpha radioactivity of marine organisms. Atomic Energy Review 12, 3-45.
- Cherry, R. D. and Heyraud, M. (1982). Evidence of High Natural Radiation Doses in Certain Mid-Water Oceanic Organisms; Science 218.

- Carvalho, F.P. (1988).  $^{210}\text{Po}$  in marine organisms: a wide range of natural radiation dose domains. *Radiation Protection Dosimetry* 24: 113–117.
- Fisher, N. S., Burns, K. A., Cherry, R. D. and Heyraud, M. (1983). Accumulation and cellular distribution of  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{210}\text{Po}$ , and  $^{210}\text{Pb}$  in two marine algae. *Marine Ecology Progress Series* 11: 233–237.
- Cherrier, J., Burnett, W. C., LaRock, P.A. (1995). Uptake of polonium and sulfur by bacteria. *Geomicrobiology Journal* 13, 103–115.
- Durand, J. P., Carvalho, F. P., Goudard, F., Pieri, J., Fowler, S. W., Cotret, O. (1999).  $^{210}\text{Po}$  binding to metallothioneins and ferritin in the liver of teleost marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, vol 177, 189-196.
- Stepnowski, P., Skwarzec, B. (2000). Tissues and subcellular distributions of  $^{210}\text{Po}$  in the crustacean *Saduria entomon* inhabiting the southern Baltic sea. *Journal of Environmental Radioactivity* 49:195-199.
- Stewart, G. M., and N. S. Fisher. (2003a). Experimental studies on the accumulation of polonium-210 by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 48, 1193–1201.
- Stewart, G. M., and N. S. Fisher. (2003b). Bioaccumulation of polonium-210 in marine copepods. *Limnology and Oceanography*, 48, 2011–2019.
- Swift D.J., Smith, D.L., Allington, D.J., and Ives, M. J. (1994). The  $^{210}\text{Po}$  content of North Sea edible crab, *Cancer pagurus* L., and common shrimp, *Crangon crangon* L. and the potential radiological impact. *Journal of Environmental Radioactivity* 23: 213-230.
- Skwarzec, B., Falkowski, L. (1988). Accumulation of  $^{210}\text{Po}$  in Baltic Invertebrates, *J. Environ. Radioactivity* 8, 99-109.
- Carvalho, F.P. and Fowler, S.W. (1994). A double-tracer technique to determine the relative importance of water and food as sources of polonium-210 to marine prawns and fish. *Marine Ecology Progress Series* 103: 251–264.
- Williams, R. J. P. (1981). Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 294, 57–74.
- Simkiss, K., and M. G. Taylor. (1995). Transport of metals across membranes. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Eds A. Tessier and D. R. Turner). Wiley, Chichester, pp. 1–44.
- Schwarz, K. (1976). Essentiality and metabolic functions of selenium. *Medical Clinics of North America*, 60, 745–767.
- Durand, J. P., Goudard, F., Pieri, J., Fowler, S. W., Cotret, O. (2002). Ferritin and hemocyanin:  $^{210}\text{Po}$  molecular traps in marine fish, oyster and lobster. *Marine Ecology Progress Series*, vol 233, 199-205.

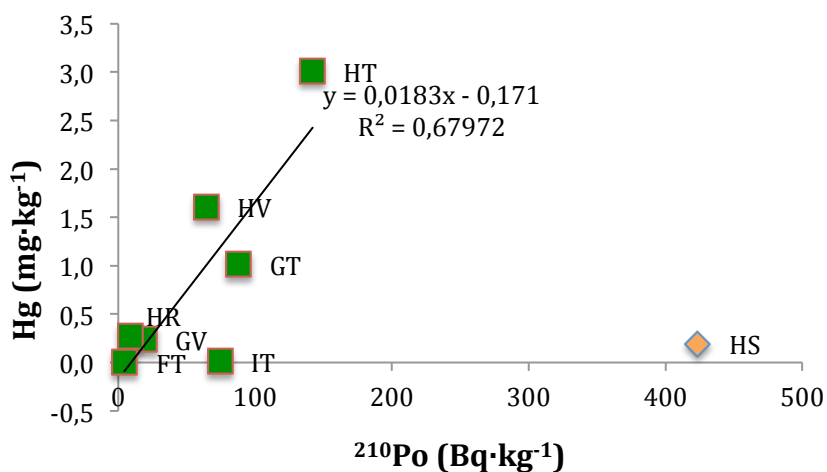
## Taules i figures

**Taula 1.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( Bq/kgpes sec )de les mostres digerides amb microones i amb vas obert.

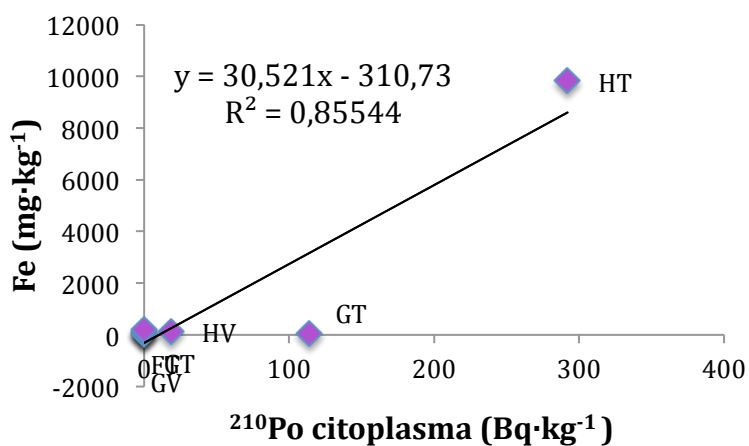
Mostres	Po-210 digestió Microones (Bq/kg)	Po-210 digestió vas obert (Bq/kg)
Hepatopàncrees Verat	64± 5	105±9
Gònades Verat	20± 2	17± 1
Fetge Turbot	4± 1	2± 0
Intestí Turbot	74± 6	140 ± 9
Hepatopàncrees Tallahams	142± 13	-
Gònades Tallahams	88± 8	39± 11
Hepatopàncrees Sardina	424± 32	-
Hepatopàncrees Rap	9± 1	-



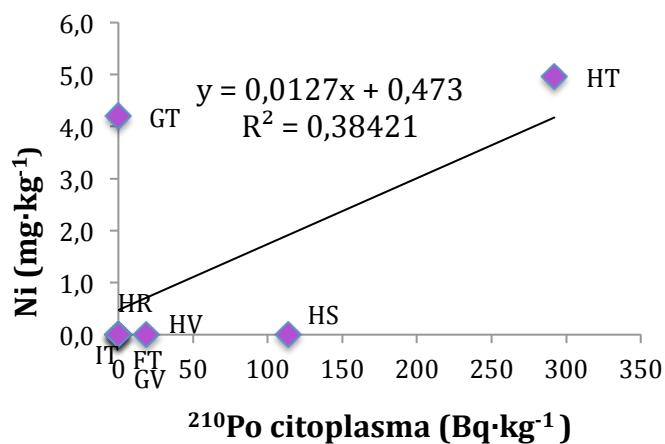
**Figura 1.** La figura mostra les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en Bq·kg<sup>-1</sup>) i les concentracions de Fe (en mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.



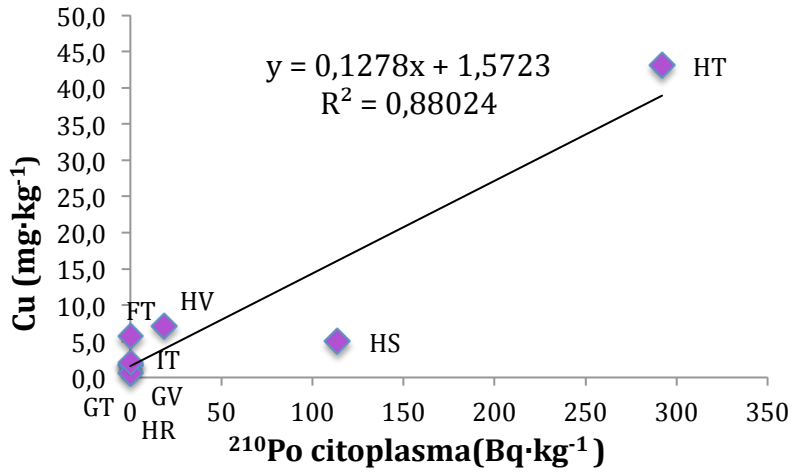
**Figura 2.** La figura mostra les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en Bq·kg<sup>-1</sup>) i les concentracions de Hg (en mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.



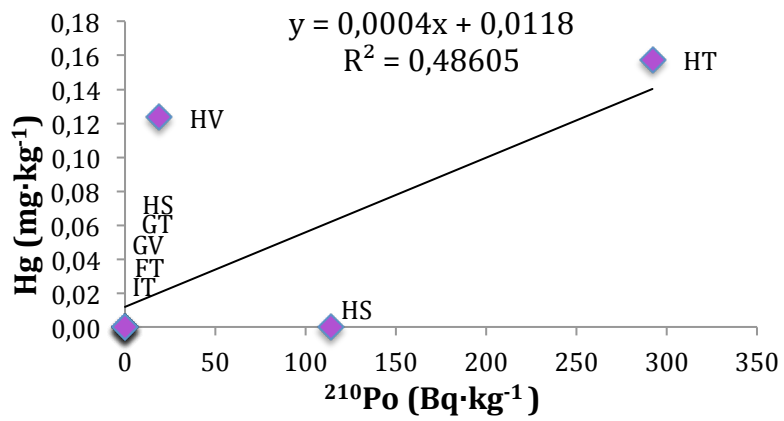
**Figura 3.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en Bq·kg<sup>-1</sup>) de la fracció citoplasmàtica de les mostres i la concentració de Fe (en mg·kg<sup>-1</sup>).



**Figura 4.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en Bq·kg<sup>-1</sup>) de la fracció citoplasmàtica de les vuit mostres analitzades i la concentració de Ni (en mg·kg<sup>-1</sup>).



**Figura 5.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en  $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de la fracció citoplasmàtica de les vuit mostres analitzades i la concentració de Cu (en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).



**Figura 6.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (en  $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de la fracció citoplasmàtica de les mostres i la concentració de Hg (en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

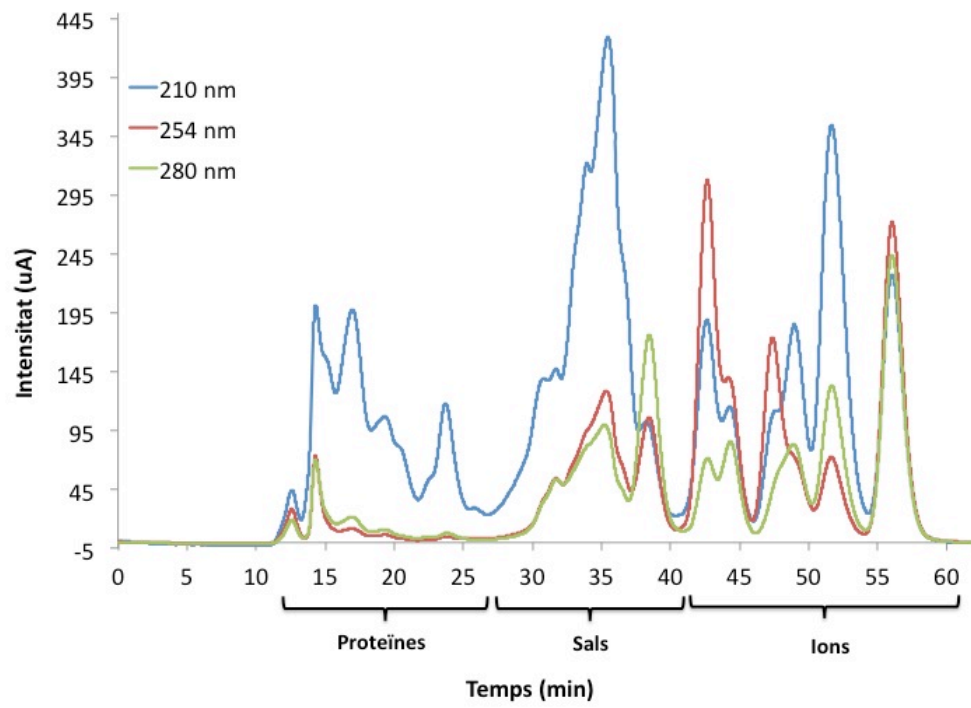


Figura 7. Resultats de la cromatografia líquida d'alta resolució.