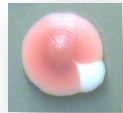


A microscopic image of cells, likely from a tissue sample, stained with a fluorescent dye. The cells are arranged in a cluster, and their nuclei are stained a bright yellow, while the surrounding cytoplasm and extracellular matrix are stained a lighter, more diffuse yellow. The overall appearance is that of a dense, interconnected network of cells.

La llum ultraviolada, un agent mutagènic?

Laura Mas del Moral

Tutora: Mercè del Barrio Arranz
Institut Guindàvols



“La ciència és l'estètica de la
intel·ligència”

Gastón Bachelard



ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	3
PLANTEJAMENTS DEL PROBLEMA	5
METODOLOGIA	7
- Coneixements Previs.....	7-30
- Experimentant amb Saccharomyces.....	29
- Càlculs i estudis preliminars.....	31
- Saccharomyces i el peròxid d'hidrogen.....	53
- Sachharomyces Cerevisiae i la llum ultraviolada.....	63
- Saccharomyces a l'exposició de la radiació solar.....	64
- Saccharomyces exposat a la radiació ultraviolada.....	81
- Primer protocol.....	82
- Segon prtotocol.....	89
CONCLUSIONS	105
- Científiques.....	105
- Personals.....	116
BIBLIOGRAFIA	113
AGRAÏMENTS	114
ANNEXOS	115
- Construcció d'una caixa d'irradiació.....	116
- Composició medis de cultiu.....	128



INTRODUCCIÓ

In this work our objectives are demonstrate the mutagenic effect of ultraviolet radiation. To get it, we will divide this work in two parts; first, we will do some studies about Saccharomyces, the strain that we'll use. Then, in the second part, we'll put Saccharomyces cells under the sun during a period of time and after, under a fluorescent to check that not only solar radiation affects negatively in our cells. Moreover, we will search a similitude among our fluorescent and the fluorescents of beauty salons.

After a lot of experiments, we found the effect mutagenic of ultraviolet radiation and as the researches done by scientists, the radiation is harmful for our body and overcoat, for our cells because a long period of time under the radiation can cause cancer. We have seen it because the cells have grown in a different color than usual.

Finally, we have found that the radiation of our fluorescent is the same that the fluorescents in beauty salons; this means that our experiment with Saccharomyces is the same that this saloons make with us.

Cada estiu escolto la mateixa frase: "posa't crema que et cremaràs i el Sol és molt dolent", en canvi, a l'hivern és: "encara que ja no estiguis morena, no vagis a cap sessió de raigs UVA que són dolents". Doncs bé, després d'escoltar tantes vegades que tant una cosa com l'altra són perjudicials, el que em proposo en aquest treball és esbrinar científicament si aquestes afirmacions són o no certes, veure si la radiació solar, i més concretament l'ultraviolada, provoca mutacions en el nostre organisme i per tant, pot esdevenir cancerígena.

Al llarg del temps s'han dut a terme investigacions on científics han confirmat que si l'organisme està sotmès durant un llarg període a l'exposició de la llum solar, la radiació provoca mutacions en l'ADN i si aquest, malauradament, no pot reparar aquests canvis, les cèl·lules es poden esdevenir cancerígenes i per tant, que es tingui la malaltia que per desgràcia, cada dia pateix més gent. Per això, ja que és un tema que està en boca de tots, quan vaig veure l'oportunitat que se'm posava davant no la vaig voler deixar escapar i realitzar aquest treball per poder-ho demostrar jo mateixa i veure-ho de ben aprop.



En tots els treballs de recerca es necessita un punt de partida, en aquest cas, he tingut la sort de que en el nostre centre fa alguns anys, l'alumna Beatriu Escudero va realitzar el treball de recerca anomenat "Seguint la pista a *Saccharomyces*" en el qual investigava sobre aquest llevat. A més a més, l'Aleix Brosel i la Silvia Peret ja havien fet dos treballs, "Llevats transgènics i agents mutàgens" i "*Saccharomyces* i la llum ultraviolada" on van treballar amb cèl·lules de llevat i les van exposar a agents mutàgens químics i a la llum ultraviolada per quantificar a partir de quin moment el material genètic quedava tan afectat que la cèl·lula no podia continuar vivint i moria per apoptosi.

A partir d'aquí, junt amb la meva tutora hem vist que es podia anar més enllà i pretenem quantificar l'efecte mutagènic de la llum ultraviolada.

El treball constarà de dues parts: en la primera, juntament amb la meva companya M^a Luisa Rodríguez Sanz, començarem a treballar amb *Saccharomyces* i a cercar la bibliografia necessària per la investigació posterior.

A més a més, per la mateixa raó, intentarem fer els estudis preliminars que ens permetin dissenyar un protocol, utilitzant un agent mutagen conegut, el peròxid d'hidrogen, amb el que podrem esbrinar quina quantitat de llevat sembrarem, com ho farem i quin és l'aspecte d'una colònia de cèl·lules de llevat que ha sofert mutacions.

En la segona part, ja individualment, durem a terme la nostra investigació. En el meu cas, com he comentat abans, intentaré demostrar que la radiació ultraviolada és perjudicial per l'organisme ja que li pot provocar mutacions. Les cèl·lules tenen mecanismes per reparar l'ADN però arriba un punt en que ja no es poden resoldre tots els errors i si aquest afecten a gens que regulen el cicle cel·lular la cèl·lula esdevindrà cancerosa.

A vegades, la cèl·lula detecta que el seu ADN té errors irreparables, llavors, quan succeeix això la cèl·lula opta per suïcidar-se; aquest procés rep el nom d'apoptosi.

Per tant, per demostrar aquesta segona part el que faré serà exposar colònies de *Saccharomyces* durant diferents períodes de temps, primer, a la llum solar per demostrar que aquesta és perjudicial i provoca mutacions i un cop ho hagi demostrat, exposaré les cèl·lules de llevat a la radiació d'un fluorescent de llum ultraviolada de 4W per comprovar que és realment aquesta la que provoca mutacions en l'organisme i per tant, és cancerígena.



Per altra banda, que caldrà adaptar els protocols als mitjans disponibles en el laboratori de l'Institut, realitzaré un primer protocol per a la llum solar i a continuació, un altre per a la radiació ultraviolada, per aquest segon contaré amb un enginy que va fabricar l'alumne Albert Minobes en el seu treball de recerca.

Per últim no hem d'oblidar el problema mediambiental de l'afebliment de la capa d'ozó, gas que és de vital importància per a la vida, ja que absorbeix la radiació ultraviolada biològicament nociva (UV) procedent del Sol. La capa d'ozó absorbeix tota la radiació UV-C per sota de 280 nm, en canvi les radiacions UV-B i UV-A són parcialment absorbides per l'O₃. La UV-B és la que té més poder mutagènic al ser de longitud d'ona més curta i per tant més energètica. Per sort el 1987 es va firmar el protocol de Montreal relatiu a substàncies que disminueixen l'ozó (CFC i halons), i en aquest cas la comunitat internacional va ser capaç de posar-se d'acord i complir els acords.



PLANTEJAMENTS DEL PROBLEMA

EXPERIMENTANT AMB *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

El que pretenem en aquests estudis preliminars és familiaritzar-nos en la metodologia necessària per realitzar la nostra investigació posterior; per fer-ho, el que ens plantejem és el següent:

PLANTEJAMENT 1: Càlculs i estudis preiliminars.

- Com podem obtenir colònies aïllades de *Saccharomyces*?
- Podrem esbrinar el nombre de cèl·lules que hi ha en una colònia de *Saccharomyces* per saber posteriorment les dilucions que hem de fer per sembrar les plaques de les nostres investigacions?
- Podrem elaborar un protocol que ens permeti detectar i quantificar les mutacions produïdes per un agent mutagen, en aquest cas, el peròxid d'hidrogen?

SACCHAROMYCES CEREVISIAE SOTA ELS EFECTES DE LA LLUM ULTRAVIOLADA

El que volem realitzar en aquesta investigació és veure com afecta la llum ultraviolada en cèl·lules de llevats i demostrar si és un agent cancerigen; per fer-ho ens plantejem el següent:

PLANTEJAMENT 2: *Saccharomyces Cerevisiae* exposat a la radiació solar.

- Serem capaços d'elaborar un protocol que ens serveixi per dur a terme la investigació sobre l'efecte mutagènic de la radiació solar?
- Serem capaços de reconèixer i fotografiar les diferents colònies mutades?
- A partir de quin període d'exposició la llum solar comença a produir efectes negatius sobre *Saccharomyces*?
- Podrem quantificar l'efecte mutagènic de la llum solar?
- La radiació solar és cancerígena?



PLANTEJAMENT 3: *Saccharomyces Cerevisiae* exposat a la radiació ultraviolada.

- Serem capaços d'elaborar un protocol que ens serveixi per dur a terme la investigació sobre l'efecte mutagènic de la radiació solar?
- Serem capaços de reconèixer i fotografiar les diferents colònies mutades?
- A partir de quin període d'exposició la llum solar comença a produir efectes negatius sobre *Saccharomyces*?
- Podrem quantificar l'efecte mutagènic de la llum solar?
- La radiació dels fluorescents de llum ultraviolada és cancerígena? Hi ha alguna relació amb els fluorescents dels salons d'estètica?



METODOLOGIA

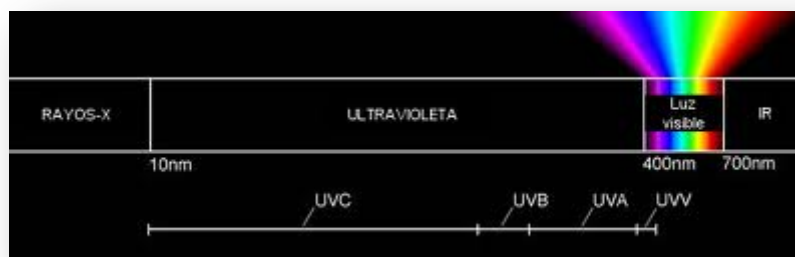
3.1 CONEIXEMENTS PREVIS

❖ LA RADIACIÓ ULTRAVIOLADA

En aquest treball per tant estudiarem una de les radiacions electromagnètiques més important de les que emet el Sol. Per això, abans de començar cap tipus d'investigació i d'estudi, és convenient saber algunes coses importants sobre aquesta radiació.

Què és?

És la radiació electromagnètica amb una longitud d'ona menor a la llum visible i major a la dels raigs X. La seva longitud d'ona va aproximadament des dels 400 nanòmetres fins als 15 nanòmetres.



Imatge 1: espectre electromagnètic

Font: <http://www.gewuv.com/es/printable/node/568>

Com es va descobrir?

Va ser el físic alemany Johann Wilhelm Ritter qui va observar al 1801 l'enfosquiment de les sals de plata en ser exposades a la llum solar.

Va descobrir que una radiació invisible situada just després de la violeta, el final de l'espectre visible, era especialment efectiva per enfosquir papers impregnats de clorur de plata.



Ritter va adoptar el terme de «raigs químics», denominació que es va mantenir al llarg del segle XIX. Després la denominació de «raigs calents» i « raigs químics» aniria decaient en favor de les de radiació ultraviolada.

Quins tipus hi ha?

Podem trobar fins a vuit subtipus de la radiació ultraviolada però els més importants són:

NOM	ABREVIACIÓ	LONGITUD D'ONA EN NANÒMETRES	ENERGIA PER FOTÓ
Ultraviolat A , ones llargues, o llum negra	UVA	400 nm – 315 nm	3,10 – 3,94 eV
Ultraviolat B o ones mitjanes	UVB	315 nm – 280 nm	3,94 – 4,43 eV
Ultraviolat C , ones curtes, o Radiació ultraviolada germicida	UVC	280 nm – 100 nm	4,43 – 12,4 eV

Quins efectes té sobre la salut?

La radiació ultraviolada, pel que fa als efectes que produeix sobre la salut, pot produir danys com també pot aportar algun benefici sobre ella.

➤ **EFFECTES BENEFICIOSOS**

➤ Producció de vitamina D

- ✓ Gràcies a l'atmosfera terrestre que actua com un filtre només n'arriba una petita quantitat de la radiació ultraviolada procedent del Sol, un efecte positiu de l'exposició de la pell a la radiació ultraviolada de tipus B (UVB).



➤ Aplicacions mèdiques

- ✓ En medicina la radiació ultraviolada pot ser utilitzada per al tractament de la pell afectada per psoriasi o vitiligen.

➤ **EFFECTES NOCIUS**

L'exposició a la radiació UVB pot provocar alteracions a l'atzar en l'ADN, és a dir, mutacions, per tant, augmenta la probabilitat de patir algun tipus de càncer de pell; a més a més, pot alterar les substàncies químiques presents a l'atmosfera.

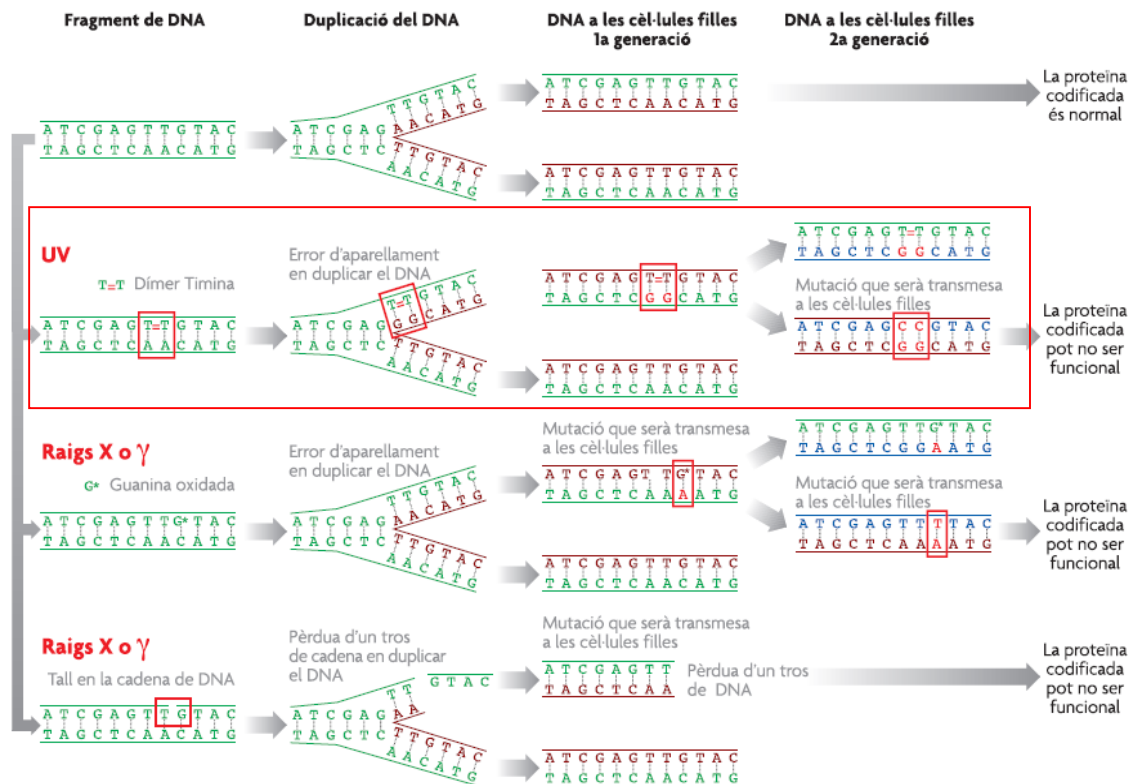
L'exposició a la radiació UVA no afecta directament l'ADN com els UVB o UVC però poden crear intermediaris químics altament reactius com radicals lliures, radicals hidroxils i altres espècies reactives de l'oxigen que poden danyar l'ADN. A més a més, també pot provocar cremades i cataractes.

En el que volem centrar-nos nosaltres és en la llum ultraviolada des d'un punt de vista de les mutacions.

La radiació ultraviolada té un comportament mutagènic molt fort, tant, que pot provocar que s'alteri una proteïna amb una determinada funció reguladora amb la conseqüència que aquesta proteïna deixi de funcionar i, per tant, la reacció que regula no es produeixi correctament. Però la cèl·lula pot produir noves molècules "correctes" d'aquesta proteïna i, per tant, si l'exposició a la radiació no continua, les conseqüències no poden ser gaire greus. Però que passa si hem aconseguit produir alteracions en la molècula de DNA? El DNA és la molècula on està codificada la informació necessària per tal de produir les diferents proteïnes de la cèl·lula i, per tant, si s'altera el DNA (hi introduïm mutacions), totes les noves còpies d'aquesta proteïna es produiran de manera errònia.



Imatge explicativa:



Imatge 2 : conseqüències de estar exposat a la radiació ultraviolada

Font: <http://metode.cat/Revistes/Monografics/Radiacions/Efectes-biologics-de-les-radiacions-electromagnetiques-d-alta-energia>

Com podem veure en la imatge, la mutació que provoca la radiació ultraviolada és la formació de dímers de timina que succeeix quan els mecanismes de reparació no aconsegueixen reparar el dany.

En impactar els fotons de llum ultraviolada en el DNA es formen enllaços covalents entre dues timines consecutives de la mateixa cadena del DNA. Com es pot imaginar fàcilment, això provocarà que aquestes bases no puguin aparellar-se correctament quan aquest DNA s'hagi de replicar, i per tant es produiran errors. Això afavorirà l'aparició de formes tautomèriques, mutació gènica de tipus transicions.



Això és el que acostuma a passar quan el període d'exposició no és molt llarg; quan sí que ho és, les cèl·lules acaben morint per apoptosi, és a dir, mort programada per la pròpia cèl·lula (suïcidi).

❖ EL CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular comprèn el període de temps que va de que es forma la cèl·lula fins que es divideix i genera noves cèl·lules.

Es diferencien dues etapes: una etapa inicial de llarga durada, la **interfase** i una etapa final curta anomenada **divisió**.



Imatge 3 : cicle cel·lular

Sílvia Peret

LA INTERFASE

És una etapa de no divisió que consta de tres fases en les que el nucli s'anomena interfàsic i no canvia de forma.

➤ Fase G₁:

En aquesta fase es produeix la síntesi de l'ARNm i per tant, de proteïnes. La cèl·lula presenta un sol diplosoma. La durada, a diferència de les altres fases, varia segons el tipus de cèl·lula però en un cicle vital de 24 hores aquesta fase duraria 11 hores.

En la fase G₁ s'hi distingeix un moment de no-retorn, anomenat punt de restricció on es comencen a manifestar alguns gens concrets, per la qual cosa al final es transformen en cèl·lules especialitzades.



- **Fase S:** És la fase en la que es produeix la duplicació del DNA; per això, quan posteriorment el DNA es condensi per formar els cromosomes, aquests en lloc de constar d'una sola molècula de DNA, és a dir, d'una cromàtide, constaran de dues cromàtides unides pel centròmer. En aquesta fase a més, continua la síntesi de RNAm i proteïnes.

Juntament amb cada centríol es forma un esbós de centríol anomenat procentríol.
En un cicle vital de 24 hores aquesta fase duraria unes 8 hores.

- **Fase G₂:** Aquesta fase s'inicia quan acaba la síntesi de DNA i finalitza en el moment en que ja es comencen a distingir els cromosomes. Continua la síntesi d'RNAm i de proteïnes, sobretot de l'histona H1, que permet la formació de la fibra de 300Å i de les proteïnes que formaran els microtúbuls del fus mitòtic. Al final d'aquesta fase, la cèl·lula ja conté dos diplosomes immadurs.

En un cicle vital de 24 hores aquesta fase duraria unes 4 hores.

LA DIVISIÓ CEL·LULAR O FASE M

És el procés mitjançant el qual, a partir d'una cèl·lula mare, neixen dues cèl·lules filles amb idèntica dotació cromosòmica que la progenitora. La divisió cel·lular comprèn la divisió del nucli o cariocinesi i la divisió del citoplasma o citocinesi.

- Mitosi

És el tipus de divisió nuclear que es produeix quan s'han de generar cèl·lules amb el mateix nombre de cromosomes que la cèl·lula mare.

En els éssers diploides es pot definir com el procés mitjançant el qual d'una cèl·lula amb 2n cromosomes s'obtenen dues cèl·lules amb també 2n cromosomes, en que "n" és el nombre de tipus diferents de cromosomes.

1 (2n) → 2 (2n)

La mitosi s'ha dividit en quatre fases anomenades:



Profase:

S'inicia quan es comencen a visualitzar els cromosomes, és a dir, quan les dues fibres de DNA s'enrotllen sobre si mateixes per constituir un cromosoma de dues cromàtides anomenat cromosoma profàsic.



Imatge 4: profrase

Metafase:

És la fase en què, a causa de les tensions generades per les fibres cromosòmiques, els cromosomes queden equidistants als dos complexos centriolars, es col·loquen a la meitat del fus mitòtic i constitueixen la placa equatorial.



Imatge 5: metafase

Anafase:

Comença quan els centròmers duplicats de cada parell de les cromàtides germanes se separen; les noves es van movent als pols oposats de la cèl·lula a causa de l'acció de fus.



Imatge 6: anafase

Telofase:

Comença quan les dues dotacions cromosòmiques s'han agrupat en dues masses, situades als pols del fus mitòtic, i acaba quan aquestes queden envoltades d'un embolcall nuclear, és a dir, quan es formen els dos nuclis fills.



Imatge 7: telofase



- Citocinesi

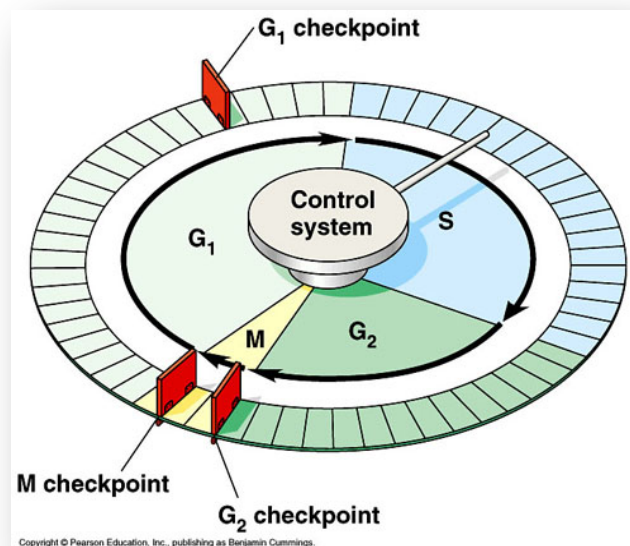
És la divisió del citoplasma. Pot produir-se de dues maneres: per estrangulació del citoplasma, que es dóna en les cèl·lules dels animals, o per formació d'un septa intracel·lular, que es dóna en cèl·lules vegetals.

En el cicle cel·lular també podem diferenciar els anomenats "punt de control" que són mecanismes que verifiquen que es compleixen les condicions necessàries per permetre el pas d'una fase del cicle cel·lular a una altra, impedit així que certs esdeveniments com danys en l'ADN transcendeixin al llarg del cicle.

Distingim entre tres punts de control:

+ **Punt de control G1:**

En aquest punt el sistema de control de la cèl·lula engegarà el procés que inicia la fase S. El sistema avaluarà la integritat de l'ADN (que no aquest danyat), la presència de nutrients en l'entorn i la grandària cel·lular. És en aquest punt on actua el complex actiu conegut com a factor promotor de la fase S.



Imatge 8: diferents punts de control en el cicle cel·lular

Font: <http://ashie97.weebly.com/reassessments.html>

+ **Punt de control G2:**

En ell s'engega el procés que inicia la fase M. És el punt on es comprova que tot el material genètic (ADN) està duplicat de forma correcta i si l'entorn de la cel·lular és favorable i la cèl·lula prou gran per a dividir-se.



✦ **Punt de control de la Metafase:**

Verifica si els cromosomes estan alineats en el fus mitòtic abans d'entrar a l'anafase. És el punt de control responsable de que no hi hagi pèrdues o guanys de cromosomes i es controlat pel complex APC.

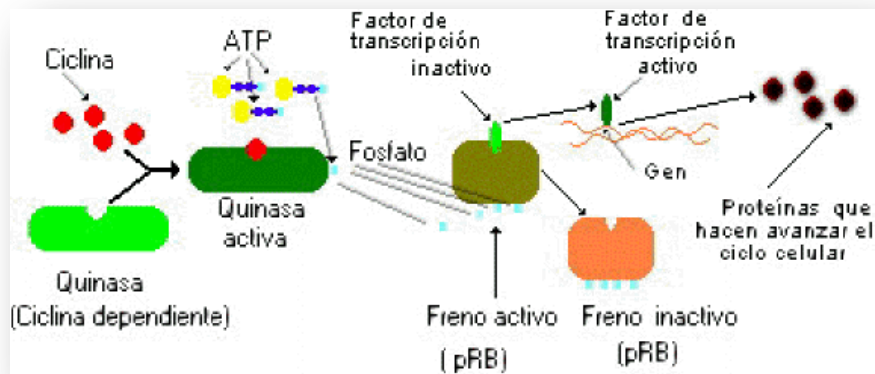
A més a més el cicle cel·lular també disposa d'unes proteïnes citoplasmàtiques encarregades de controlar-lo.

Distingim:

• **Les ciclines:**

La seva concentració varia de forma cíclica segons el transcurs del cicle cel·lular. Distingim entre les ciclines de G1 i les ciclines mitòtiques. Les primeres són necessàries que

a superar el punt G1 i passar a la fase S, en canvi, les segones són necessàries per a superar el punt control G2 i que s'iniciï la mitosi.



Imatge 9: proteïnes citoplasmàtiques reguladores

Font: http://www.biologia.edu.ar/cel_euca/regulacion.htm

• **Les cinases:**

Són dependents de les ciclines; es tracta d'enzims que fosforilen determinades proteïnes que alhora desencadenen processos subordinats del cicle cel·lular. S'activen només quan s'uneixen a les ciclines per formar complexos i poder donar pas a la següent fase del cicle cel·lular.



- **El Complex Promotor de l'Anafase (APC):**

L'APC és el complex encarregat de permetre a les cromàtides germanes separar-se i iniciar la degradació de les ciclins mitòtiques.

❖ ELS AGENTS MUTAGENS I LES MUTACIONS

En aquest treball, ja que estudiem com afecten uns certs agents mutàgens sobre cèl·lules de llevat i mirem si provoca mutacions en el seu ADN, serà molt important saber què són els agents mutàgens, quins tipus hi ha i sobretot, què són les mutacions.

- **Agent mutàgen:**

Què és?

És un agent físic o químic que altera o canvia la informació de l'ADN d'un organisme i això augmenta sensiblement la freqüència de mutacions per sobre del nivell natural.

Tipus:

Podem distingir entre:

- ✓ **Mutàgens químics:** són compostos químics capaços d'alterar les estructures de l'ADN de forma brusca, com per exemple el àcid nitrós (agent desaminizant), brominats i alguns dels seus compostos.
- ✓ **Mutàgens físics:** són radiacions que poden alterar la seqüència i estructura de l'ADN. Són exemples la radiació ultraviolada, que origina dímers de timina, i la radiació gamma i la alfa que són ionitzants.

A més a més, podem trobar altres agents com, els mutàgens biològics, per exemples els virus que poden alterar la seqüència del material genètic; altres factors que no són agents mutàgens però determinen si una mutació tindrà lloc o no, com per exemple la



temperatura, l'envelliment i finalment, mutàgens que resulten de substàncies no carcinògenes metabolitzades com per exemple el benzopirè.

- **Mutacions:**

Les mutacions són alteracions a l'atzar del material genètic (ADN a les cèl·lules i ADN o ARN als virus).

Normalment signifiquen deficiències i a més a més poden arribar a ser letals.

En general són recessives i queden amagades.

Malgrat que normalment són negatives per a l'individu, comporten un aspecte positiu per a l'espècie, ja que aporten variabilitat a la població. Això permet que, si es produeix un canvi en l'ambient i les noves condicions són molt adverses per als individus normals, resistència d'individus mutants fa que n'hi pugui haver alguns que suportin aquestes condicions i, gràcies a aquests, l'espècie no s'extingeixi. Així doncs, les mutacions permeten l'evolució de les espècies.

No totes les mutacions són causades per mutàgens. Hi ha mutacions espontànies degudes a errors en la reparació i la recombinació de l'ADN.

Segons el **tipus de cèl·lules** on es produeixen, tenim:

- ✓ **Mutacions somàtiques:** afecten a cèl·lules somàtiques. En aquest cas tret que es converteixin en cèl·lules cancerígenes, no tenen gaire importància, ja que si les cèl·lules no són viables, es poden substituir per altres cèl·lules, i si són viables, com que es divideixen per mitosi, donen lloc a una colònia o un clon de cèl·lules mutants a la primera, sense cap altra complicació
- ✓ **Mutacions germinals:** en aquest cas sí que són transcendents ja que totes les cèl·lules del nou organisme tindran la mateixa informació que la cèl·lula zigot.

- **Tipus:**

1. **Mutacions gèniques** (alteracions de la seqüència de nucleòtids d'un gen).
2. **Mutacions cromosòmiques** (alteracions de la seqüència de gens d'un cromosoma).
3. **Mutacions genòmiques** (alteracions del nombre de cromosomes).



1. GÈNIQUES: són alteracions en la seqüència de nucleòtids d'un gen. Per això també s'anomenen puntuals. Segons el tipus d'alteració:

- **Mutacions per substitucions de bases:**

Són canvis d'una base per una altra.

1. Transicions. Substitucions d'una base per una altra igual, és a dir, una purina per una altra, o una pirimidina per una altra.
2. Transversions. Substitucions d'una base per una altra de diferent, és a dir, una purina per una pirimidina.

- **Mutacions per pèrdua o inserció de nucleòtids.**

Aquestes mutacions s'anomenen deleccions o addicions, respectivament. Com que el missatge genètic es tradueix de tres en tres, les deleccions o addicions, tret que es compensin, entre si, produeixen un corriment en l'ordre de lectura i, per tant, alteren tots els triplets següents. Les conseqüències que comporten solen ser greus.

	ADN	ARNm	Aminoàcido	Consecuències
Original	-A-C-A-	-U-G-U-	Cys	Ninguna, pues el codón codifica el mismo aminoácido
Mutado	-A-C-G-	-U-G-C-	Cys	
Original	-A-C-A-	-U-G-U-	Cys	Sustitución de un aminoácido por otro, pues el codón codifica un aminoácido distinto.
Mutado	-A-C-C-	-U-G-G-	Trp	
Original	-A-C-A-	-U-G-U-	Cys	Generación de una señal de stop.
Mutado	-A-C-T-	-U-G-A-	Stop	

Imatge 10: conseqüències mutació gènica

Font: <http://www.slideshare.net/ciencias.mon.contemporani/mutacions>

2. CROMOSÒMIQUES: són les mutacions que provoquen canvis en l'estructura interna dels cromosomes.



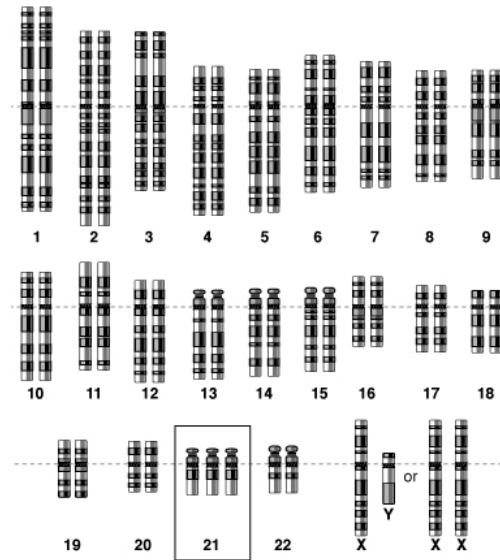
Tipus:

- **Deleció:**

És la pèrdua d'un fragment del cromosoma. Si el fragment conté una gran quantitat de gens, la deleció pot tenir conseqüències patològiques o fins i tot letals.

- **Duplicació:**

És la repetició d'un segment d'un cromosoma. Les duplicacions permeten augmentar el material genètic i, gràcies a mutacions posteriors, poden determinar l'aparició de nous gens durant el procés evolutiu.



Imatge 11: mutació cromosòmica

Font:

http://es.wikipedia.org/wiki/Mutaci%C3%B3n_cromos%C3%B3mica

- **Inversió:**

És el canvi de sentit d'un fragment en el cromosoma. Les inversions no solen comportar perjudicis a l'individu però sí als descendents si durant la meiosis es produeix un encreuament dins de la inversió.

- **Translocació:**

És el canvi de posició d'un segment de cromosoma. Les translocacions no solen perjudicar l'individu que les ha sofert però sí a la descendència, ja que aquesta pot heretar un cromosoma incomplet o amb duplicacions.

3. GENÒMIQUES: Són les alteracions en el nombre de cromosomes propi d'una espècie.

Tipus:



- **Aneuploïdia:**

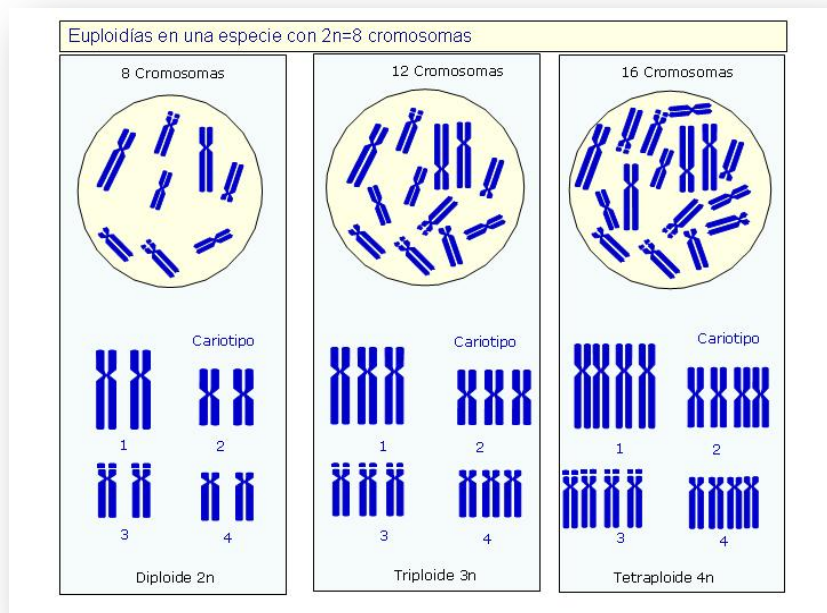
És l'alteració en el nombre normal d'exemplars d'un o més tipus de cromosomes, sense arribar a afectar el joc complet.

- **Euploïdia.**

És l'alteració en el nombre normal de dotacions haploides d'un individu.

La monoploïdia o haploïdia és l'existència d'una sola dotació cromosòmica, és a dir, un sol exemplar de cada tipus de cromosoma.

La poliploïdia és l'existència de més de dos jocs complets de cromosomes, és a dir, més de dos exemplars de cada tipus de cromosoma.



Imatge 12: tipus mutació genòmica

Font: <http://www.slideshare.net/ciencias.mon.contemporani/mutacions>



REPARACIÓ DE L'ADN

És un conjunt de processos pels quals una cèl·lula identifica i corregeix danys fets a les molècules d'ADN que en codifiquen el genoma.

La velocitat de la reparació de l'ADN depèn de molts factors, com ara el tipus de cèl·lula, la seva edat, i l'ambient extracel·lular. Una cèl·lula que hagi acumulat una gran quantitat de danys a l'ADN, o que no pugui reparar eficaçment els danys produïts al seu ADN, pot entrar en un de tres estats possibles:

- Un estat de repòs irreversible, conegut com a envelliment.
- El suïcidi cel·lular, conegut també com a apoptosi o mort cel·lular programada.
- Una divisió cel·lular no regulada, que pot dur a la formació d'un tumor cancerigen.

La capacitat de reparació de l'ADN és vital per la integritat del seu genoma, i per tant, del seu funcionament normal i el de l'organisme. En el cas de molts dels gens que s'havia demostrat que influïen en la longevitat, més tard s'ha revelat que tenen un paper en la reparació i protecció de l'ADN. La incapacitat de corregir lesions moleculars en les cèl·lules que formen gàmetes poden introduir mutacions en el genoma dels seus descendents, influint en el ritme de l'evolució.

MECANISMES DE REPARACIÓ

Les cèl·lules no poden funcionar si els danys a l'ADN corrompen la integritat i accessibilitat d'informació essencial en el genoma.

Segons el tipus de danys s'utilitzarà un mecanisme de reparació o un altre.

Distingim sis mecanismes:

➤ *REPARACIÓ DIRECTA*

Es tracta d'un sistema de reparació que no requereix eliminació de nucleòtids o bases nitrogenades, sinó que s'empren enzims per revertir directament els danys. No requereixen la síntesi de DNA per a tenir-ne una plantilla, per tant, els danys que reparin només podran tenir lloc en una de les quatre bases.



➤ *REPARACIÓ PER ESCICIÓ*

Es tracta dels sistemes de reparació dels danys produïts en una sola cadena de la doble hèlix, de manera que es pot utilitzar l'altra cadena complementària com a motlle per a corregir la cadena danyada. Per tal de reparar danys a una de les molècules aparellades d'ADN, existeixen diversos mecanismes de reparació d'excisions, que eliminen el nucleòtid danyat i el substitueixen amb un nucleòtid intacte complementari al que es troba a la cadena d'ADN no danyada.

- Reparació per excisió de base (BER)
- Reparació per excisió de nucleòtid (NER)

➤ *REPARACIÓ DE MALAPARELLAMENT*

Aquest sistema de reparació corregeix els aparellament erronis. Una DNA polimerasa identifica el lloc de on s'ha produït l'error. Talla la cadena de DNA no metilada i l'elimina. La DNA polimerasa III emplena el "buit" i la DNA ligasa lliga la cadena de DNA final.

➤ *REPARACIÓ DE DOBLE CADENA*

Repara els trencaments de la cadena doble, en que ambdues cadenes de la doble hèlix queden trencades. Hi ha dos tipus de mecanismes que eviten el trencament dels cromosomes:

- Unió no homòloga d'extrems: Els extrems trencats es juxtaposen i es lliguen, generalment suposa la pèrdua d'un o diversos nucleòtids en el lloc d'unió.
- Per recombinació (Unió homòloga d'extrems): S'utilitza l'altre cromosoma per reparar sense pèrdua de nucleòtids. És molt freqüent en llevats.

➤ *SISTEMA SOS*

Si per l'acció prolongada d'un agent mutagen important es produeix un nombre elevat de faltes o alteracions de bases nitrogenades en el filament patró, pot ser que s'iniciï la duplicació sense que els mecanismes de reparació haguin acabat d'arreglar-les. Per evitar que la duplicació no quedi paralitzada ja que el DNA polimerasa tan sols reconeix A, T, C i G, hi ha un sistema enzimàtic, anomenat enzims correctors del sistema

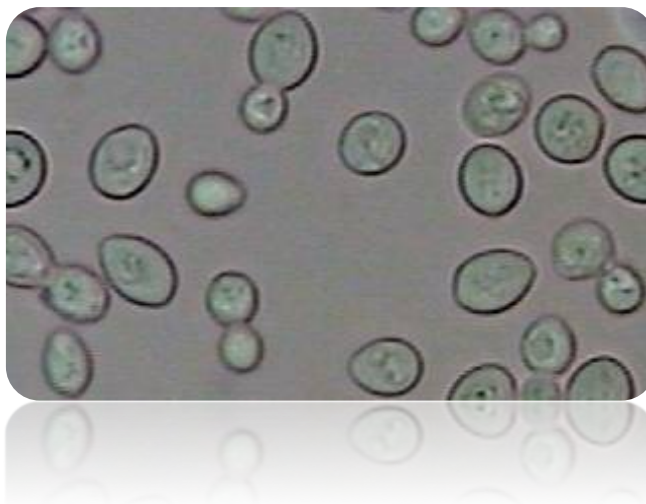


SOS, que elimina aquest bloqueig però a costa d'introduir una base complementària a l'atzar i per això molt probablement errònia, de manera que s'evita el bloqueig de la replicació però s'originen cèl·lules filles amb moltes mutacions.

➤ *SISTEMES DE TOLERÀNCIA*

La síntesi de translació és un procés de tolerància dels danys a l'ADN que permet als mecanismes de replicació de l'ADN replicar antigues lesions de l'ADN com ara dímers de timina o llocs AP. Implica la substitució d'ADN polimerases normals per polimerases de translació especialitzades.

❖ **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**



Imatge 13: Saccharomyces Cerevisiae

Beatriu Escudero

Què és?

És un fong unicel·lular, un tipus de llevat utilitzat industrialment en la fabricació de pa, cervesa i vi. És un dels organismes del model eucariòtic més estudiat en la biologia molecular. Es tracta d'una cèl·lula eucariòtica senzilla composta per una paret cel·lular rígida, presència de mitocondris i absència de cloroplasts.

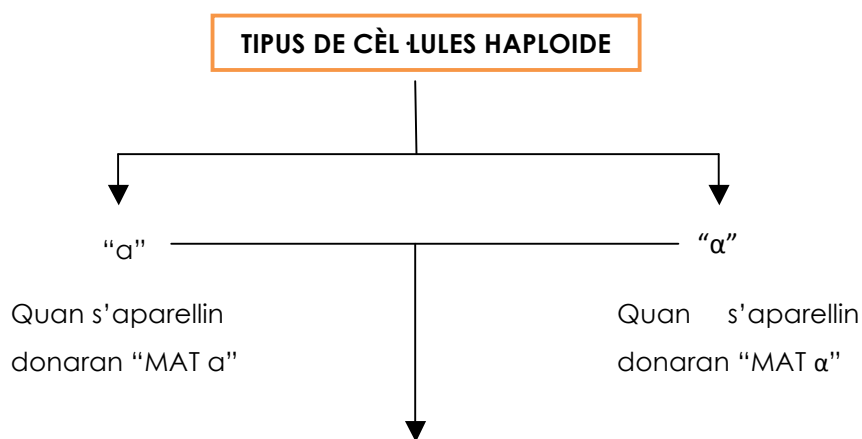


Com s'aparellen?

Com hem dit abans, *Saccharomyces cerevisiae* pot existir en estat haploide o diploide.

La diferència que hi ha entre els dos tipus sexuals de llevat és un locus, que s'anomena MAT i és el responsable del comportament sexual entre cèl·lules haploides i diploides.

L'aparellament només pot succeir en cèl·lules haploides de diferent sexe.



Es poden aparellar-se donant lloc a una soca diploide: "MAT a/α".

- ❖ "MAT a / □" és estable sota moltes condicions i quan exposem aquesta soca sota unes altres condicions pot entrar en meiosi i donar quatre progenitors haploides.

Canvis sexuals en els llevats:

Els únics llevats que poden canviar de sexe són els llevats haploides; només tenen aquesta capacitat quan es troben en un medi on només hi ha la presència del seu mateix sexe, és a dir, un medi en absència del sexe contrari.

El gen que determina el canvi de sexe és el gen HO; per aquest motiu, quan els llevats es troben en condicions normals aconseguixen generar una propagació estable de qualsevol dels tipus cel·lulars dels haploides; d'aquesta manera, mai s'arriben a formar cèl·lules diploides.



L'explicació del canvi de sexe dels llevats és degut a que els llevats tenen còpies del locus MAT que no es manifesten però quan es produeix el canvi de sexe dels llevats, hi ha un reemplaçament gènic del locus MAT per una de les còpies addicionals, que s'anomenen HML i HMR.

Ús:

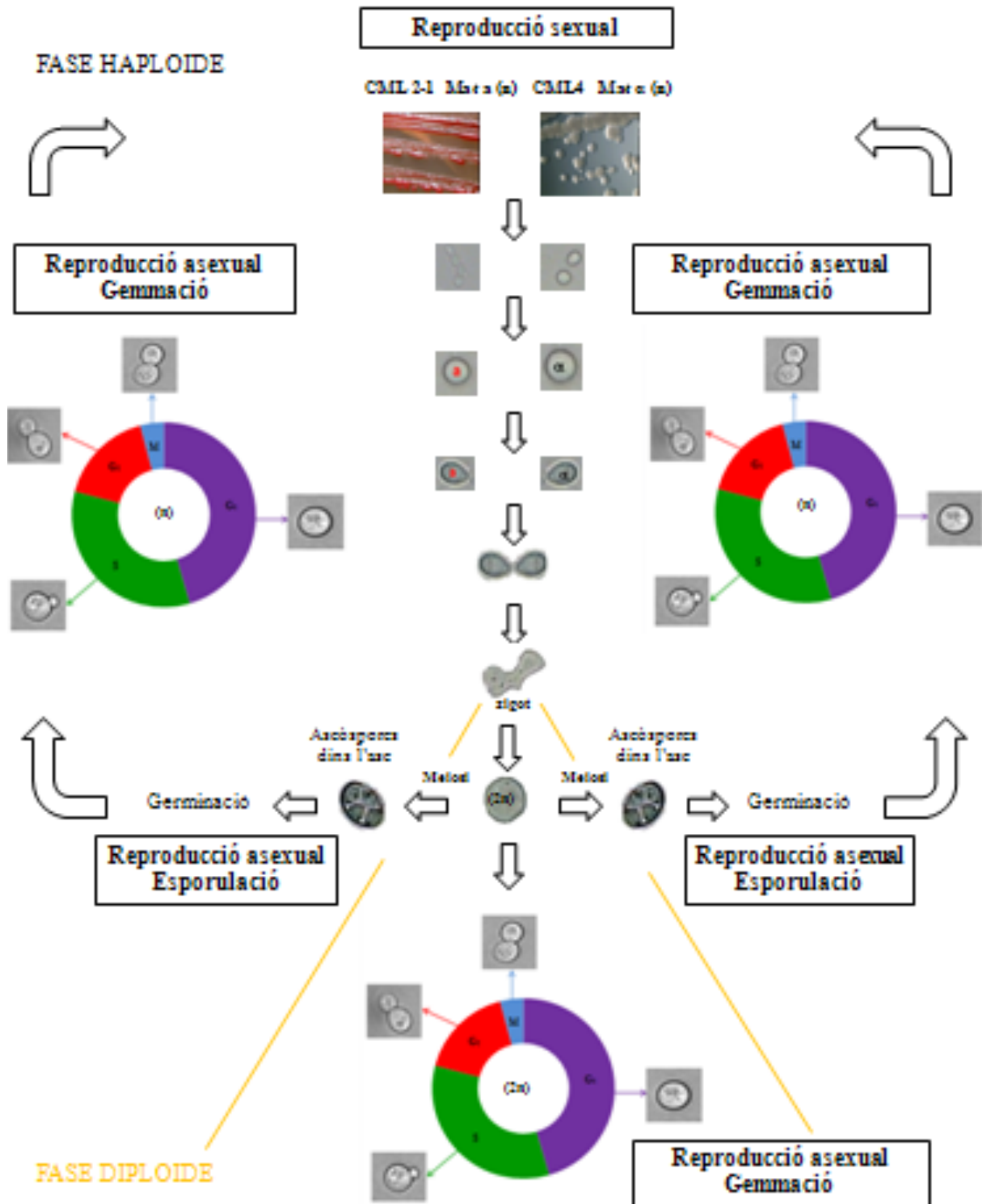
Les utilitats industrials més importants d'aquest llevat són la producció de cervesa, pa i vi, gràcies a la seva capacitat de generar diòxid de carboni i etanol durant el procés de fermentació. Bàsicament aquest procés es duu a terme en un medi ric en sucre (com la D-glucosa). En condicions d'escasses de nutrients, el llevat utilitza altres rutes que permeten obtenir un major rendiment energètic, i per tant no realitza la fermentació.

Cicle de vida

El cicle de vida dels llevats alterna dos formes, una haploide i una altra diploide, per tant són diplohaploides. Ambdues formes es reproduïxen de forma asexual per gemmació, que és quan la gemma va augmentant de tamany fins a arribar un punt en què s'ha de separar de la cèl·lula parental.



CICLE BIOLÒGIC HAPLODIPLONT SACCHAROMYCES CEREVISIAE





Soques de *Saccharomyces Cerevisiae*

Una soca és una població genèticament uniforme d'organismes. No hi ha una "soca salvatge" o de referència habitual; entre les més habituals, trobem la que utilitzarem en aquest treball, la soca W303. Malgrat que és un organisme model, se sap poc sobre els seus orígens genètics ja que va ser creat en la dècada de 1970 a partir de creuar ceps de llevat.

Se sap que contenen diverses mutacions útils (*leu2*, *ura3*, *ade1*, etc.) que permeten la selecció quan es transformen amb plasmidis o altres fragments de DNA que contenen gens salvatges corresponents, però sovint també d'altres no tan evidents, que fan que el seu comportament pugui diferir molt. Per exemple, la mutació de certs gens en determinats fongs genètics "salvatges" pot arribar a ser letal (seria el cas de la radiació ultraviolada sobre *Saccharomyces*), mentre que en d'altres té efectes molt menys dramàtics.

Per què ens interessa *Saccharomyces Cerevisiae*?

El que ens interessa de *Saccharomyces* en aquest treball és la seva importància científica, biològica i sobretot, el seu paper en la investigació ja que això ens permetrà dur a terme la nostra pròpia investigació.

El fet pel qual té una gran importància biològica és perquè els seus cultius es reproduïen ràpidament i tenen una gran facilitat per aïllar mutants, a més a més, tenen un sistema senzill de transformació de l'ADN. Cal afegir que coneixem la seqüència completa del seu genoma, de tal manera que s'han pogut modificar quasi 6600 gens que el codifiquen.

A més a més, un dels fets més importants pel qual ens interessa és que la fase haploide permet generar, aïllar i caracteritzar mutants amb molta facilitat.



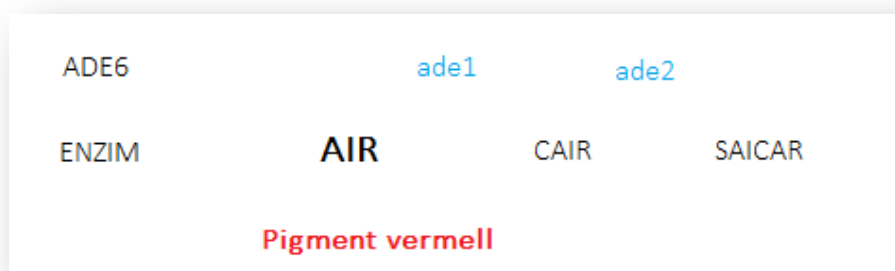
❖ VIA METABÒLICA DE L'ADENINA

Hi ha gens que codifiquen determinats enzims (proteïnes amb propietats catalítiques). Aquests actuen catalitzant reaccions d'una ruta metabòlica de biosíntesi. Si es produeix alguna mutació en aquests gens s'impedeix el funcionament correcte dels enzims i consegüentment, s'interromp la via metabòlica que aquests catalitzen.

Els llevats silvestres poden sintetitzar adenina a través d'una via metabòlica a partir de compostos simples (protòtrofs), és a dir, no requereixen d'altres elements nutritius diferents als del tipus silvestre del qual en deriven, així doncs no els hi ha falta créixer en un medi ric. En la via metabòlica de la adenina hi han varis passos, i en cadascun d'aquests un enzim converteix un substrat en producte.

Una mutació en un dels gens de la via metabòlica de l'adenina impedirà que aquesta es pugui sintetitzar i per tant, el medi haurà d'incorporar adenina (auxòtrof) de manera que pugui créixer en un medi pobre amb adenina o bé, en un medi ric.

La mutació provocarà que s'acumulin intermediaris de la via metabòlica.



Imatge 14 : acumulació pigment vermell en la via metabòlica de l'adenina

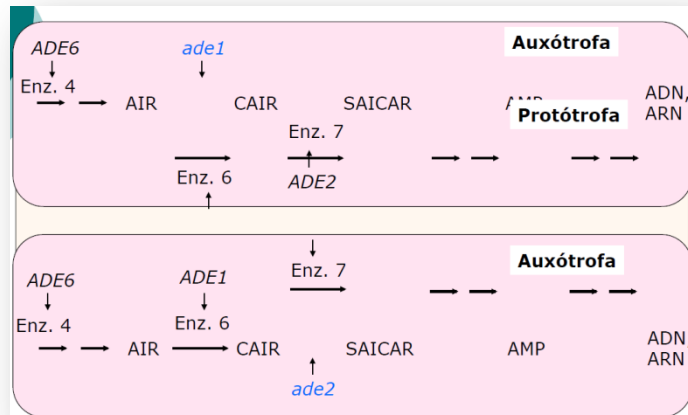
Font: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/14817/1/practica3RUA.pdf>

Una soca haploide només té un al·lel a cada gen. Si aquesta es auxòtrofa, és a dir, ha d'agafar el substrat del medi ja que no el pot sintetitzar, haurà d'agafar adenina del medi per poder créixer.



Si dos soques haploides auxòtrofes es conjuguen, el diploide resultant combina els gens de les dues i pot ser:

- **Protòtrof:** les mutacions de les estripes haploides es troben en diferents gens i per tant, al ser recessives les mutacions hi ha complementació.
- **Auxòtrof:** les mutacions de les estripes haploides es troben en el mateix gen i per tant, no hi ha complementació.



Imatge 15 : conjugació d'auxòtrofes

Font: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/14817/1/practica3RUA.pdf>



COM SABREM QUE LES NOSTRES CÈL·LULES DE LLEVAT HAN MUTAT?

Un cop ja sabem la teoria del què és una mutació i com afecta, el més important per aquest treball és saber què hem de buscar per comprovar que el que veiem en els resultats es tracta d'una mutació.

Doncs bé, aprofitant que s'han dut a terme investigacions, nosaltres partim de la bibliografia "Detectar Carcinògens: El Test de Ames" que l'hem extret de la font: <http://www.cancerquest.org/es/detecting-carcinogens-ames-test.html>

Durant dècades, els científics metges han intentat identificar les substàncies químiques carcinògenes. Aquesta tasca no ha estat fàcil; durant el temps que dura una vida, estem exposats literalment a milions de compostos químics, tant naturals com sintètics. Esbrinar propietats carcinògenes de cada un d'aquests compostos hagués requerit extenses proves en animals, molts anys i milions de diners. Però, pot haver una forma d'accelerar el procés,



una prova senzilla i econòmica per identificar carcinògens; es tracta d'una prova desenvolupada per Bruce Ames, bioquímic de la Universitat de Califòrnia. La prova d'Ames es basa en la teoria que els carcinògens danyen els àcids nucleics, causen mutacions i, per tant, indueixen càncer. Els bacteris no contrauen càncer, però són vulnerables a les mutacions. Ames utilitza una barreja de quatre mutants del bacteri *Salmonella tipimurium* incapaços de produir l'aminoàcid histidina.

Nosaltres en canvi, treballarem amb *Sacharomyces*, és a dir, amb cèl·lules haploide i amb l'aminoàcid adenina. Partim de la soca adenina⁻ (W303) de *Saccharomyces* que forma colònies vermelles ja que té una mutació en la via metabòlica que li permet fabricar adenina, el metabòlit intermedi que s'acumula, en no poder acabar de realitzar la síntesi, és un producte de color vermell. Si les colònies es sotmeten a un agent mutagen, pot produir-se una mutació en altres enzims d'aquesta via metabòlica, per la qual cosa no es fabricarà el metabòlit vermell i les nostres colònies seran blanques.

Algunes de les mutacions "blanques" que sorgeixen en les soques vermelles són més blanques que altres. En contrast amb aquelles que són el color crema de llevat normal, alguns són blanc gairebé pur. Aquests mutants blancs purs també formen colònies més petites i són anomenades colònies mutants "petite", o simplement "Petites". La majoria d'aquestes soques tenen algun tipus de defecte en els seus mitocondris. Les Petites obtenen energia mitjançant la fermentació de certs tipus de sucres i no poden realitzar el metabolisme aeròbic a causa de que els seus mitocondris no són funcionals. És possible identificar Petites utilitzant un tipus especial de medi de creixement que conté només sucres no fermentables.

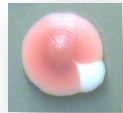
Finalment, hi ha una petita possibilitat que un *ade1* o mutació *ade2* puguin revertir i tornar a la seva seqüència d'ADN normal.

Cada vegada que ocorre una mutació, tota la progènie d'aquesta cèl·lula mutant també ho serà. És a dir, els mutants es produeixen com clons en una colònia.

Estudis recents amb la prova d'Ames mostren no només si es mutagen sinó que també si és carcinogen. Les proves indiquen que algunes substàncies químiques i la radiació en l'ambient danyen el DNA. Durant tota una vida l'acumulació d'aquest dany provoca la major part dels tipus de càncer en éssers humans.



EXPERIMENTANT AMB *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*



CÀLCULS I ESTUDIS

PRELIMINARS



El que anem a fer en aquests estudis preliminars és familiaritzar-nos en la metodologia necessària per a realitzar la nostra investigació posterior.

*En primer lloc hem d'esbrinar com obtenir colònies fresques, així com aprendre a calcular el nombre de cèl·lules que hi ha en una colònia de *Saccharomyces* per saber quantes dilucions haurem de fer per sembrar la quantitat correcta de llevats. A més a més, treballarem amb el peròxid d'hidrogen amb el que intentarem demostrar si es tracta d'un agent mutagen i així poder veure com afecten les mutacions a les cèl·lules de *Saccharomyces*.*

OBTENCIÓ DE COLÒNIES QUE ESTIGUIN FRESQUES

DISSENY EXPERIMENTAL

➤ UTILLATGE

Durant tota la part pràctica d'aquest treball utilitzarem quasi sempre el mateix utillatge, només en altres protocols serà necessari algun material específic, en cas que sigui així afegirem la seva descripció; de la resta només indicarem el seu nom.

Respecte les fotografies que aniran sortint en la part pràctica del treball han estat realitzades per mi o per la meua tutora Mercè del Barrio Arranz. En cas que siguin d'algun altre autor, serà anomenat

✓ Bec de Bunsen



Imatge 16

✓ Etanol



Imatge 17

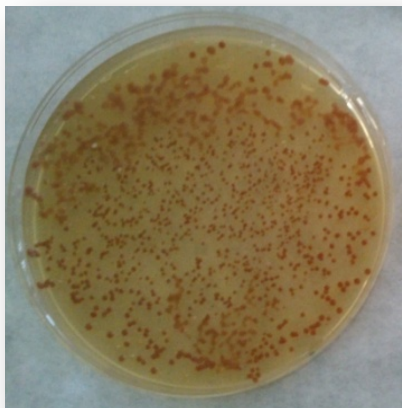
✓ Nansa de sembra rodona



Imatge 18

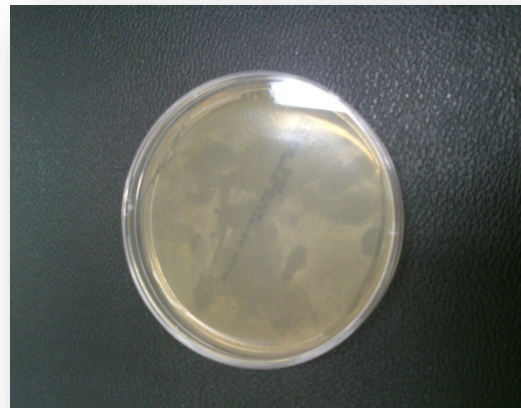


- ✓ Placa amb colònies vermelles antigues



Imatge 19

- ✓ Placa amb medi de cultiu YPD

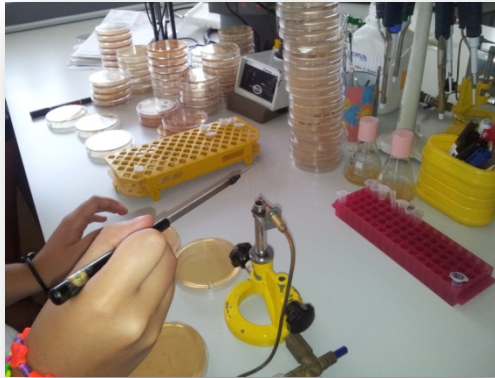


Imatge 20

➤ PROCEDIMENT:

Partim d'una placa amb una soca de *Saccharomyces Cerevisiae* (W303) facilitada per la Doctora Maria Àngeles de la Torre del departament Senyalització de llevats -GSL de l'IRB. A partir d'aquí:

1. Esterilitzem la nansa de sembra rodona primer amb l'etanol i després amb el Bec de Bunsen, escalfant-la fins que es fiqui roja; així successivament fins a tres cops.
2. A continuació, agafem amb la nansa una colònia vermella i l'escampem a la placa amb medi de cultiu YPD fent ziga-zaga primer a un cantó, després a l'altre i finalment escampar per la resta de la placa.
3. Deixem incubar entre 3 i 4 dies i després guardem la placa a la nevera.



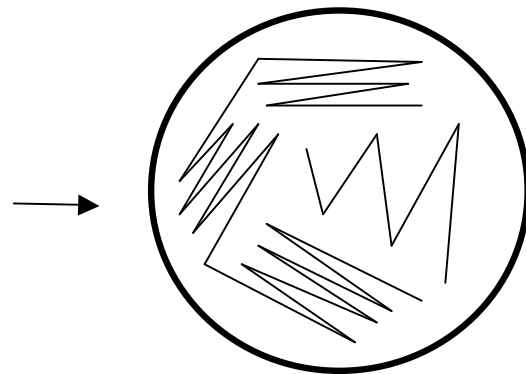
Imatge 21: esterilitzant la nansa



Imatge 22: agafant colònies



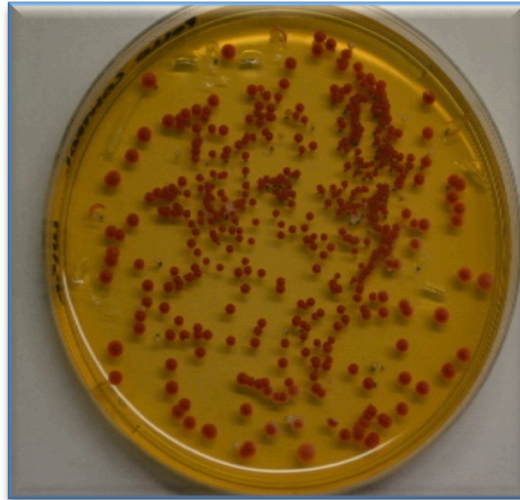
Imatge 23: sembrant en ziga-zaga



DIBUIX DE SEMBRAR EN ZIG -ZAG



RESULTATS OBTINGUTS, ANÀLISI I DISCUSSIÓ



Imatge 24: colònies vermelles fresques



METODOLOGIA

DISSENY EXPERIMENTAL

CÀLCUL DEL NOMBRE DE CÈL·LULES EN DIFERENTS COLÒNIES

➤ UTILITATGE:

- ✓ Plaques amb colònies grans, petites i mitjanes de *Saccharomyces*.



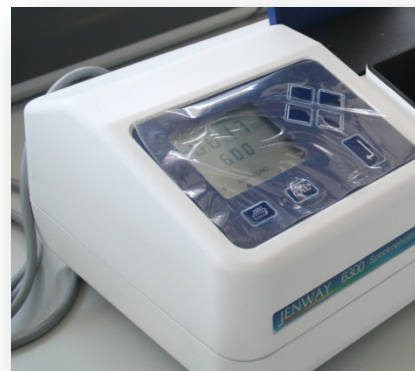
Imatge 25

- ✓ Eppendorfs estèrils



Imatge 26

- ✓ Espectofotòmetre



Imatge 27



- ✓ Pipeta de 100-1000 μ (blava)



Imatge 28

- ✓ Pipeta de 10-100 μ (arosa)



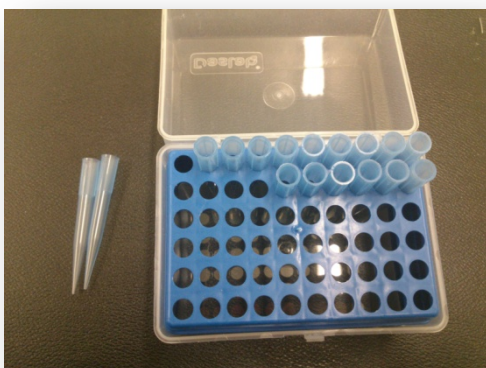
Imatge 29

- ✓ Cubetes



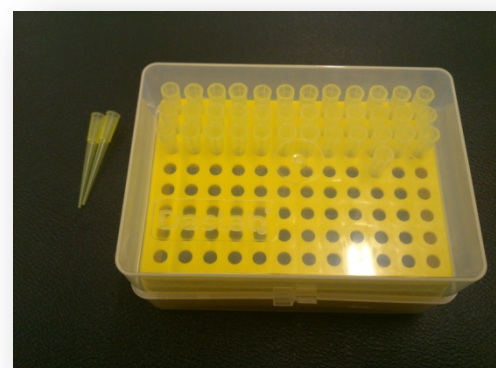
Imatge 30

- ✓ Punttes pipeta de 100-1000 μ (blava)



Imatge 31

- ✓ Punttes pipeta de 10-100 μ (arosa)



Imatge 32



- ✓ Medi ric YPD



Imatge 33

- ✓ Bec de Bunsen

- ✓ Parafilm



Imatge 34

Sílvia Peret

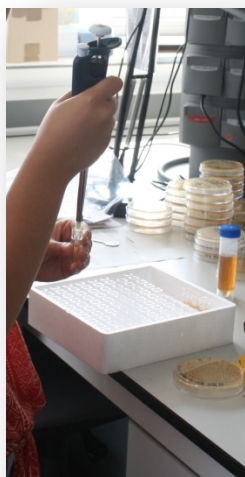
➤ PROCEDIMENT:

1. Partim d'un cultiu de cèl·lules de *Sacharomyces* on hi ha colònies grans, mitjanes i petites. En aquest cas, no es tracta de la soca mutada (W303) sinó de la salvatge.



Imatge 35 : plaques de petri amb colònies de cèl·lules de llevat de la soca salvatge

2. Preparem els eppendorfs; a continuació amb la pipeta agafem un mil·lilitre de medi ric i el posem dins de cada eppendorf. Tot seguit separem el control.



Imatge 36: posant el medi a cada eppendorf

- 3.** Amb la punta de la pipeta blava agafem varies colònies grans, petites i mitjanes i barregem cada colònia dins d'un eppendorf per separat. Tot seguit agitem les mostres (amb el vòrtex o amb la mà) perquè es barregin bé i formin una barreja homogènia.



Imatge 37: agafant colònies de mida variada

- 4.** Abans de calcular els nivells d'absorbància, calibrem l'espectrofotòmetre ja que es tracta d'un feix de llum que travessa la part transparent i per tant, cal restar l'absorbància del medi amb el que estem treballant. Per calibrar utilitzem doncs, el control.



Imatge 38: calibrant la mostra

5. Preparem les cubetes respectives per a cada eppendorf i hi posem 900 μ l de medi ric dins de cada una. Amb la pipeta groga agafem 100 μ l de cada eppendorf i ho posem dins la cubeta. -Molt important tornar a agitar la mostra abans d'agafar els 100 μ l.



Imatge 39: agafant 100 μ l de l'eppendorf (part del pas 5)



6. Agitem la cubeta amb l'ajuda d'un paper de film per barrejar-ho bé.



Imatge 40: agitant la cubeta

7. Calculem els nivells d'absorbància (OD).



RESULTATS OBTINGUTS

Després de fer tots els passos corresponents, el resultat que ens surten són els següents:

Mida de la colònia	OD a 600 nm												OD Promig	Desviació	
Colònies petites < 2mm	1,27	1,27	0,67	0,93	0,86	0,82	0,28	0,38	0,48					0,77	0,25
Colònies mitjanes ≈ 2 mm	3,67	3,17	3,75	4,47	4,2	3,8	3,89	5,09	3,72					3,97	0,57
Colònies grans ≈ 3 mm	3,96	6,45	8,02	7,16	5,11	6,84	7,23	5,03	7,28	8,78	8,25	8,02		6,84	1,23
														4,29	2,74

Sabem que un valor de OD de 0,6 correspon a un nombre de $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, per tant:

Mida de la colònia	Nombre de cèl·lules ($\cdot 10^7$)												Nº cèl·lules Promig	Desviació	
Colònies petites < 2mm	6,35	6,35	3,35	4,65	4,3	4,1	1,4	1,9	2,4					$3,87 \cdot 10^7$	1,79
Colònies mitjanes ≈ 2 mm	18,35	15,85	18,75	22,35	21	19	19,45	25,45	18,6					$19,87 \cdot 10^7$	2,76
Colònies grans ≈ 3 mm	19,8	32,25	40,1	35,8	25,55	34,2	36,15	25,15	36,4	43,9	41,25	40,1		$33,69 \cdot 10^7$	7,34
														$20,81 \cdot 10^7$	13,68

ANÀLISI I DISCUSSIÓ

Partint d'una dada bibliogràfica:

Una OD de 0.6 \approx $3 \cdot 10^7$ cèl·lules

- ❖ Una mostra d'1 ml amb una llum de 600 nm tindrà una absorbància de 0.6 i contindrà la quantitat de $3 \cdot 10^7$ cèl·lules.

Obtenim:

Mida de la colònia	Nombre de cèl·lules ($\cdot 10^7$)												Nº cèl·lules Promig	Desviació	
Colònies petites < 2mm	6,35	6,35	3,35	4,65	4,3	4,1	1,4	1,9	2,4					$3,87 \cdot 10^7$	1,79
Colònies mitjanes ≈ 2 mm	18,35	15,85	18,75	22,35	21	19	19,45	25,45	18,6					$19,87 \cdot 10^7$	2,76
Colònies grans ≈ 3 mm	19,8	32,25	40,1	35,8	25,55	34,2	36,15	25,15	36,4	43,9	41,25	40,1		$33,69 \cdot 10^7$	7,34
														$20,81 \cdot 10^7$	13,68

Observant ambdós resultats, veiem que els valors d'absorbància i els de les colònies petites són massa extrems.

Per tant, el que farem a continuació serà eliminar aquests valors i tornar a fer els càlculs:



Mida de la colònia	OD a 600 nm											OD Promig	Desviació	
Colònies mitjanes	3,67	3,17	3,75	4,47	4,2	3,8	3,89	3,72					3,83	0,38
Colònies grandes		6,45	8,02	7,16	5,11	6,84	7,23	5,03	7,28	8,78	8,25	8,02	7,11	1,21
0,6 OD -- $3 \cdot 10^7$ cèl·lules													5,73	0,58
Sabem que un valor de OD de 0,6 correspon a un nombre de $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, per tant:														
Mida de la colònia	Nombre de cèl·lules ($\cdot 10^7$)											Nº cèl·lules Promig	Desviació	
Colònies mitjanes M	18,35	15,85	18,75	22,35	21	19	19,45	18,6					19,17 $\cdot 10^7$	1,92
Colònies grandes G		32,25	40,1	35,8	25,55	34,2	36,15	25,15	36,4	43,9	41,25	40,1	35,53 $\cdot 10^7$	6,05
											Mitjana MiG		28,64 $\cdot 10^7$	9,52
Per tant en una colònia d'entre 2 i 3 cm hi haurà aproximadament												$3 \cdot 10^8$ cèl·lules		

Els resultats una vegada extrets els valors de les colònies petites i els nivells extrems d'OD, veiem que ja tenim el que nosaltres buscàvem, que era el càlcul del nombre de cèl·lules en diferents colònies; hem obtingut que en colònies d'entre 2 i 3 cm hi haurà aproximadament $3 \cdot 10^8$ cèl·lules.

REFLEXIÓ

Una vegada observats els resultats, ens donem compte que el nombre de cèl·lules que nosaltres volem plaquejar no s'acosta als resultats que hem obtingut en la mostra. Per tant, per tal d'aconseguir aquest nombre de cèl·lules, haurem de diluir la mostra obtinguda fins aconseguir les cèl·lules que volem.

✓ “Quantes dilucions haurem de fer per aconseguir aquest nombre?”



Doncs bé, sabent que:



En 1 colònia d'entre 2 i 3 cm diluïda en 1000 microlitres de medi de cultiu	→	$3 \cdot 10^8$	Cèl·lules
El valor teòric és	→	$1 \cdot 10^9$	Cèl·lules
Nosaltres volem sembrar 50 microlitres	→	Amb ≈ 1000 cèl·lules	

Les dilucions que haurem de fer seran:

Dilucions					
1000 microlitres + colònia de 2-3 cm	→	$3 \cdot 10^8$ cèl·lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$3 \cdot 10^7$ cèl·lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$3 \cdot 10^6$ cèl·lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$3 \cdot 10^5$ cèl·lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$3 \cdot 10^4$ cèl·lules	30000	cèl·lules	
Com sembrem 50 µl	→	30000	cèl·lules/20	1500	cèl·lules Seran necessàries 4 dilucions

Però ara bé, ens donem compte que estem treballant amb una soca salvatge, i per la nostra investigació posterior, treballarem sobre la soca W303 (adenina -), per tant, haurem de tornar a fer els càlculs per comprovar si les dilucions que haurem de fer llavors seran les mateixes i per veure si el nombre de cèl·lules que plaquejarem serà el mateix, inferior, major...

Així, el que ens queda és:

Mida de la colònia adenina -	OD a 600 nm	OD Promig	Desviació
Colònies mitjanes ≈ 2 mm	2,75		
Colònies grans ≈ 3 mm	5,7		
		4,23	2,09
de OD de 0,6 correspon a un nombre de $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, per tant:			
Mida de la colònia	Nombre de cèl·lules ($\cdot 10^7$)	Nº cèl·lules Promig	Desviació
Colònies mitjanes ≈ 2 mm	13,75		4,58
Colònies grans ≈ 3 mm	28,5		8,23
		$21,13 \cdot 10^7$	10,43
Per tant en una colònia d'entre 2 i 3 cm hi haurà aproximadament		$2 \cdot 10^8$	
Dilucions			
1000 microlitres + colònia de 2-3 cm	→	$2 \cdot 10^8$ cèl·lules	
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$2 \cdot 10^7$ cèl·lules	
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$2 \cdot 10^6$ cèl·lules	
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$2 \cdot 10^5$ cèl·lules	
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	$2 \cdot 10^4$ cèl·lules	20000 cèl·lules
Com sembrem 50 µl	→	20000	cèl·lules/20
		1000	cèl·lules Seran necessàries 4 dilucions
		20%	
		↓	
		200	cèl·lules Esperem un creixement d'unes 200 colònies per placa



Quan haguem de diluir haurem de fer 4 dilucions igual però el nombre de cèl·lules que obtenim és diferent ja que en una colònia de 2 i 3 cm hi ha aprox. **$2 \cdot 10^8$ cèl·lules.**

Un cop ja tenim aquests coneixement adquirits, estem llestos per realitzar un protocol per fer un recompte de colònies:



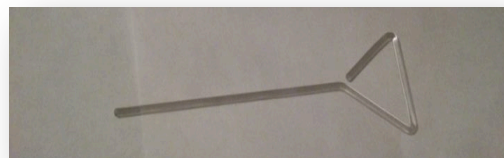
METODOLOGIA

DISSENY EXPERIMENTAL

➤ UTILLATGE:

- ✓ Eppendorfs esterilitzats
- ✓ Pipeta de 100-1000 μ (blava)
- ✓ Pipeta de 10-100 μ (groga)
- ✓ Paper de film
- ✓ Plaques de Petri
- ✓ Medi ric YPD
- ✓ Bec de Bunsen

- ✓ Nansa de sembra de vidre



Imatge 41

➤ PROCEDIMENT:

1. Agafem 16 eppendorfs estèrils



Imatge 42: preparant els eppendorfs

2. El primer eppendorf serà el nostre punt de partida per fer les dilucions. Hi posarem 900 microlitres d' YPD i 100 microlitres de l'eppendorf anterior on hi hem ficat la colònia de cèl·lula de llevat amb YPD.



Imatge 43: posant YPD als eppendorfs

- 3.** Agitem el primer eppendorf per tal de que la mostra estigui homogènia i n'agafem 100 microlitres per a posar-los dins del segon (primera dilució).



Imatge 44: fent la primera dilució

- 4.** Repetim el procés quatre vegades de manera que fem quatre dilucions; en cada dilució estarem diluint fins a deu vegades.



- 5.** A continuació sembrem colònies petites i grans de *Saccharomyces* en 4 plaques de Petri amb medi YPD.

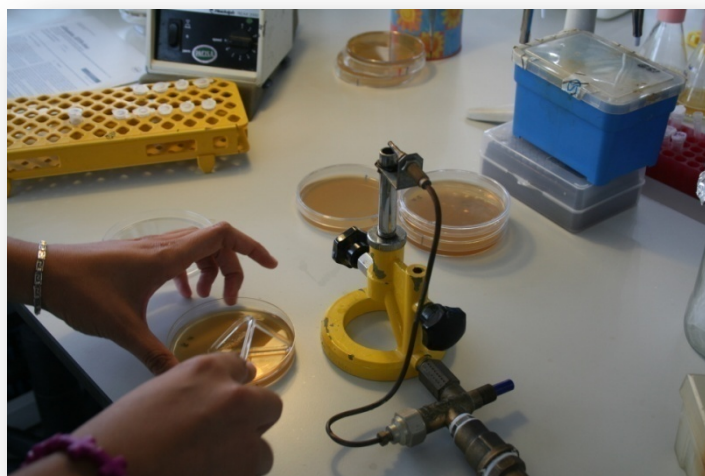
Per fer-ho:

- 5.1** Fiquem la nansa amb alcohol i tot seguit la cremem a la flama fins a tres cops. La refredem a la tapa de la placa.



imatge 45 : refredant la nansa de sembra

- 5.2** Amb una pipeta groga agafem 50µl de l'eppendorf que conté la mostra.
- 5.3** Sembrem amb la nansa.
- 5.4** Repetim el procés en una altra placa. Fem dues plaques de colònies petites i unes altres dues de colònies grans.



Imatge 46: sembrant les cèl·lules en les plaques

- 6.** Les posem dins de la incubadora a 37 °C i les deixem créixer durant quatre dies fins que es trobin en fase estacional i ja no puguin créixer més.



Imatge 47: posant les plaques dins la incubadora

**RESULTATS OBTINGUTS**

Després d'esperar entre 3 i 4 dies, ja han crescut les colònies de *Sachharomyces* i el que s'ha de fer és un recompte:

A → COLÒNIES GRANS (2-3 cm)**B → COLÒNIES PETITES (< 2 cm)**A₁ □ 399 colòniesA₂ □ 396 colòniesB₁ □ 150 colòniesB₂ □ 171 colònies

A continuació fem un promig de colònies grans, colònies petites i colònies grans junt amb petites:

✓ Colònies grans

$$(399+396)/2=398$$

✓ Colònies petites

$$(150+171)/2=161$$

✓ Colònies grans i petites

$$(399+396+171+150)/4=304$$

ANÀLISI I DISCUSSIÓ

- ❖ Segons els càlculs teòrics haurien d'haver crescut unes 1500 cèl·lules però només n'han crescut 300. Això pot ser a causa de que moltes d'elles hagin mort en la fase exponencial o bé per un error d'estimació.



REFLEXIÓ

- ❖ Un cop ja sabem obtenir colònies vermelles fresques, quantes cèl·lules hi ha en una colònia, fer els càlculs teòrics per tal d'esbrinar quantes dilucions haurem de fer de les colònies que vulguem sembrar i fer el recompte de colònies, ja estem a punt per **comprovar com afecta un agent mutagènic, en aquest cas, el peròxid d'hidrogen a unes colònies de *Saccharomyces*.**



SACCHAROMYCES CEREVISIAE I EL PERÒXID D'HIDROGEN



En la nostra investigació partim de la soca adenina⁻ de Saccharomyces Cerevisiae que forma colònies vermelles ja que té una mutació en la via metabòlica que li permet fabricar adenina, el metabòlit intermedi que s'acumula, en no poder acabar de realitzar la síntesi, és un producte de color vermell. Si les colònies es sotmeten a un agent mutagen, pot produir-se una mutació en altres enzims d'aquesta via metabòlica, per la qual cosa no es fabricarà el metabòlit vermell i les nostres colònies seran blanques, o fins i tot, pot revertir la mutació inicial.

En aquest protocol el que volem és comprovar com afecta el peròxid d'hidrogen sobre les cèl·lules de llevat.

Posarem certes concentracions en el medi de cultiu en que creixeran les colònies i d'aquesta manera, podrem observar si els hi provoca mutacions i a partir de quina concentració; en aquest cas, esperem veure colònies blanques.

Aquest protocol també ens servirà per poder aplicar tot el que hem après anteriorment i a més a més, ens permetrà practicar per la nostra investigació posterior.

METODOLOGIA

DISSENY EXPERIMENTAL

➤ UTILLATGE:

- ✓ Bec de Bunsen
- ✓ Nansa de sembra rodona
- ✓ Etanol
- ✓ Medi de cultiu preparat
- ✓ Nansa de sembra de vidre
- ✓ Placa amb medi de cultiu YPD
- ✓ YPD
- ✓ Eppendorfs esterilitzats
- ✓ Pipetes
- ✓ Puntetes per a les pipetes
- ✓ Llumins
- ✓ Peròxid d'hidrogen



➤ PROCEDIMENT:

1. Preparar i esterilitzar el medi. En aquest cas concret escalfem un medi ja preparat durant 20-30 min (el temps depèn de la quantitat, com més n'hi ha més s'ha d'escalfar).
2. Agafem eppendorfs estèrils. Els apropem a la flama, i els tanquem per a que no es contaminin.
3. A continuació els posem dins de la graella que els subjecta.
4. Amb la pipeta blava agafem 100 microlitres per als dos primers eppendorfs, a la resta, que són 4, en posem 900 microlitres.
5. Amb la punta de la pipeta agafem dues colònies de 1mm de diàmetre cadascuna (colònies petites) i les barregem amb els 100 microlitres dels primers eppendorfs.
6. Separem dos eppendorfs on hi afegim 900 microlitres de medi ric més 100 microlitres del primer eppendorf.
7. Fem el càlcul del nivell d'absorbància:

Amb la pipeta agafem 1 ml i l'aboquem dins d'una cubeta. Barregem amb l'ajuda del paper de film. Calibrem l'espectrofotòmetre amb una cubeta on només hi ha medi (control) i tot seguit mirem l'OD de las mostra 1 i la mostra 2.

- ❖ MOSTRA 1: 0.51 absorbància
- ❖ MOSTRA 2: 0.38 absorbància

Ara, per fer el càlcul de nombre de cèl·lules utilitzem la dada bibliogràfica:

- ✦ Si sabem que en 0.6 d'OD hi ha $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, en 0.5 d'OD hi hauran **$2.5 \cdot 10^7$ cèl·lules.**
- ✦ Si sabem que en 0.6 d'OD hi ha $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, en 0.38 d'OD hi hauran **$1.9 \cdot 10^7$ cèl·lules.**

A continuació, sabem el nombre de cèl·lules, però no sabem quantes dilucions haurem de fer per plaquejar-ne el nombre que nosaltres volem. Per tant, haurem de fer una sèrie de càlculs per saber les dilucions necessàries:





- ❖ Tenint en compte que plaquejarem amb 50 microlitres aproximadament:



MOSTRA 1

MOSTRA 2

En 1ml → $2.5 \cdot 10^7$ cèl·lules

En 1ml → $1.9 \cdot 10^7$ cèl·lules

1ml \square $2.5 \cdot 10^7$  **diluïm**
 0.1ml \square $2.5 \cdot 10^6$ 
 0.01ml \square $2.5 \cdot 10^5$
 0.001ml \square $2.5 \cdot 10^4$
 0.0001ml \square $2.5 \cdot 10^3 = 2500$ cèl·lules

1ml \square $1.9 \cdot 10^7$  **diluïm**
 0.1ml \square $1.9 \cdot 10^6$ 
 0.01ml \square $1.9 \cdot 10^5$
 0.001ml \square $1.9 \cdot 10^4$
 0.0001ml \square $1.9 \cdot 10^3 = 1900$ cèl·lules

En total cal fer 4 dilucions.

- ❖ A continuació, el que farem serà preparar les plaques per a poder-hi afegir el peròxid d'hidrogen amb diferents concentracions.

➤ PROCEDIMENT:

1. Posem 100 μ l d' H_2O_2 en 900 μ l d'aigua estèril dins d'un eppendorf.
2. Prepararem diferents concentracions en plaques noves de peròxid d'oxigen, en total, 10 plaques. Quan l'agar està fos, a 60° aproximadament, s'hi afegeix el H_2O_2 .

Volem tenir concentracions creixent d' H_2O_2 , concretament:

- ✓ Placa control
- ✓ Placa 1: $H_2O_2 \square 0.35$
- ✓ Placa 2: $H_2O_2 \square 0.5$
- ✓ Placa 3: $H_2O_2 \square 0.75$
- ✓ Placa 4: $H_2O_2 \square 1$

- ✓ Placa control
- ✓ Placa 1: $H_2O_2 \square 0.35$
- ✓ Placa 2: $H_2O_2 \square 0.5$
- ✓ Placa 3: $H_2O_2 \square 0.75$
- ✓ Placa 4: $H_2O_2 \square 1$

MOSTRA 1

MOSTRA 2



- ✦ Per poder obtenir una concentració final de 0.35 micromolar cal afegir 20.11 μ l d' H_2O_2 en 50 μ l de YPD agar.
 - ✦ Per poder obtenir una concentració final de 0.5 micromolar cal afegir 28.73 μ l d' H_2O_2 en 50 μ l de YPD agar.
 - ✦ Per poder obtenir una concentració final de 0.75 micromolar cal afegir 43.09 μ l de H_2O_2 en 50 μ l de YPD agar.
 - ✦ Per poder obtenir una concentració final de 1 micromolar cal afegir 57.46 μ l de H_2O_2 en 50 μ l de YPD agar.
 - ✦ Per poder obtenir una concentració final de 1.2 micromolar cal afegir 68.95 μ l de H_2O_2 en 50 μ l de YPD agar.
- 3.** Deixem assecar les plaques durant un mitja hora per poder sembrar.



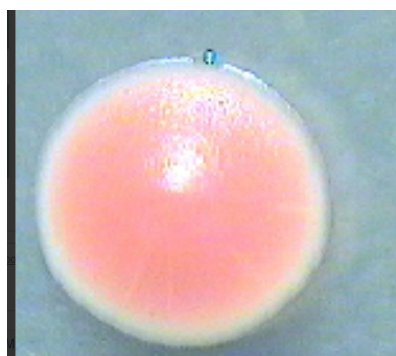
RESULTATS OBTINGUTS

El que busquem en aquests resultats són colònies de color més rosat o blanc, això voldrà dir que són colònies mutants. Cal comparar-ho amb el control, ja que les cèl·lules sofreixen mutacions espontànies i caldrà tenir en compte aquest índex de mutació per tal de diferenciar les mutacions causades per l'agent mutagènic, en aquest cas, l' H_2O_2 .

RESULTATS MOSTRA 1:



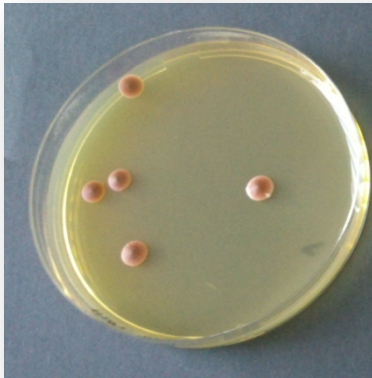
Imatge 48: placa control H_2O_2



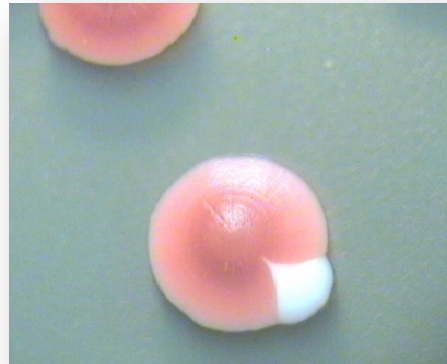
Imatge 49: colònia vermella de la placa control H_2O_2 10x

Control → Sembla ser que hi ha hagut mutacions. S'hi observen colònies vermelles i d'altres d'aquest mateix color però amb alguna zona blanca; això vol dir que ha mutat espontàniament alguna cèl·lula i ella i les seves descendents ja no acumulen el producte vermell. També s'hi observa una contaminació. Hi ha **10 colònies**.

0.35 H_2O_2 → De les **tres colònies** que han crescut, una presenta un color rosa vermellós.



Imatge 50: placa 0.5 % H₂O₂



Imatge 51: colònia vermella amb mutació d'algunes cèl·lules

0.5 H₂O₂ → Les colònies que s'observen són pràcticament idèntiques que les anteriors, però en aquest cas, una de les colònies ha mutat. En total hi ha **5 colònies**.

0.75 H₂O₂ → La majoria de colònies són de color vermellós tot i que n'hi ha dues més petites que presenten un color més claret tirant cap a crema. **Hi ha 10 colònies**.



Imatge 52: placa 1 % H₂O₂



Imatge 53: colònia vermella 1% 10x



1 H_2O_2 → Observem com totes les colònies són iguals entre sí a excepció d'una. Aquesta és molt més petita que les demés i presenta un color totalment blanquinós. I en una colònia s'observa que ha mutat una cèl·lula i hi ha un sector de la colònia blanca. Hi ha **9 colònies**.

RESULTATS MOSTRA 2:

Control → En aquest cas no hi ha mutació espontània, no totes les colònies tenen la mateixa mida, però sí que presenten el mateix color rosa-vermellós. Hi ha **10 colònies**.

0.35 H_2O_2 → S'hi observen colònies de grandàries i colors molt diferents, això voldrà dir que o bé s'han produït alteracions a l'atzar o ha estat l' H_2O_2 qui les ha causat. N'hi ha una de color blanc i tres més petites de color crema. Hi ha **12 colònies**.

0.5 H_2O_2 → La mida de les colònies és bastant semblant a les de la placa control. De les **12 colònies** que hi ha, una d'elles és molt més petita i de color completament blanc.

0.75 H_2O_2 → S'observen colònies una mica més petites que en la placa control. No n'hi ha cap que sigui de color blanquinós. Hi ha **12 colònies**.

1 H_2O_2 → Hi ha tres colònies més petites que presenten un color més claret que totes les demés. Hi ha **23 colònies**.

TAULA COMPTATGE MOSTRA 1 I MOSTRA 2:

Mostres	NOMBRE DE COLÒNIES	
	1	2
Control	11	10
0.35 H_2O_2	3	12
0.5 H_2O_2	5	12
0.75 H_2O_2	12	12
1 H_2O_2	9	23
Promig de colònies	12	



	NOMBRE DE COLÒNIES BLANQUES PETITES	
Mostres	1	2
Control	0	0
0.35 H ₂ O ₂	0	3
0.5 H ₂ O ₂	0	1
0.75 H ₂ O ₂	2	0
1 H ₂ O ₂	1	3
	NOMBRE DE COLÒNIES MUTADES	
Mostres	1	2
Control	1	0
0.35 H ₂ O ₂	1	4
0.5 H ₂ O ₂	1	1
0.75 H ₂ O ₂	2	0
1 H ₂ O ₂	1	3

ANÀLISI DISCUSSIÓ

Hem pogut observar que, malgrat el nombre petit de cèl·lules obtingudes, a mesura que la concentració de peròxid d'hidrogen augmenta s'observa un augment del nombre de colònies mutades. A més, hem pogut veure com un agent mutagen com el peròxid d'hidrogen produeix dos tipus de mutacions en les soques adenina⁻ de *Saccharomyces*:



Mutacions en la via de l'adenina que fan que ja no s'acumuli el metabòlit vermell i per tant, la cèl·lula mutada i les seves descendents siguin blanques.



Apareixen també algunes colònies petites i blanques que possiblement tenen mutacions en l'ADN mitocondrial, no poden respirar ni fer el metabolisme aeròbic i per tant han de fermentar, amb la conseqüència que no tenen tanta energia i per tant aquest creixement és més lent.

En la bibliografia consultada a aquestes colònies se'ls anomena "petite".

Veiem que els resultats d'ambdues mutacions ratifiquen els trobats en la bibliografia consultada "*Detectar Carcinògenos: El Test de Ames*".

En quant al número de colònies, hem obtingut un promig de 12, és a dir, a les 110 esperades, però és que hem oblidat que en l'experiment anterior havíem vist que creixen aproximadament el 20% de les sembrades, per tant en aquest cas unes 22 colònies teòriques per placa, és número que s'acosta molt a les obtingudes.

Han crescut molt poques colònies, a partir d'ara, quan comencem a fer la nostra **pròpia investigació** amb un altre agent mutagen, utilitzarem colònies d'entre 2 i 3 cm (mitjanes i grans) i els càlculs i les dilucions seran les següents:

Dilucions					
1000 microlitres + colònia de 2-3 cm	→	2×10^8 cèl.lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	2×10^7 cèl.lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	2×10^6 cèl.lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	2×10^5 cèl.lules			
100 µl solució anterior + 900 µl medi YPD	→	2×10^4 cèl.lules	20000	cèl.lules	
Com sembrem 50 µl	→	20000	cèl.lules/20	1000	cèl.lules Seran necessàries 4 dilucions
				20%	
				↓	
				200	cèl.lules Esperem un creixement d'un 200 colònies per placa



SACCHAROMYCES CEREVISAE SOTA ELS EFECTES DE LA LLUM ULTRAVIOLADA

Una vegada hem arribat fins aquí ja estem llestos per poder treballar amb un altre agent mutagen i començar a fer la nostra investigació particular.

En aquest cas, amb l'agent que treballarem serà amb la radiació ultraviolada; exposaré cèl·lules de llevat durant un cert temps a la llum del sol i a la llum d'un fluorescent de 4W. D'aquesta manera comprovaré el perjudicial que és i si provoca efectes negatius sobre les cèl·lules. Si és així, ho hauré demostrat i hauré aconseguit els objectius proposats.



SACCHAROMYCES CEREVISIAE A EXPOSAT A LA RADIACIÓ SOLAR

El primer que vam provar va ser l'efecte mutagènic de la radiació solar; per fer-ho, vam dissenyar el següent protocol:



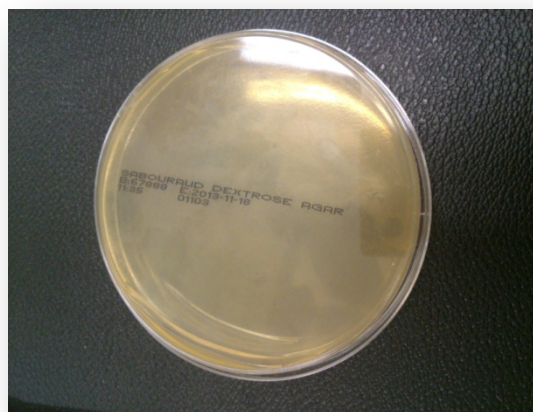
- ✓ **OBTENCIÓ DE COLÒNIES VERMELLES QUE ESTIGUIN FRESQUES (veure procés en la pàg. 35)**

✓ **LES CÈL·LULES SOTA LA RADIACIÓ SOLAR**

➤ UTILLATGE:

- ✓ Bec de Bunsen
- ✓ Nansa de sembra rodona
- ✓ Etanol
- ✓ Nansa de sembra de vidre
- ✓ Eppendorfs esterilitzats
- ✓ Pipetes
- ✓ Puntetes per a les pipetes
- ✓ Llums

- ✓ Plaques amb medi de cultiu *Sabouraud Dextrose Agar*



Imatge 54

➤ PROCEDIMENT

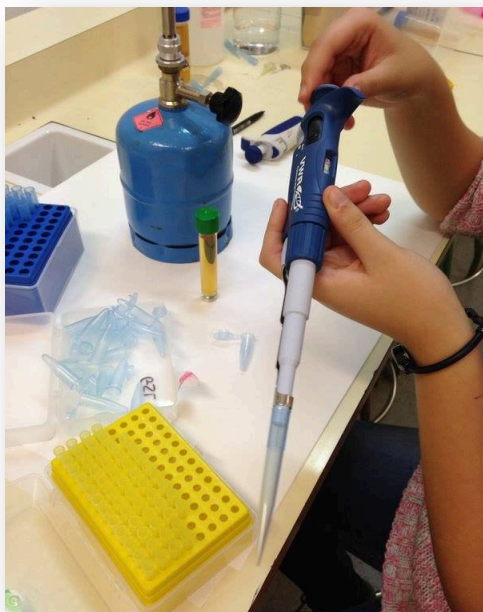
1. Encenem el Bec de Bunsen.



Imatge 55: encenem el Bec de



2. Agafem un eppendorf estèril, l'apropem a la flama i el tanquem perquè no es contami; a continuació hi aboquem 1 ml d'YPD (medi ric de creixement de llevats). Per realitzar-ho, agafem la pipeta d'un volum de 100 μ l- 1000 μ l.



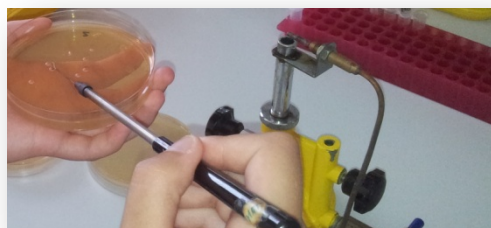
Imatge 56: calibre la pipeta



Imatge 57: aboquem 1 ml d'YPD

3. Amb la nansa de sembra, agafem una colònia del medi de cultiu de llevats i la introduïm a l'eppendorf on en el pas anterior hi hem ficat l'YPD.

- ✓ Aquesta colònia es trobarà en fase estacionària, és a dir, en un punt en que ja no creixerà més. Pel que fa a la mida de la colònia, n'agafarem una de petita, d'uns 2/3 mm aprox. Pels càlculs realitzats prèviament, sabem que en 1ml hi ha 2×10^8 cèl·lules (veure pàgina 47).



Imatge 58: agafem una colònia



4. Agitem amb la mà l'ependorf perquè es barregi bé i quedi la mostra homogènia.



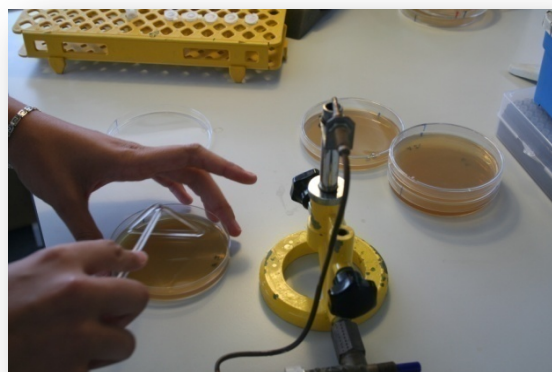
Imatge 59: agitem amb la mà

5. Agafem 900 μ l de medi ric YPD i 100 μ de la mostra anterior. Així successivament fins arribar a fer les 3 dilucions, és a dir, a obtenir 2×10^5 cèl·lules.



Imatge 60: agafem 100 μ de la mostra anterior

6. Amb la pipeta agafem 50 μ l de la última mostra i els fem a la placa; a continuació sembrem amb la nansa de sembra que prèviament ha estat esterilitzada al bec de Bunsen.



Imatge 61: sembrant amb la nansa de sembra



7. Sembrem en 7 plaques.
8. A continuació, ja podem experimentar amb la radiació i veure com afecta aquesta sobre les cèl·lules.
9. Excepte una de les plaques que ens servirà de control, les altres les hem de sotmetre a la radiació solar durant el temps indicat:

- ✓ Tot un dia _____ 1 placa oberta i 1 placa tancada
- ✓ 15'
- ✓ 30'
- ✓ 45'
- ✓ 1'30 h
- ✓ 2 h

10. Una vegada realitzat el pas anterior, incubem les plaques a l'estufa a 30°C durant 3 dies.

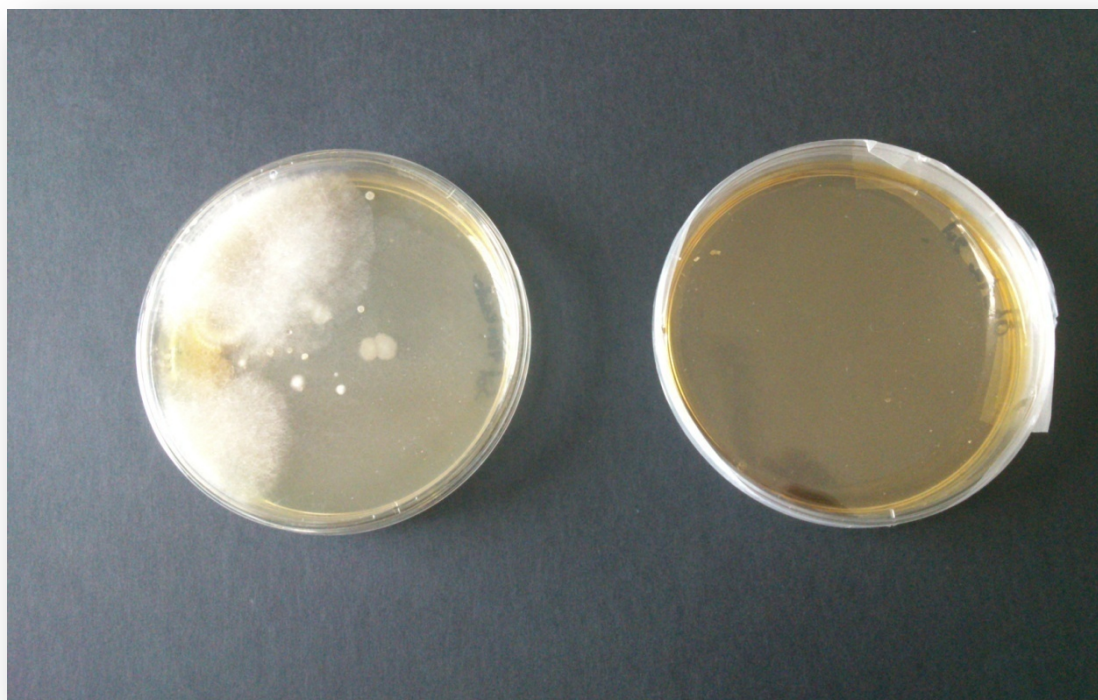


Imatge 62: incubant les plaques.



RESULTATS OBTINGUTS

Després d'esperar tres dies ja hem pogut observar i analitzar els resultats:



Imatge 63: plaques exposades al sol

TOT UN DIA OBERTA AL SOL

TOT UN DIA TANCADA AL SOL

En aquestes dues imatges veiem dues plaques que han estat durant tot el dia sota la radiació solar, una amb la tapa posada i l'altra sense ella.

Respecte a la que ha estat sense la tapa, veiem que ha sofert una gran contaminació i a més a més, la radiació ha afectat de manera molt negativa a les cèl·lules de *Saccharomyces* ja que no han sobreviscut.

Pel que fa a la placa que ha estat amb la tapa posada durant tot el dia, observem que ha succeït el mateix però amb la diferència de que aquesta, a l'estar tapada no s'ha contaminat.



TEMPS	FOTOGRAFIA PLACA	COMENTARI
CONTROL		<p>La mida de les colònies és molt diferent entre elles, en trobem de mitjanes i de petites però cap excessivament gran. Podem observar dues colònies blanques que es poden tractar de mutacions espontànies. El nombre total de colònies és de 101.</p>
15'		<p>En 15' ja podem començar a veure colònies diferents al color vermell, exactament d'un color marró; això ens fa pensar que les colònies d'aquest color han mutat. El tamany de les colònies varia com a la placa control. Hi ha un total de 65 colònies on 6 d'elles són marró fluix.</p>
30'		<p>El tamany de les colònies és similar al de la placa control. Trobem colònies de color marró fluix. Hi ha un total de 46 colònies, entre elles, 5 de marró.</p>

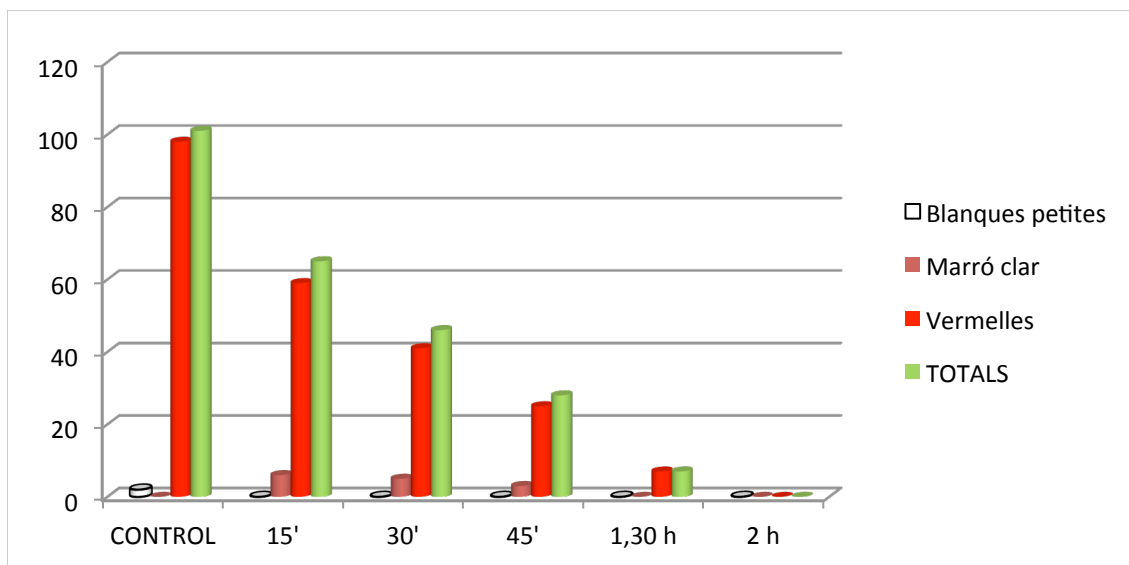


<p>45'</p>		<p>En aquesta placa podem començar a veure que la presència de colònies cada vegada és menor respecte les plaques anteriors. Hi ha un total de 28 colònies, 3 de marrons.</p>
<p>1 hora i mitja</p>		<p>Podem veure que quasi no hi ha presència de colònies; això és degut a que no han sobreviscut als efectes de la radiació solar. Hi ha un total de 7 colònies; totes vermelles.</p>
<p>2 hores</p>		<p>Com es pot veure no ha crescut cap colònia; les cèl·lules de <i>Saccharomyces</i> no han pogut sobreviure i han mort a causa de tant temps exposades al sol.</p>

A continuació, fem un recompte de colònies:



NOMBRE DE COLÒNIES				
PLACA	BLANQUES PETITES	MARRÓ FLUIX	VERMELLES	TOTAL
CONTROL	2	0	98	101
15'	0	6	59	65
30'	0	5	41	46
45'	0	3	25	28
1'30 h	0	0	7	7
2 h	0	0	0	0



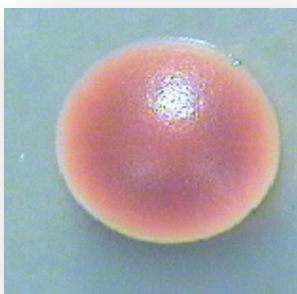
ANÀLISI I DISCUSSIÓ

La valoració global que podem treure és que conforme anem augmentant el temps, el nombre de colònies disminueix; això és degut a que els danys produïts en l'ADN de les colònies de *Saccharomyces* han estat tan considerables que no ha estat possible reparar-ho i les cèl·lules han mort per apoptosi (suïcidi de la cèl·lula).

Respecte al color de les colònies, com ja hem pogut observar en les pàgines anteriors, trobem que el de les que representa que han mutat no és blanc com succeïa amb l'H₂O₂, sinó que es tracta d'un color marró fluix.



Colònia blanca petita; aquest tipus ja ens l'esperàvem trobar perquè anteriorment ja l'hem pogut veure en els resultats del peròxid d'hidrogen.



Colònia mitjana marró; aquest tipus ja no ens l'esperàvem trobar perquè anteriorment no l'hem pogut veure en els resultats del peròxid d'hidrogen; tot i això, suposem que ha estat una mutació però no estem segurs.

REFLEXIÓ

Al veure que el color de les colònies mutades no ha estat el que ens esperàvem, ens fa pensar que:

- ✓ Cap colònia hagi sofert canvis visibles en el seu ADN, és a dir, forma, color, mida de la colònia, etc. i es tracti de les mateixes cèl·lules.
- ✓ S'hagi produït una mutació diferent a la esperada i per tant, aquestes colònies si siguin colònies mutades igual que les blanques aparegudes en el H_2O_2 .
- ✓ El medi utilitzat Sabouraud Dextrose Agar, diferent del medi YPD que vam fer servir en els primers experiments faci que el color de les colònies variï i per tant, els resultats siguin diferents.
- ✓ Alguna variable se'ns estigui escapant en el protocol.
- ❖ A continuació intentarem esbrinar quina d'aquestes hipòtesis és certa.

Començarem realitzant un protocol on el que farem serà comprovar si les colònies de color marró fluix que ens han sortit en l'experiment es tracten de colònies mutades, és a dir, que la radiació els ha provocat certes alteracions en l'ADN. D'aquesta manera també demostrarem que la radiació solar és mutagènica i per tant potencialment cancerígena.



METODOLOGIA

DISSENY EXPERIMENTAL

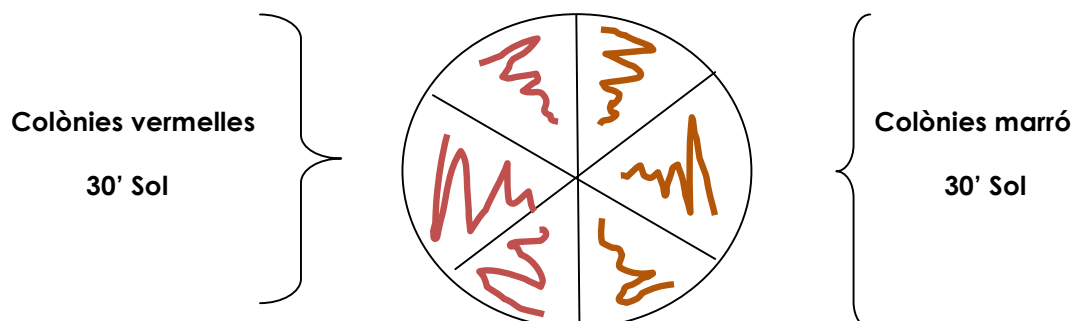
➤ UTILLATGE

- ✓ Nansa de sembra
- ✓ Bec de Bunsen
- ✓ Llumins
- ✓ Etanol
- ✓ Quatre plaques amb medi de cultiu

➤ PROCEDIMENT

1. Dividim cada placa en sis formatges; tres formatges marcaran una mateixa colònia cada una, el mateix color i el mateix temps.

- Exemple:





Imatge 64: fotografia formatgets

2. Encenem el bec de Bunsen
3. Amb un recipient fem l'etanol (mantenir-ho lluny del bec de Bunsen)
4. Agafem la nansa de sembra, la suquem amb etanol i a continuació la cremem a la flama fins que es fiqui taronja. – Repetim aquest pas tres vegades-



Imatge 65: cremant la nansa

5. Una vegada la nansa ja està llesta, agafem una placa on hi hagin les colònies mutades i punxem la nansa al medi perquè es refredi.
6. Tot seguit agafem una colònia vermella i la sembram en un formatget. – El mateix amb dues colònies vermelles més-



7. Esterilitzem la nansa un altre cop i agafem una colònia de color marró i l'estenem per un formatget.- Repetir aquest pas amb dues colònies marrons més-

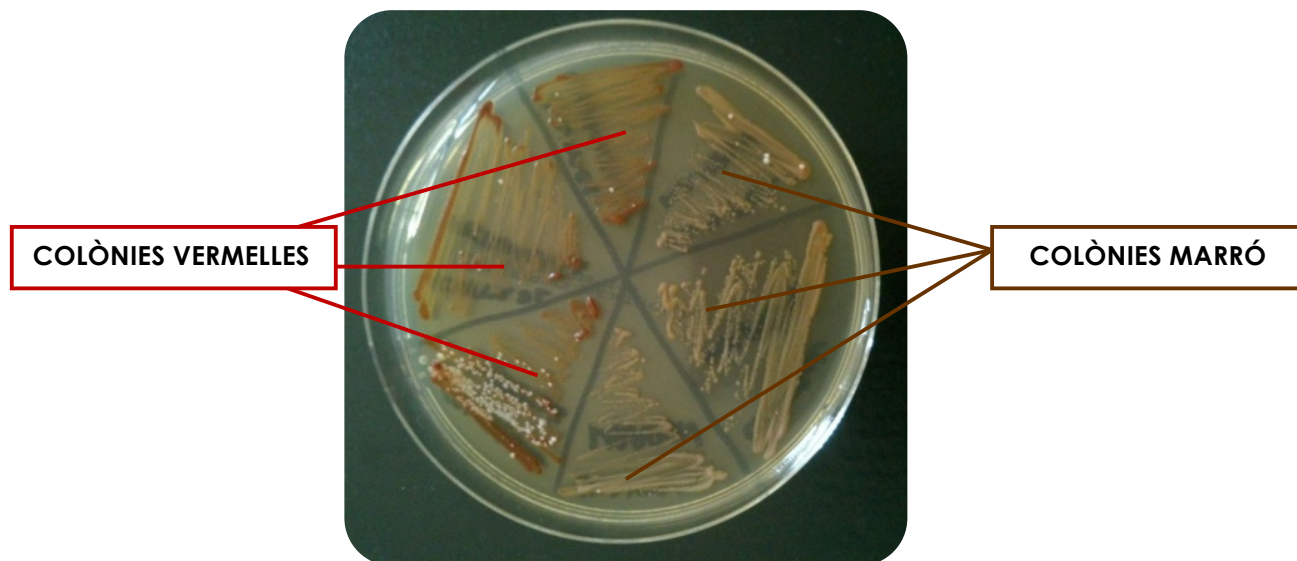
8. Una vegada ja hem fet el mateix amb les quatre plaques, les fem a l'estufa durant 3-4 dies a 30°.



Imatge 66: incubant les plaques



RESULTATS OBTINGUTS





ANÀLISI I DISCUSSIÓ

Tal i com es pot observar en les fotografies, les colònies marró són diferents a les colònies vermelles, per tant, ens anem acostant al que buscàvem.

REFLEXIÓ

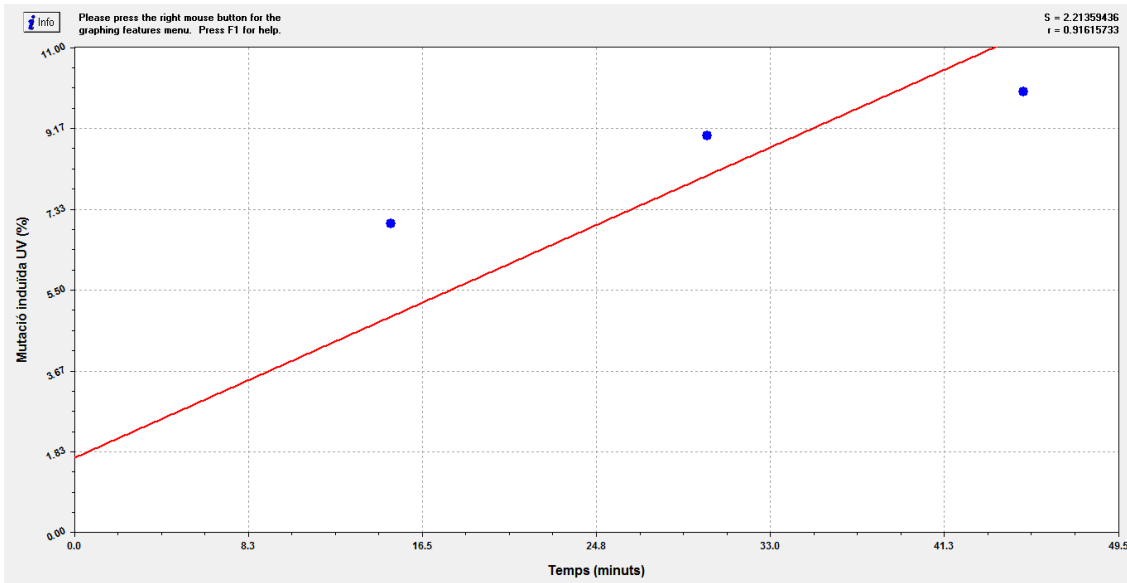
Una vegada hem analitzat els resultats veiem que una de les nostres hipòtesis respecte les colònies de color marró era certa. Les colònies d'aquest tipus que han sortit en les plaques amb el medi de cultiu comercial *Sabouraud Dextrose Agar* **sí que són mutacions**, per tant, el seu ADN ha sofert canvis a l'atzar induïts per la radiació solar; d'aquesta manera descartem l'opció de que les colònies marró no són mutacions.

Ara ja podem calcular el percentatge mutagènic de la radiació solar. Calcularem dos percentatges, el de la mutació espontània i el de la mutació induïda per la radiació; per fer aquest, calculem el percentatge de colònies mutades respecte del total i li restem el de les mutacions espontànies, és a dir, el que s'hagin produït en la placa control.

PLACA	PERCENTATGE MUTACIÓ ESPONTÀNIA	PERCENTATGE MUTACIÓ INDUÏDA RADIACIÓ
CONTROL	2%	0%
15'	9%	7%
30'	11%	9%
45'	12%	10%
1.30 h	-	-
2h	-	-

Podem observar que conforme augmentem el temps, aquest augmenta. En les últimes plaques veiem que el percentatge mutagènic és del 0% pel simple fet de que no hi ha colònies per que aquestes no han sobreviscut.

Un cop ja tenim els càlculs i els nombres fets, passem a fer la recta de regressió per tal de demostrar en quin percentatge la radiació solar és la causa de la mutació cel·lular:



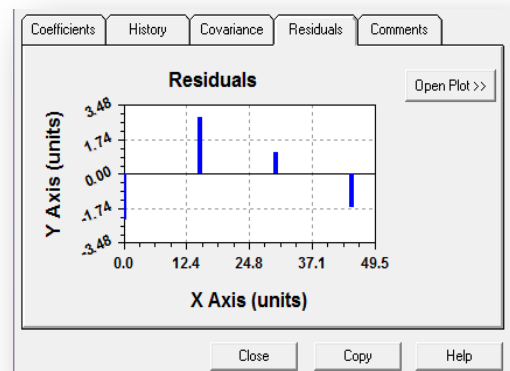
En aquests nombres no estem tenint en compte les morts cel·lulars que hi ha hagut durant l'exposició a la radiació; en les últimes plaques, on no ha crescut cap colònia, per exemple per l'excés de temps d'exposició, potser caldria considerar el 100% de percentatge de mutació. Ens estem basant en les colònies que veiem nosaltres que han crescut però el que no sabem són les colònies que no ho han fet a causa de la radiació i la impossibilitat de reparar l'ADN.

La "S" i la "r" que es poden observar en la recta fan referència a la desviació típica mostral (covariància) i al coeficient de correlació lineal de Pearson, és a dir, la relació lineal que hi ha entre el temps i el percentatge mutagènic. A diferència de la covariància, la correlació de Pearson és independent de l'escala de mesura de les variables.

$$S = 2.21359436$$

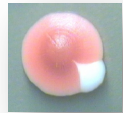
$$r = 0.91615733$$

Per tant, fent el coeficient de determinació (R^2), tindríem que el 0,839 de la variació quedaria justificada per la recta de regressió, és a dir, les dues variables (temps i percentatge mutagènic) estan relacionades en un 84%.





Ara ja podem concloure que la radiació solar **és mutagènica** tant pel fet de que produeixi un nombre creixent de mutacions de color marró en les cèl·lules de llevat com pel fet que la majoria resultin tan danyades que no sigui possible reparar l'ADN i es morin per apoptosi.



SACCHAROMYCES CEREVISIAE EXPOSAT A LA RADIACIÓ ULTRAVIOLADA

PRIMER PROTOCOL



METODOLOGIA

El que intentarem ara és demostrar que la part nociva de la radiació solar és la radiació ultraviolada; per fer-ho, dissenyarem un protocol per poder dur a terme la investigació; consistirà en primer de tot, en obtenir colònies vermelles de llevat que estiguin fresques per després poder-les exposar a la radiació UV d'un fluorescent de 4W.

DISSENY EXPERIMENTAL

- ✓ **OBTENCIÓ DE COLÒNIES VERMELLES QUE ESTIGUIN FRESQUES** → (veure procés en la pàg 35).

LES CÈL·LULES SOTA LA RADIACIÓ D'UN FLUORESCENT DE 4W.

➤ UTILLATGE:

- ✓ Bec de Bunsen
- ✓ Nansa de sembra rodona
- ✓ Etanol
- ✓ Nansa de sembra de vidre
- ✓ Placa amb medi de cultiu YPD
- ✓ YPD
- ✓ Eppendorfs esterilitzats
- ✓ Pipetes
- ✓ Puntetes per a les pipetes
- ✓ Llums
- ✓ Caixa d'irradiació



Imatge 66: caixa d'irradiació

➤ PROCEDIMENT

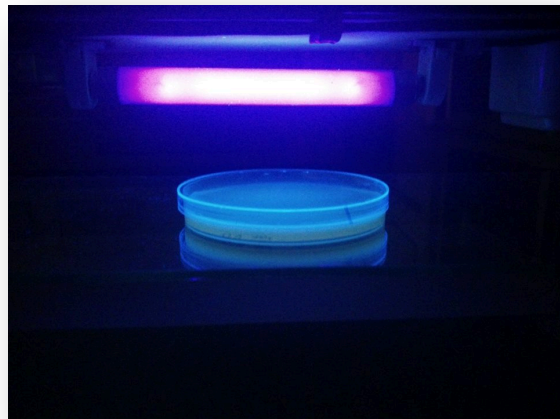
Els sis primers passos són els mateixos que els del protocol de la radiació solar.
Veure en la pàg 66.



A partir d'aquí, els canvis que realitzarem seran:

1. Sembrem en 5 plaques i no en 7; a continuació, ja podem experimentar amb la radiació i veure com afecta aquesta sobre les cèl·lules.
2. Excepte una de les plaques que ens servirà de control, les altres les hem de sotmetre a la caixa d'irradiació durant el temps indicat:
 - ✓ 5'
 - ✓ 10'
 - ✓ 15'
 - ✓ 30'
 - ✓ 1 h

3. Una vegada realitzat el pas anterior, incubem les plaques a l'estufa a 30°C durant 3 dies.



Imatge 67: irradiant cèl·lules



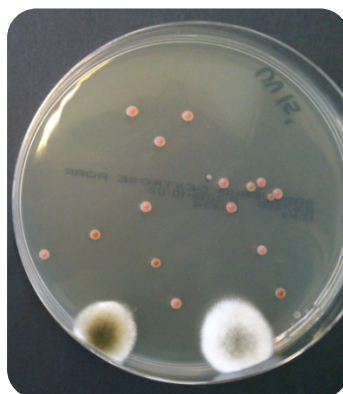
RESULTATS OBTINGUTS

Després d'esperar els tres dies, ja hem pogut observar els resultats i analitzar-nos:

TEMPS	FOTOGRAFIA PLACA	COMENTARI
CONTROL		<p>La mida de les colònies és molt diferent entre elles, en trobem de mitjanes i de petites però cap excessivament gran. Podem observar dues colònies blanques petites que es poden tractar de mutacions espontànies. El nombre total de colònies és de 101.</p>
5'		<p>Troblem que han crescut molt poques colònies. Al fer el contacte veiem que només hi ha 11 colònies i cap de mutada. La mida de les colònies és pràcticament la mateixa. Es pot observar que la placa està contaminadaa causa d'exposar-la oberta a la irradiació.</p>
10'		<p>Passa igual que a la placa interior, molt poques colònies, unes 10 on cap d'elles ha mutat. També s'observa que la placa s'ha contaminat.</p>



15'



A partir d'aquesta placa veiem que sí que han crescut colònies d'un color diferent al vermell, un color igual al de la radiació solar, un color marró.

Hi ha dues contaminacions i un total d'11 colònies, 6 marrons

30'



Veiem que hi ha més contaminacions a causa d'estar més temps sota la caixa d'irradiació.

Hi ha moltes més colònies que a l'anterior; un total de 94 colònies on 3 són blanques i 2 marró.

1 HORA



Com es pot observar, la diferència entre aquesta i les altres plaques és molt evident. Les colònies són molt petites; hi ha un total de 476 colònies, més que al control, que n'hi ha 101; però això és normal ja que en aquest cas hem sembrat un 10% més de cèl·lules. Entre aquestes 476, 14 són de color marró fluix.

També podem veure que la placa s'ha contaminat.



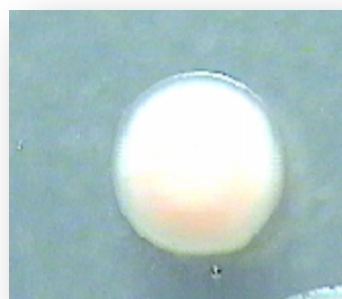
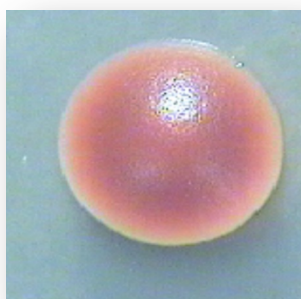
ANÀLISI DISCUSSIÓ

La valoració global que podem treure és que ha sortit tot el contrari al que nosaltres esperàvem; a mesura que anem augmentant el temps, les colònies són més abundants en les plaques. El que s'esperava, tal i com ha passat en la radiació solar, és que com més temps estiguessin les plaques exposades a la radiació del fluorescent, en elles hi creixessin menys colònies ja que es trobarien afectades i no es reproduirien o simplement, en no poder reparar les errades de l'ADN, moririen.

Ha passat a l'inrevés, conforme les plaques han estat més temps irradiades, han crescut més cèl·lules i a les que han estat menys temps quasi no hi ha colònies.

En la última placa, la d'1 hora, la presència de colònies és molt alta; això és degut a que vam sembrar més cèl·lules, concretament la dilució anterior; d'aquesta manera, si creixen més colònies, estadísticament els resultats seran més fiables per obtenir la taxa de mutació.

Respecte al color de les colònies, ens passa el mateix que amb el color de les colònies de les plaques exposades a la radiació solar, les que són diferents a les colònies vermelles, és a dir, les que se suposa que han sofert alteracions en l'ADN, no han sortit de color blanc com era d'esperar sinó que són d'un color marró molt estrany. De blanques es poden veure dos o tres colònies petites.



Aquest tipus de colònies són les que trobem i gràcies als experiments realitzats en la radiació solar, sabem que tant una com l'altra es tracten de mutacions.

(Protocol pàgina 79)



REFLEXIÓ

Un cop observats els resultats, veiem que han estat totalment diferents als esperats; això ens ha portat a pensar que:

- ✓ Respecte al fet de que hagin crescut més colònies a les plaques que han estat més temps irradiades: igual se'ns està escapant alguna variable i no l'estem tenint en compte.
- ✓ Pel que fa al color de les colònies, que hagin sortit marrons i no blanques, tret de dos o tres, pot ser degut a que s'hagi produït una mutació diferent i per tant, aquestes colònies si siguin colònies mutades igual que en el cas de la radiació solar.
- ✓ El medi utilitzat *Sabouraud Dextrose Agar*, diferent del medi YPD que vam fer servir en els primers experiments faci que el color de les colònies variï i per tant, els resultats siguin diferents.



SACCHAROMYCES CEREVISIAE EXPOSAT A LA RADIACIÓ D'UN FLUORESCENT DE 4W

SEGON PROTOCOL



METODOLOGIA

En aquest segon protocol, per començar, intentarem eliminar dubtes respecte al medi de cultiu. Comprovarem si el comercial (Sabouraud Dextrose Agar) produeix un creixement diferent de *Saccharomyces* i per tant, fa que els resultats variïn i siguin diferents als esperats.

Per fer-ho, farem una rèplica d'aquest protocol on enlloc d'utilitzar el medi de cultiu Sabouraud Dextrose Agar utilitzarem el medi d'YPD que vam utilitzar en els estudis preliminars a aquests.

DISSENY EXPERIMENTAL

✓ **OBTENCIÓ DE COLÒNIES VERMELLES QUE ESTIGUIN FRESQUES**

(veure procés en la pàg.35)

✓ **LES CÈL·LULES SOTA LA RADIACIÓ D'UN FLUORESCENT DE 4W**

(mateix procediment que en la pàg. 83)

➤ UTILLATGE:

1. Bec de Bunsen
2. Nansa de sembra rodona
3. Etanol
4. Nansa de sembra de vidre
5. **Plaques amb medi de cultiu YPD**
6. YPD
7. Eppendorfs esterilitzats
8. Pipetes
9. Puntetes per a les pipetes
10. Llums

❖ *L'únic canvi realitzat en aquesta rèplica és que les plaques on seran exposades les cèl·lules de llevat és diferent, per tant, l'únic que canvia són les plaques.*


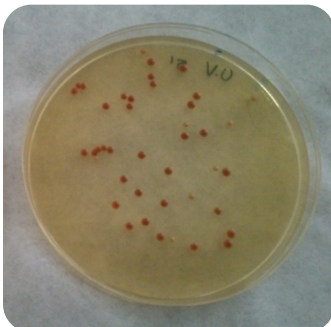


➤ PROCEDIMENT

(mateix procediment que en el primer protocol; **(veure pàg. 83)**)

RESULTATS OBTINGUTS

Després d'esperar els tres dies, ja hem pogut observar i analitzar els resultats:

TEMPS	FOTOGRAFIA PLACA	COMENTARI
CONTROL		Podem veure que les colònies són molt igual entre elles respecte mida i color. Hi ha un total de 41 colònies.
5'		Les colònies es mostren diferents respecte a la placa control; la seva mida és més petita i n'hi ha que són de diferent color, de color rosa. Hi ha un total de 41 colònies vermelles, 8 de color diferent.

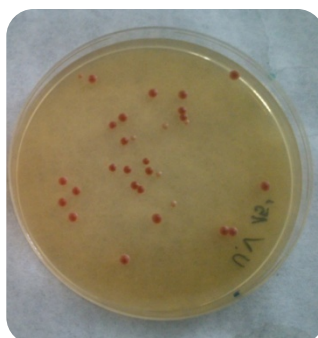


10'



Passa el mateix que a la placa anterior, colònies petites i de diferent color al vermell.
Hi ha un total de 35 colònies on 4 són rosat.

15'



Hi ha menys colònies, un total de 30 vermelles on 6 són diferent.
El tamany és igual en totes les colònies.

30'



En aquesta placa podem veure 25 colònies en total, on 4 són de color maró-rosat.



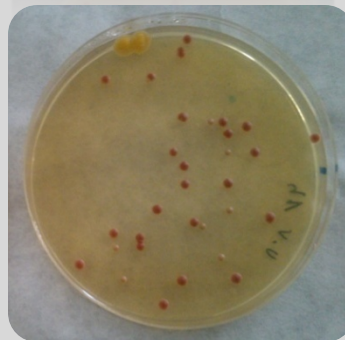
45'



En aquesta placa podem tornar a veure que el nombre de colònies va disminuint respecte anem augmentant el temps.

Hi ha un total de 34 colònies vermelles on 7 són de diferent color.

1 HORA



Trobem que hi ha menys colònies que a l'anterior; també es pot observar que han crescut 7 colònies rosa i 30 vermelles.

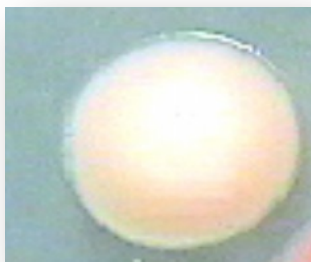
Es pot apreciar una petita contaminació de color groc.

ANÀLISI I DISCUSSIÓ

Després d'esperar tres dies, ja hem pogut observar i analitzar els resultats del segon protocol.

El que buscàvem en aquest experiment a part de si la llum del fluorescent alterava l'ADN de *Saccharomyces* per tant, els hi provoca mutacions era comprovar si canviant el medi de cultiu comercial per l'YPD els resultats sortien com esperàvem.

Com ja hem pogut observar, el nombre de colònies va disminuint respecte el temps exposat a la radiació; això és degut a la mort cel·lular que pateixen les cèl·lules al ser exposades la radiació ultraviolada.



En aquest cas, al fer el canvi de medi de cultiu, ens trobem colònies de color rosat, que suposem que a l'igual que les marrons, es tracten de mutacions.

REFLEXIÓ

Una vegada hem analitzat els resultats veiem que al fer el canvi de medi de cultiu, l'experiment s'acosta al que buscàvem al principi ja que veiem que la radiació del fluorescent afecta negativament sobre les cèl·lules de *Saccharomyces* ens surten colònies rosades, és a dir, no són roges i per tant, han mutat. Tot i que no són de color blanc ni marró com amb el medi de cultiu comercial.

Per tant, al fer aquesta rèplica del primer protocol, ens hem donat compte del perquè irregularitats en el primer.

A partir d'aquí podem començar a eliminar algun dels dubtes que ens van sorgir al principi; per començar, el que podem afirmar ja és que sembla que aquest medi de cultiu utilitzat en la rèplica del primer protocol, el medi de cultiu YPD, és més estable per les cèl·lules de *Saccharomyces* enlloc que el medi comercial, el *Sabouraud Dextrose Agar*.

Una vegada hem arribat fins aquí, analitzarem el resultats dels segon experiment, ja que en el primer hem comes algun error de dilució en algunes plaques i els resultats no son comparables.



❖ IRRADIACIÓ (PRIMER PROTOCOL)

PLACA	BLANQUES	MARRÓ FLUIX	VERMELLES	TOTAL
CONTROL	0	0	146	146
5'	0	0	1	11
10'	1	0	10	11
15'	0	5	6	11
30'	3	2	94	99
1 h				

Les irregularitats que es poden apreciar són moltes; per començar, en el gràfic, el nombre total de colònies varia molt i no compleix la nostra hipòtesis de que com més temps exposant la placa menys colònies.

Creiem que vam cometre algun error a l'hora de plaquejar com es pot apreciar com en l'última placa, la d'una hora, hi ha una gran diferència entre el nombre total de colònies respecte la placa control ja que vam plaquejar un 10% més de cèl·lules.

146

11

11

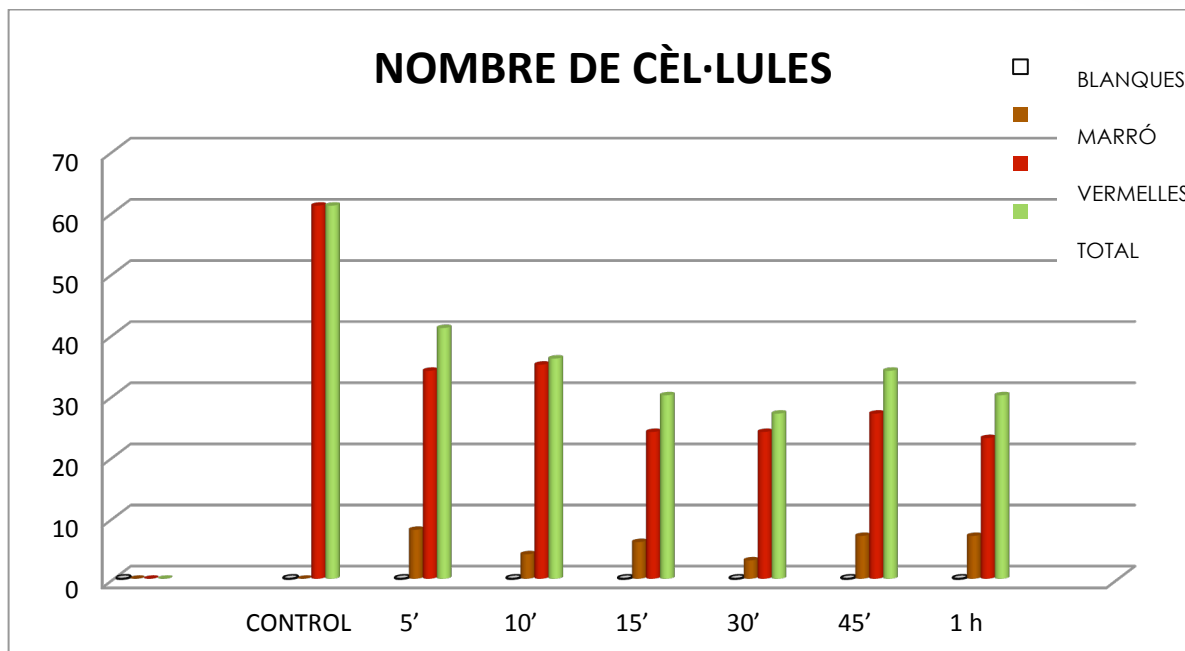
11

99

473

❖ RÈPLICA IRRADIACIÓ

PLACA	BLANQUES	MARRÓ FLUIX	VERMELLES	TOTAL
CONTROL	0	0	61	61
5'	0	8	34	41
10'	0	4	35	36
15'	0	6	24	30
30'	0	3	24	27
45'	0	7	27	34
1 h	0	7	23	30



Els canvis en aquesta rèplica són clarament favorables ja que veiem que el nombre de colònies total va disminuint i el nombre de colònies mutades va augmentant respecte el temps, tot i que no és complex sempre.

REFLEXIÓ

Tot i això, cal encara assegurar-nos que les colònies blanques, marró i rosades realment són mutacions provocades per la RU. També hem de comprovar que ambdós mutacions, marró, produïda en el medi de cultiu comercial i rosada en medi YPD són la mateixa mutació.

Per fer-ho, realitzarem el següent protocol:

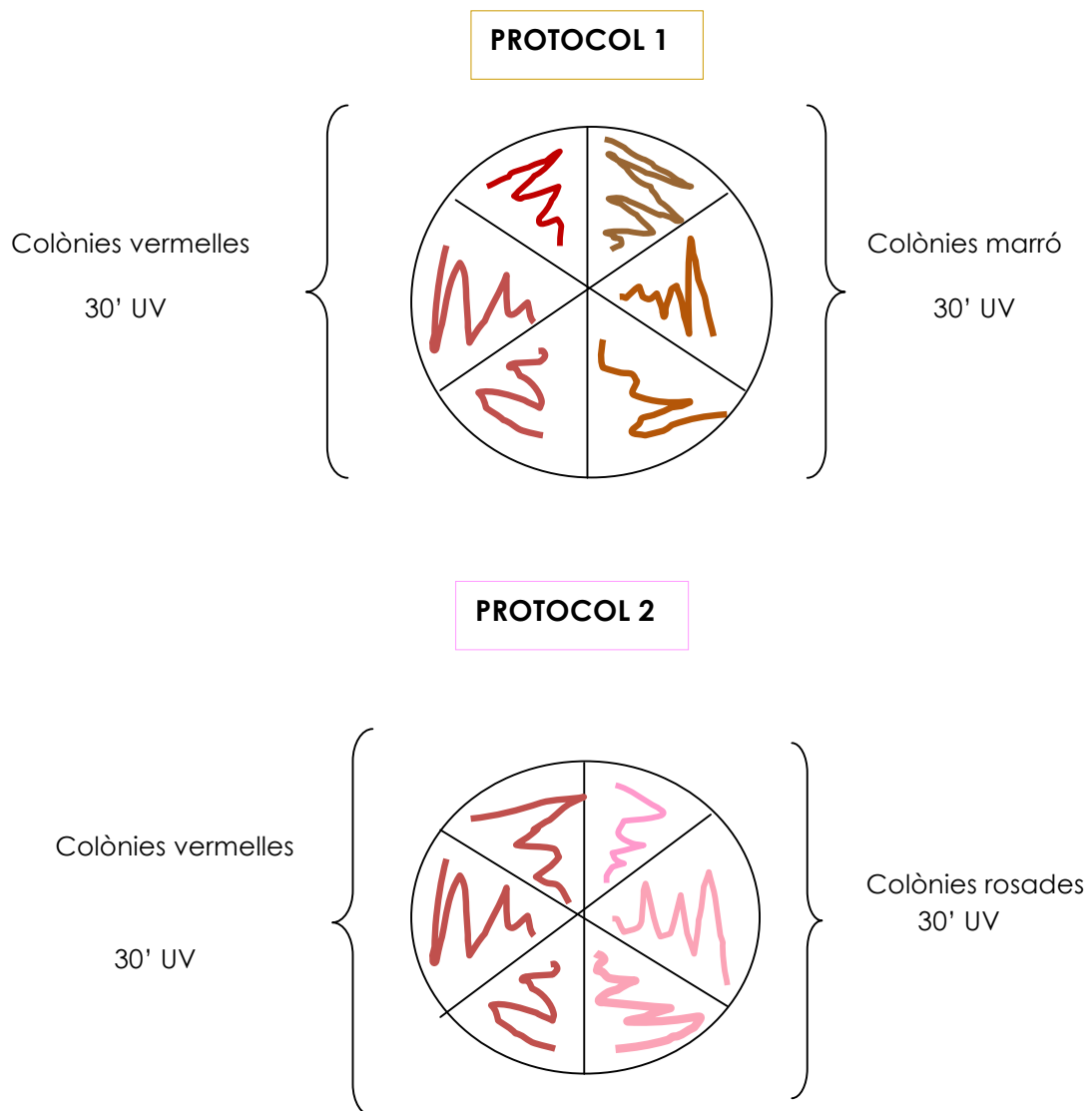


METODOLOGIA

En aquest experiment comprovarem si el color marró i blanc de les colònies del primer protocol (medi comercial) i el color rosat de les colònies en la rèplica (medi YPD) es manté constant i per tant, són mutacions.

Per realitzar-ho, durem a terme el mateix protocol que en la pàgina 76.

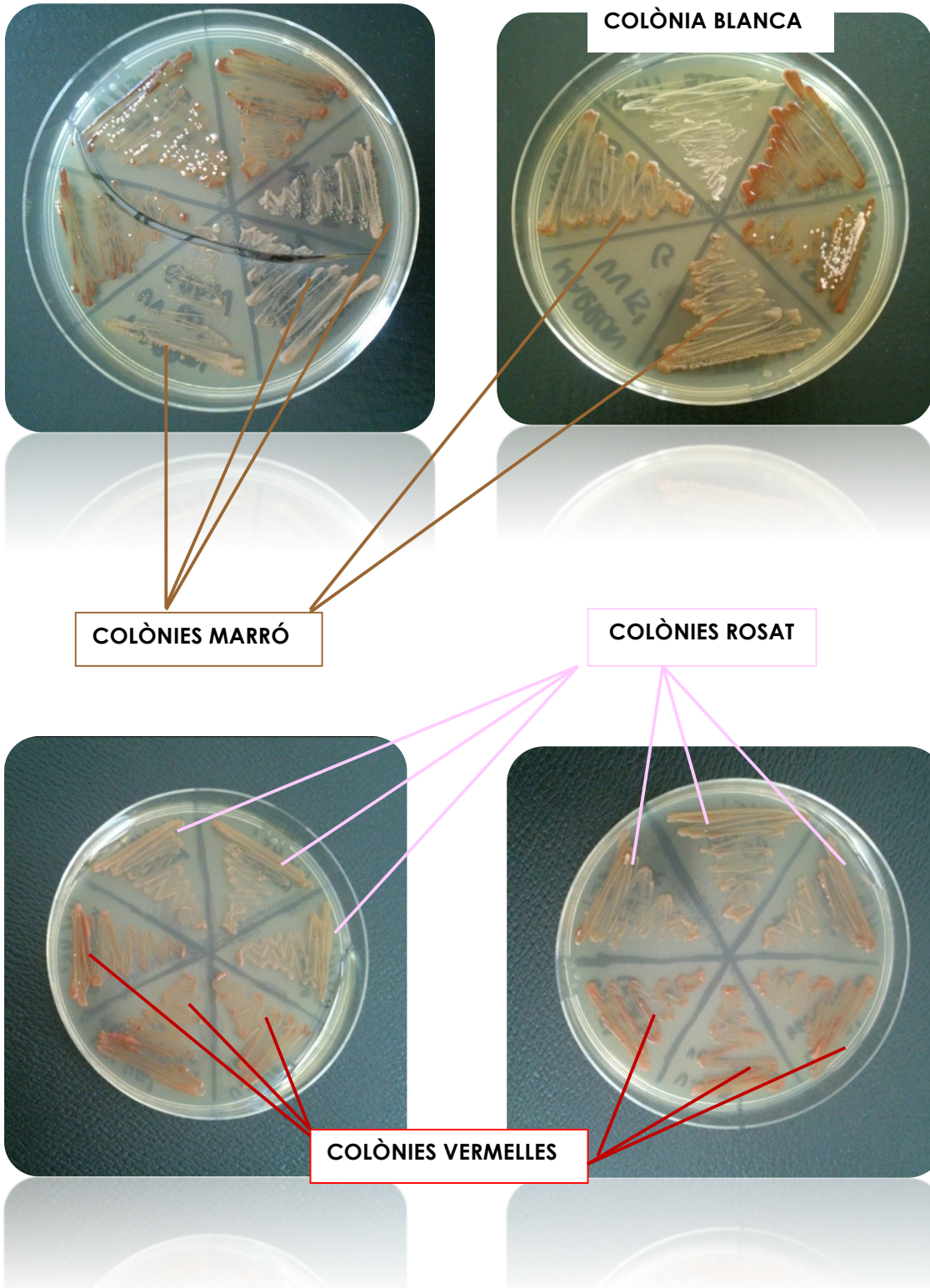
- ❖ *En aquest cas el que canvia és el color de les colònies que se suposa que han mutat:*





RESULTATS OBTINGUTS

❖ **PROTOCOL 1 (MEDI COMERCIAL):**





ANÀLISI I DISCUSSIÓ

Tal i com es pot observar en les fotografies, les colònies rosades, marrons i blanc són diferents a les colònies vermelles, cada una ha mantingut el seu color durant el creixement en una nova placa.

REFLEXIÓ

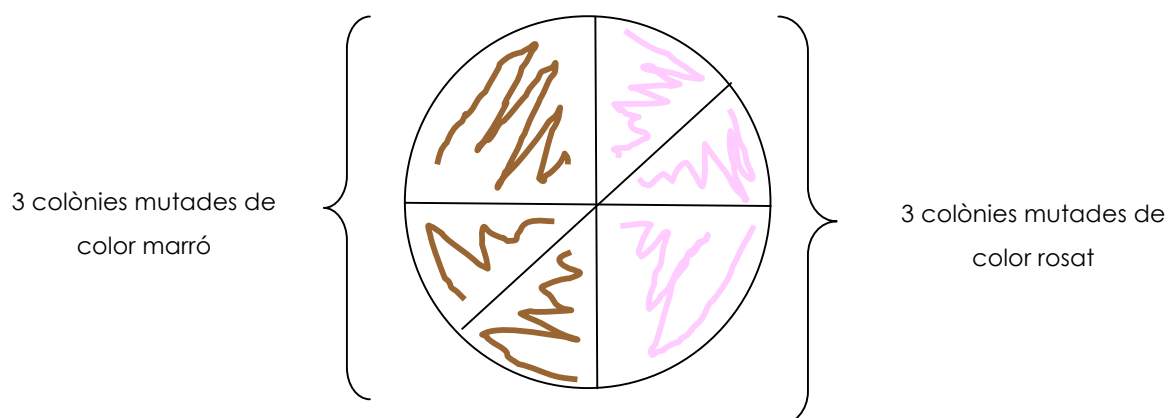
Una vegada hem analitzat els resultats veiem que una de les nostres hipòtesis era certa.

Les colònies de color rosades **sí que són mutacions**, per tant, el seu ADN ha sofert canvis induïts per la radiació UV del fluorescent. Ens trobem amb el mateix cas que en les colònies de color marró que ja havíem vist en el cas de la llum solar, i tant unes com les altres són colònies mutades.

Així veiem que no importa el medi de cultiu que utilitzem ja que tant en l'un com l'altre les cèl·lules sofreixen mutacions que són observades a simple vista.

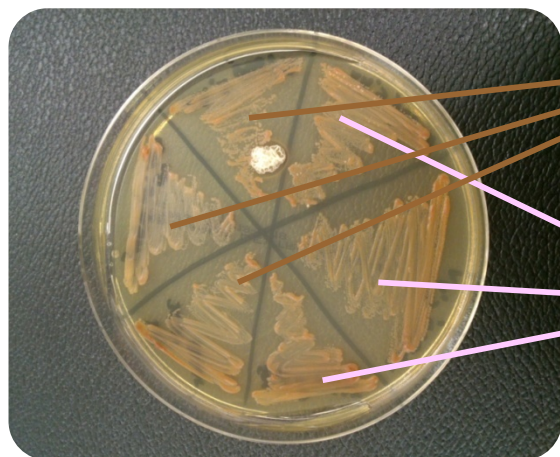
Per tant, el que ens queda és comprovar si es tracten de mutacions diferents o és la mateixa; per fer-ho, realitzarem el mateix protocol que en la pàgina 76 on utilitzarem el mateix medi de cultiu al creixement de les colònies mutades, el *Sabouraud Dextrose Agar*.

❖ Esquema del muntatge:





RESULTATS OBTINGUTS, ANÀLISI I DISCUSSIÓ



COLÒNIES MARRÓ

COLÒNIES ROSAT

Tal i com podem observar en la imatge, es veu clarament que encara que les colònies siguin de color diferent, sofreixen la mateixa mutació; ja que en créixer en el mateix medi de cultiu totes són igual; al final la mutació ha resultat ser la mateixa.

Les cèl·lules de llevat, tot i créixer en un medi de cultiu diferent, la radiació ultraviolada els afecta de la mateixa manera provocant-hi exactament la mateixa mutació, l'ADN absorbeix molt la radiació tot provocant l'ascensió d'alguns electrons a graus o orbitals de més energia, això fa que es formin els anomenats dímers de timina.

Canviar el medi de cultiu només afecta en que el color de les colònies mutades sigui diferent i que en el cas de la radiació del fluorescent, els resultats siguin més favorables.



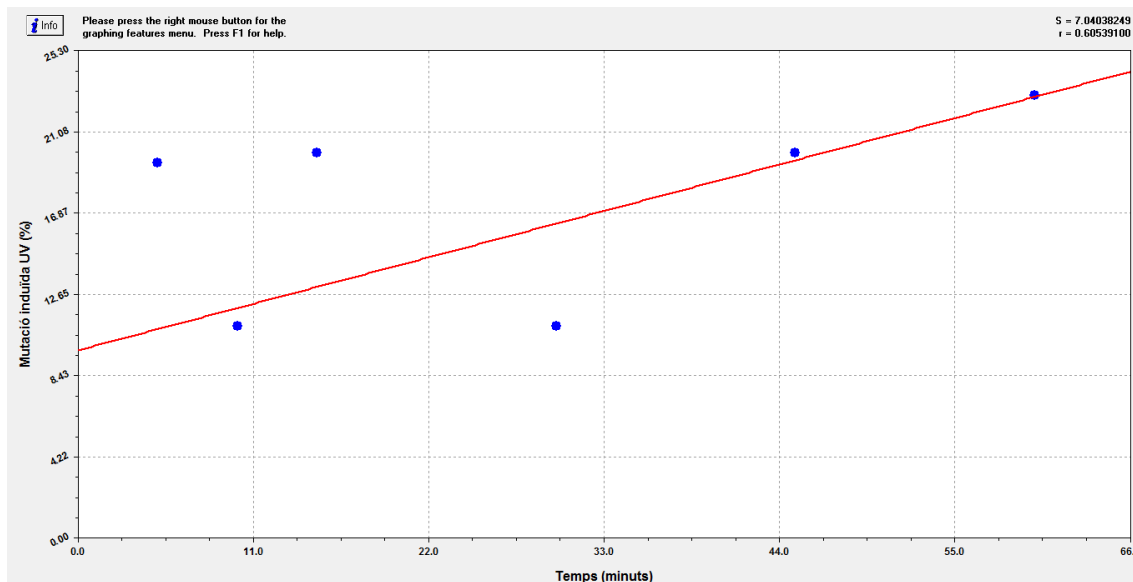
REFLEXIÓ

Per últim, calcularem el percentatge mutagènic de la llum ultraviolada de cada placa exposada un temps concret a la radiació. D'aquesta manera podrem comprovar quant és de mutagènica la radiació i si a l'augmentar el temps d'exposició de les cèl·lules a ella, més mutagènica és.

Ho farem només del resultat de la rèplica i sota de la graella adjuntarem la recta de regressió realitzada amb el programa *Curvexpert* que ens ajudarà a entendre els resultats.

❖ RÈPLICA IRRADIACIÓ

PLACA	PERCENTATGE MUTACIÓ ESPONTÀNIA	PERCENTATGE MUTACIÓ INDUÏDA RADIACIÓ
CONTROL	0%	0%
5'	19,5%	19,5 %
10'	11%	11%
15'	20%	20%
30'	11%	11%
45'	20%	20%
1h	23%	23%



El percentatge mutagènic (Y) va augmentant respecte al temps d'exposició a la llum solar (X). D'aquesta manera podem concloure que la llum ultraviolada té un efecte mutagènic considerable; gràcies al coeficient de determinació (R^2) obtenim que les dues variables, estan relacionades en un 37%. No és tan elevat com en el cas de la llum solar però tal i com mostra el gràfic, conforme deixéssim les cèl·lules més temps, aquestes anirien patint un efecte mutagènic cada cop més elevat.

R (relació lineal que hi ha entre el temps i el percentatge mutagènic) = 37%

En aquesta rèplica ja podem veure que els canvis han anat a millor, clarament veiem que en la placa de 5 minuts el percentatge és del 19% mentre que a la placa d'una hora del 23%, per tant, com més temps estiguin exposades les cèl·lules, més perjudicial és. **Això és el que des del principi volíem demostrar.**



CONCLUSIONS

- **CONCLUSIONS CIENTÍFIQUES:**

EXPERIMENTANT AMB *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Càlculs i estudispreliminars.

- ***Com podem obtenir colònies aïllades de Saccharomyces?***

Seguint tots els passos adequats del procediment i gràcies al protocol realitzat, hem estat capaços d'obtenir colònies aïllades de cèl·lules de llevat per posteriorment poder treballar amb la nostra pròpia investigació.

- ***Podrem esbrinar el nombre de cèl·lules que hi ha en una colònia de Saccharomyces per saber posteriorment les dilucions que hem de fer per sembrar les plaques de les nostres investigacions?***

Doncs bé, partint de la dada bibliogràfica de que en una mostra amb densitat òptica (OD amb llum de 600 nm) de 0.6 hi ha aproximadament $3 \cdot 10^7$ cèl·lules, i de la OD de les nostres mostres, vam poder dur a terme els càlculs corresponents i esbrinar que el nombre de cèl·lules que hi ha en una colònia d'entre 2 i 3 cm és aproximadament de $3 \cdot 10^8$ cèl·lules.

Per plaquejar tantes cèl·lules com ens interessava, aproximadament 1000-1500 en 50 µl, de les quals creixen aproximadament un 20%, les dilucions que havíem de fer d'una mostra de 1000 µl amb una colònia en dilució eren quatre, al 10% cada una.

- ***Podrem elaborar un protocol que ens permeti detectar i quantificar les mutacions produïdes per un agent mutagen, en aquest cas, el peròxid d'hidrogen?***

Gràcies als càlculs anteriors, vam ser capaços de dissenyar un protocol que ens acostés a veure les mutacions que produïa un agent mutagen. Com en tot investigació, no vam realitzar només un sol experiment sinó que vam fer rèpliques per corroborar millor els resultats.



D'aquesta manera, després de seguir el protocol vam poder quantificar les mutacions produïdes pel peròxid d'hidrogen i vam trobar colònies on la mutació havia afectat de manera diferent, en unes els va afecta a totes les cèl·lules de la colònia mentre que a les altres, només en una part:



Mutacions en la via de l'adenina que fan que ja no s'acumuli el metabòlit vermell i per tant, la cèl·lula mutada i les seves descendents siguin blanques.



Colònies petites i blanques que les mutacions tenen lloc en l'ADN mitocondrial, no poden respirar ni fer el metabolisme aeròbic i per tant han de fermentar, amb la conseqüència que no tenen tanta energia i per tant el creixement és més lent.

- Aquest protocol el podeu veure en la pàgina 56.

SACCHAROMYCES CEREVISAE SOTA ELS EFECTES DE LA LLUM ULTRAVIOLADA

Saccharomyces cerevisiae exposat a la radiació solar.

- ***Serem capaços d'elaborar un protocol que ens serveixi per dur a terme la investigació sobre l'efecte mutagènic de la radiació solar?***

Doncs bé, després de fer els intents amb el peròxid d'hidrogen, vam ser capaços d'elaborar un protocol on vam poder veure com afectava la radiació solar a les cèl·lules de llevat. Ens van sortir certes colònies d'un color que no esperàvem, marró clar, i com a conseqüència, vam haver d'elaborar més dissenys experimentals per poder afirmar si es tractava o no d'una mutació.

Aquests protocols els podeu veure a partir de la pàgina 66.

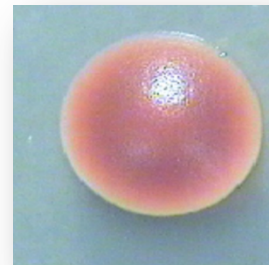


- **Serem capaços de reconèixer i fotografiar les diferents colònies mutades?**

Després d'esperar els dies corresponents perquè creïessin les colònies, vam detectar colònies blanques, que ja sabíem que eren colònies mutades pels experiments realitzats en el peròxid d'hidrogen i per sorpresa, ens vam trobar amb colònies de color marró.



COLÒNIA BLANCA



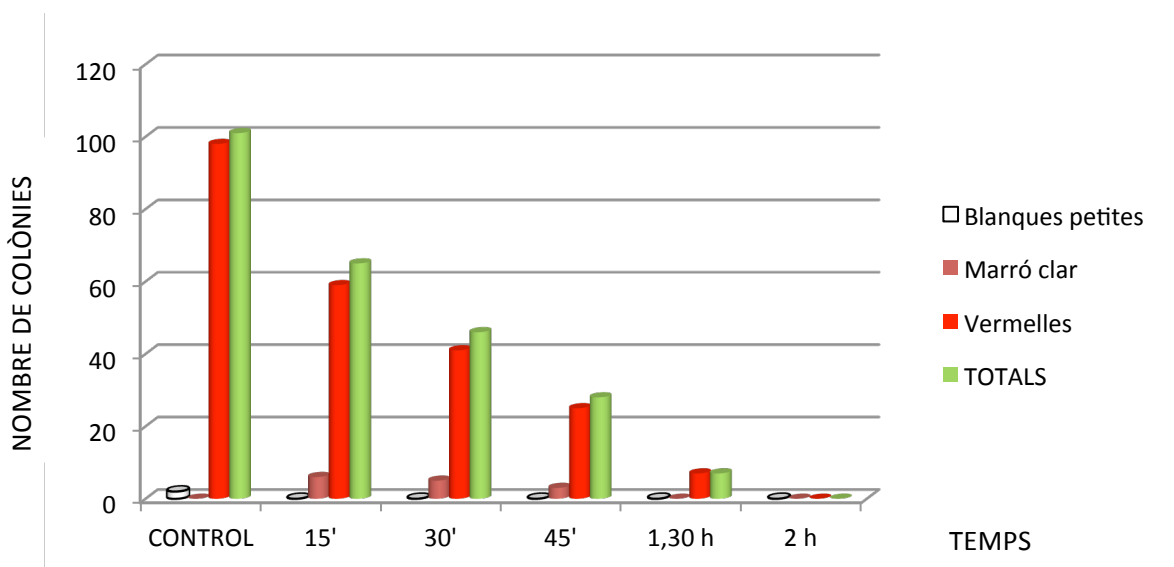
COLÒNIA MARRÓ CLAR

Com no sabíem si es tractaven de colònies mutades, vam realitzar un protocol per comprovar-ho, obtenim que les colònies de color marró **si són mutacions**.

Per tant, hem estat capaços de reconèixer i fotografiar les diferents colònies mutades, les blanques petites i les marrons.

- **A partir de quin període d'exposició la llum solar comença a produir efectes negatius sobre *Saccharomyces*?**

Un cop crescudes, vam passar a fer un recompte de colònies on vam poder diferenciar les colònies que no havien sofert mutacions, de les que sí.

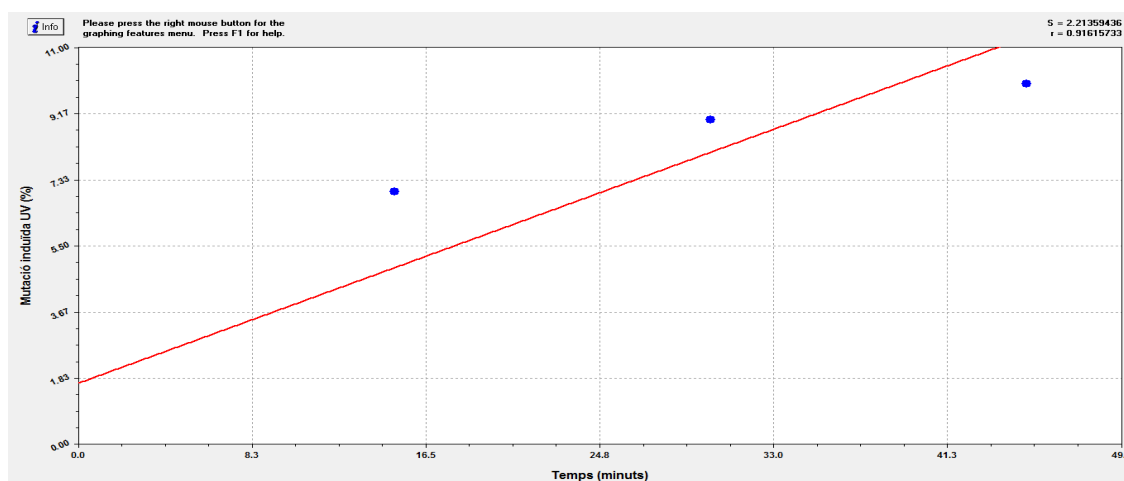




Observant el gràfic veiem que amb 15 minuts la llum solar ja comença a produir mutacions, a l'hora que es redueix el nombre de colònies totals, però quan es completament letal, és a dir, les cèl·lules ja no poden sobreviure ni reparar el seu ADN, és entre una hora i mitja i dues hores, on veiem que ja no ha crescut cap colònia.

- **Podrem quantificar l'efecte mutagènic de la llum solar?**

Per acabar de concloure l'efecte de la llum solar, vam realitzar la recta de regressió amb els percentatges de mutació induïda:



El percentatge mutagènic (Y) va augmentant respecte el temps d'exposició a la llum solar (X). D'aquesta manera podem concloure **que la llum solar té un efecte mutagènic molt fort**; gràcies al coeficient de determinació (R^2) obtenim que **les dues variables, efecte i temps, estan relacionades en un 84%**. Conforme anem deixant les cèl·lules més temps, aquest efecte va augmentant i es converteix en un efecte letal al suïcidar-se les cèl·lules per apoptosi al no poder reparar els danys soferts per l'ADN.

- **La radiació solar és cancerígena?**

Després de veure i realitzar tots els experiments, podem constatar clarament que la radiació solar és cancerígena. Aquesta provoca alteracions a l'atzar a l'ADN, concretament dímers de timina. Mutacions que a partir d'un cert punt la cèl·lula no pot reparar; si aquestes mutacions afecten a gens reguladors del cicle cel·lular, poden provocar que malauradament aquestes cèl·lules es reproduïxin molt ràpidament, formant tumors en organismes pluricel·lulars. Per tant, cal prendre mesures a l'hora de prendre el sol o realitzar qualsevol activitat que estigui relacionada amb la llum solar.



Saccharomyces cerevisiae exposat a la radiació ultraviolada.

- **Serem capaços d'elaborar un protocol que ens serveixi per dur a terme la investigació sobre l'efecte mutagènic de la radiació ultraviolada?**

Després de dos intents, vam trobar el protocol que ens va servir per veure l'efecte mutagènic de la radiació ultraviolada, produïda per un fluorescent de 4W.

En el primer protocol, els resultats no van ser els esperats ja que no es complia que com més temps les plaques estaven irradiades, menys colònies creixien, malauradament, passava tot el contrari. Cada vegada que realitzàvem alguna prova, fèiem una reflexió que ens ajudava a avançar en la investigació; vam decidir fer una rèplica canviant el medi de cultiu utilitzat (*Sabouraud Dextrose Agar*) per medi YPD, i els resultats van ser els esperats.

A partir de la pàgina 76 es poden trobar el primer i segon protocol.

- **Serem capaços de reconèixer i fotografiar les diferents colònies mutades?**

En el primer protocol, les colònies que vam poder veure van ser les mateixes que en els resultats de la llum solar, les colònies vermelles (no mutades), les blanques petites i les marrons.

Respecte al color de les colònies mutades en la rèplica, vam poder observar que al canviar el medi de cultiu, el color era diferent, un color rosat.

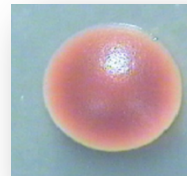
Per tant, si vam ser capaços de reconèixer i fotografiar les colònies mutades; en els dos protocols realitzats, les colònies obtingudes eren les següents:



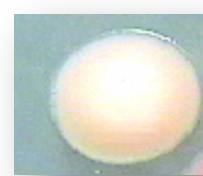
COLÒNIA VERMELLA



**COLÒNIA BLANCA
PETITA**



**COLÒNIA MARRÓ
CLAR**



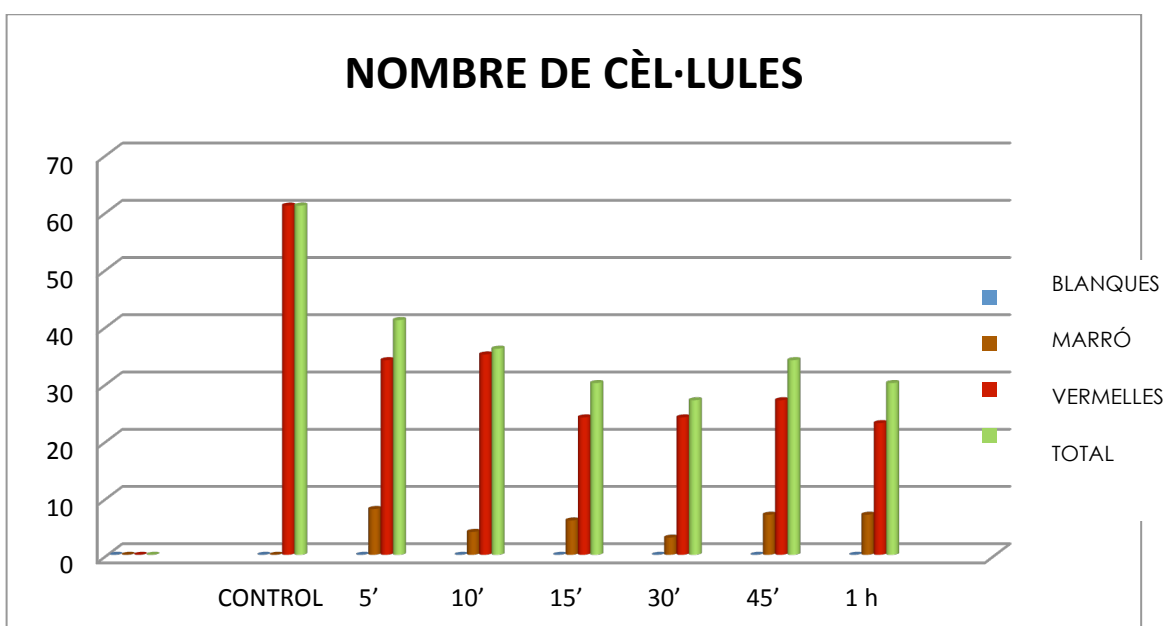
COLÒNIA ROSADA



Tal i com vam realitzar amb la llum solar, per veure si les colònies de color marró eren mutacions, vam repetir amb les colònies rosades i vam obtenir que sí són mutacions ja que segueixen el seu creixement totalment diferent a les colònies vermelles originals, i quan es sembren en el mateix medi de cultiu colònies marró clar i rosades, resulta ser la mateixa mutació.

- **A partir de quin període d'exposició la radiació ultraviolada comença a produir efectes negatius sobre *Saccharomyces*?**

En el primer protocol no vam poder treure bons resultats, no va ser fins en el segon que vam poder veure l'efecte mutagènic de la radiació UV del fluorescent.

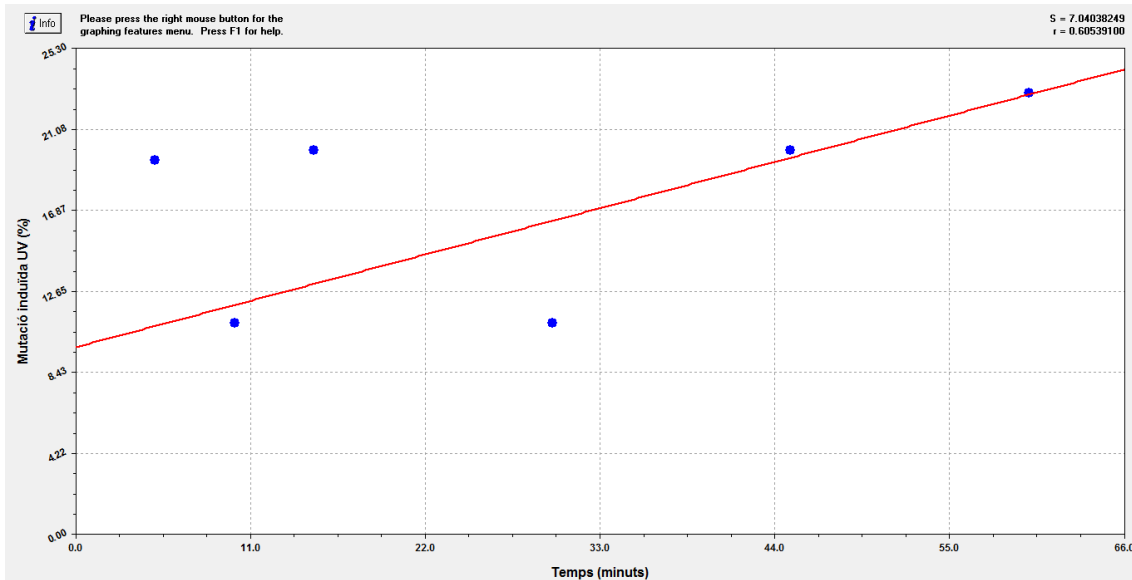


En la rèplica amb medi YPD, els resultats van millorar i vam poder veure el mateix que en la radiació solar, com més temps irradiàvem les plaques, menys colònies creixien ja que no sobreviuen a tanta irradiació.

Podem concloure doncs que la llum ultraviolada és perjudicial des del primer moment en que comencem a irradiar la placa ja que en la de 5 minuts van sortir colònies mutades i és va reduir en un 33% el número de colònies.

- **Podrem quantificar l'efecte mutagènic de la llum ultraviolada?**

Per acabar de concloure l'efecte de la radiació ultraviolada, vam realitzar una recta de regressió amb els resultats dels percentatges de mutació induïda de la rèplica del primer protocol perquè són els que finalment s'han acostat més al que buscàvem i esperàvem.



R (relació lineal que hi ha entre el temps i el percentatge mutagènic) = 37%

En aquesta rèplica ja podem veure que els canvis han anat a millor, clarament veiem que en la placa de 5 minuts el percentatge és del 19% mentre que a la placa d'una hora del 23%, per tant, com més temps estiguin exposades les cèl·lules, més perjudicial és. **Això és el que des del principi volíem demostrar.**

- La radiació dels fluorescents de radiació ultraviolada és cancerígena? Hi ha alguna relació amb els fluorescents dels salons d'estètica?

Com hem pogut observar en els experiments realitzats, la radiació ultraviolada, que forma part de l'espectre de la llum solar que arriba a la superfície de La Terra, és mutagènica i per tant potencialment cancerígena.

Respecte a si hi ha alguna relació, tenint en compte que el nostre fluorescent emet raigs ultraviolats del tipus A i als salons d'estètica també, tot i que últimament utilitzen els de tipus B per imitar l'espectre solar i que a l'hora de bronzejar els resultats més o menys s'assemblin, podem dir que el nostre enginy amb *Saccharomyces* és com una cambra de raigs UVA per nosaltres; és a dir, cada vegada que anem a fer-nos alguna sessió, encara que sigui de poc temps, les nostres cèl·lules sofreixen canvis en l'ADN; amb una o dues sessions, igual no passaria res ja que existeixen els mecanismes de reparació que podrien reparar aquests danys o simplement les cèl·lules afectades se suicidarien, però, quan es fan sessions contínuament i amb gran freqüència, la nostra



pell corre perill i per tant, estem arriscant-nos a que arribi un moment en que aquests mecanismes no puguin reparar els danys i s'acabi esdevenint càncer.

- **POSSIBLES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ POSTERIORS**

Després d'haver realitzat aquesta recerca, ens donem compte de que la investigació pot seguir endavant si es vol treballar sobre un tema relacionat al nostre.

Les possibles línies d'investigació posteriors que plantegem són les següents:

- Dissenyar un espectrofotòmetre, que ens permeti mesurar el nombre de microorganismes que volem sembrar, amb els mitjans del laboratori.
- Efectes de les cremes solars, ulleres de sol, teixits protectors, etc...
- Hores del dia en que és millor o pitjor prendre el sol.
- Efecte de l'alçada sobre el nivell del mar en la radiació solar i en el seu poder mutagènic.
- Efecte de filtre de l'ozó sobre la radiació UV.
- Investigar l'acció d'altres agents mutàgens.

- **CONCLUSIONS PERSONALS**

Realitzar aquest treball de recerca ha significat un repte; primer perquè dur a terme un treball d'aquesta envergadura no es fàcil i per una altra banda, perquè requereix molt temps. Quan veus que les coses no et surten a la primera, t'amoïnes i penses que ja no et sortiran més i que la teva recerca ja no valdrà. Això acaba passant quan et rendeixes, però, si segueixes endavant i dones el millor de tu, al final serà el que tu vulguis que sigui. Això és el que m'ha passat a mi durant aquests mesos, al principi quan realitzava els experiments, no era gens fàcil però amb esforç, acabes aconseguint allò que et proposes.

En aquest recerca he intentat posar tres ingredients essencials perquè al final els resultats siguin els esperats: ganes, paciència i sobretot, esforç.



Agraeixo haver-lo realitzat perquè gràcies a ell he pogut fer un petit pas en el món de la investigació i de la medicina, que és una de les coses que des de petita m'apassiona, i m'agradaria, en un futur, poder estudiar, dedicar-m'hi i sobretot, seguir aprenent.

Per això, ara que el treball ja està finalitzat, si l'he de definir amb una paraula, és satisfacció, ja que com he dit al principi, ha suposat un repte i crec, que ha estat superat.



BIBLIOGRAFIA

- *Biologia 1r Batxillerat*. Grup Promotor Santillana. 2012
- **WEBGRAFIA**
 - <http://www.xtec.net/~mbarrio/sacharomyces.htm>
 - <http://www.molbiolcell.org/content/9/12/3273.short>
 - www.viquipedia.cat
 - www.wikipedia.org
 - <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/14817/1/practica3RUA.pdf>
 - http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/1/LAJOP_25_1_5_1_AHEJ519796.pdf
 - <http://metode.cat/Revistes/Monografics/Radiacions/Efectes-biologics-de-les-radiacions-electromagnetiques-d-alta-energia>
 - http://www.iesguillemcifre.cat/menu7/menu7_2/biob2/TEMES/T14%20Les%20mutacions%201112.pdf
 - <http://www.slideshare.net/ciencias.mon.contemporani/mutacions>
 - <http://publicacions.iec.cat/repository/pdf/00000177/00000084.pdf>
 - http://www.udea.edu.co/portal/page/portal/BibliotecaPortal/ElementosDiseno/Documentos/SeguridadSocial/normas_luz_ultravioleta.pdf
 - <http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/227763-OMS1.pdf>



AGRAÏMENTS

Voldria agrair a tots aquells que han fet possible aquest treball de recerca ja que sense ells no hagués set el mateix.

En primer lloc he d'agrair a la meva tutora, Mercè del Barrio Arranz, que sense la seva ajuda, paciència i disponibilitat, aquest treball hauria estat molt difícil realitzar-lo. S'ha entregat en tot moment i ha estat sempre que l'he necessitat.

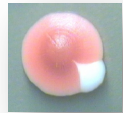
A continuació, he de donar les gràcies a la doctora M^a Ángeles de la Torre Ruiz, tutora del projecte lfinera, que ens ha facilitat el material que hem necessitat i ens ha ajudat i aconsellat en tot el que ha pogut. A més a més, ens ha deixat realitzar alguna pràctica en el departament "Senyalització de llevats -GSL" en l'Institut de Recerca Biomèdiques.

A qui també he de donar les gràcies és a la meva companya i amiga, M^a Luisa Rodríguez Sanz, que ha estat al meu cantó en tot moment, oferint-me la seva ajuda per qualsevol cosa i recolzant-me quan les coses no em sortien com esperava.

Una altra persona que mereix ser nombrada en aquests agraïments és l'Albert Minobes, que sense la seva caixa d'irradiació no sé com hauria pogut realitzar part de les pràctiques d'aquest treball.

Per acabar, no podia finalitzar els agraïments sense nombrar la meva família, ja que m'ha ajudat en tot moment i m'ha donat molts ànims sempre que ho he necessitat.

A tots, gràcies!



ANNEXOS



6.1. DISSENY I CONSTRUCCIÓ D'UNA CAIXA DE RADIACIÓ UV:

Es tracta de dissenyar i construir una caixa de radiació ultraviolada per tal de poder irradiar les cèl·lules de llevat i comprovar l'efecte mutagènic de la radiació.

➤ UTILLATGE:

- Làmpada fluorescent de radiació UVA (4 Watts):

Aquest tub fluorescent emet una llum ultraviolada de 365 nm de longitud d'ona, per tant serà útil com a font de radiació.



Imatge 68: Làmpada de radiació UVA

Albert Minobes

- Encebador:

Petit dispositiu que serveix per a iniciar la descàrrega elèctrica necessària per a que la làmpada fluorescent emeti la radiació ultraviolada.



Imatge 69: Encebador de la marca 'Philips'

Albert Minobes



- Reactància:

Aparell electromagnètic que utilitzem per a convertir un sistema de corrent altern en un altre de la mateixa freqüència, però d'intensitat i tensió diferents.



Imatge 70: Reactància

Albert Minobes

- 2 metres de fil elèctric:

- Per tal de connectar tots els dispositius del treball.



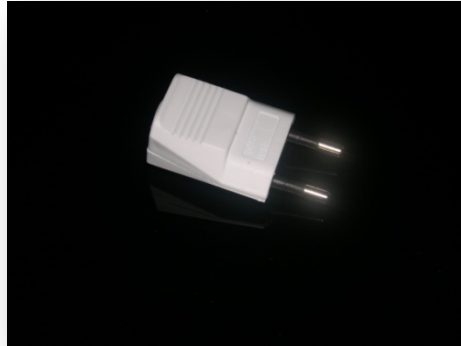
Imatge 71: Fil elèctric simple

Albert Minobes



- Endoll:

Dispositiu que ens permetrà connectar el nostre muntatge a la corrent elèctrica.



Imatge 72: Endoll

Albert Minobes

- Interruptor:

Aquest dispositiu ens permetrà obrir i tancar el circuit elèctric.



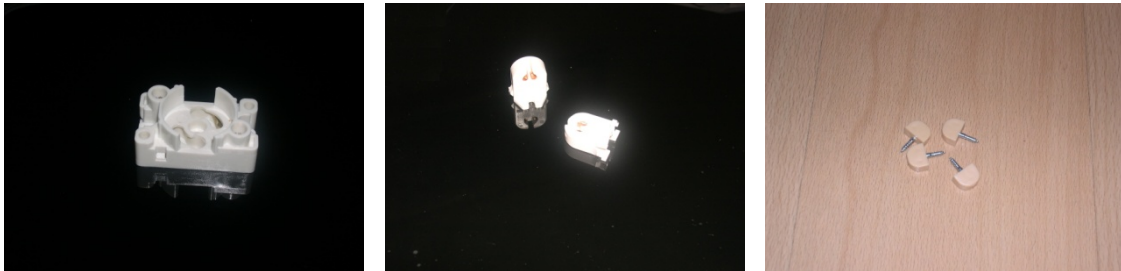
Imatge 73: Interruptor

Albert Minobes



- Suport per l'encebador, el fluorescent i el vidre:

Permetran aguantar aquests materials.



Imatge 74: Suports

Albert Minobres

- 4 rectangles de fusta:

Serán els que formen el cos de la caixa i han de ser igual 2 a 2, amb mides de 410 x 180 mm i 180 x 170 mm. Les fustes utilitzades seran de xapa natural i de 10 mm de gruix.

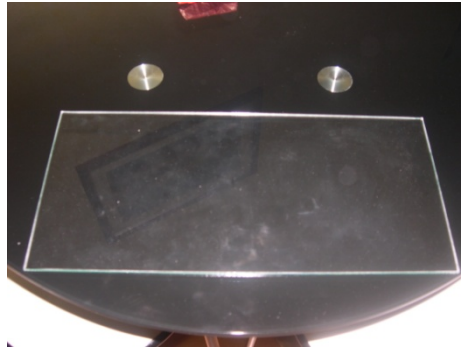


Imatge 75: Xapa natural de 180 x 170 mm

Albert Minobres

- Vidre:

L'utilitzarem per col·locar-hi els filtres. Les seves mides són 385 x 180 mm i 3 mm de gruix.



Imatge 76: Vidre de mides adequades

Albert Minobes

- 4 visos:

Aquests serviran per subjectar les fustes del muntatge.

- 2 rectangles de cartolina:

Aquests ens protegiran els ulls del contacte directe amb la radiació ultraviolada. Les seves mides són 410 x 85 mm. A més, necessitarem xinxetes per subjectar-los.

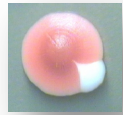


Imatge 77: Cartolina de la que obtindrem els dos rectangles

Albert Minobes

- Vernís:

Ens servirà per millorar l'acabat de la caixa.



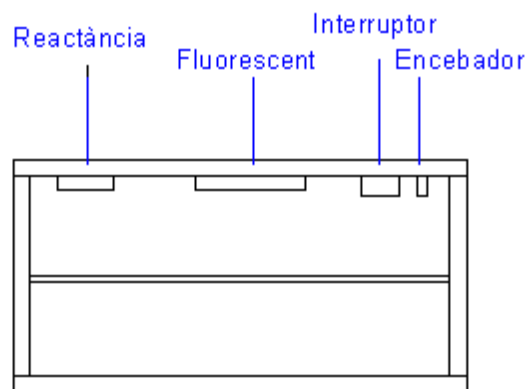
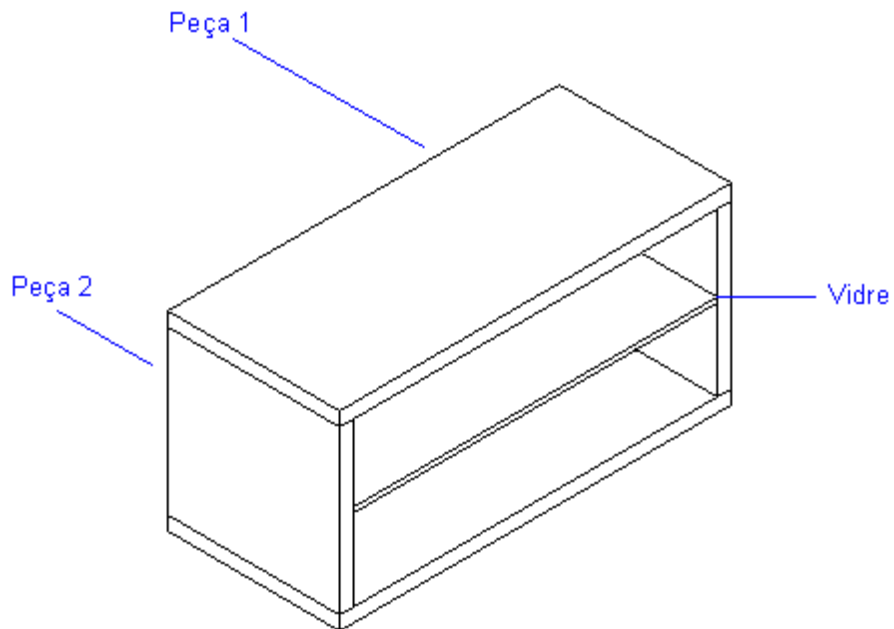
PLÀNOLS



Part superior			
Part lateral			
Part inferior			
	Peça 1	Peça 2	Vidre
Autor: Albert Minobes Molina		Curs 2009-2010	Compte amb el sol!
Escala 1:10	VISTES DE LES PECES DE LA CAIXA DE RAIGS UV		



Representació, mitjançant el programa informàtic AutoCAD 2009, de la caixa de radiació ultraviolada.



Autor: Albert Minobes Molina

Curs 2009-2010

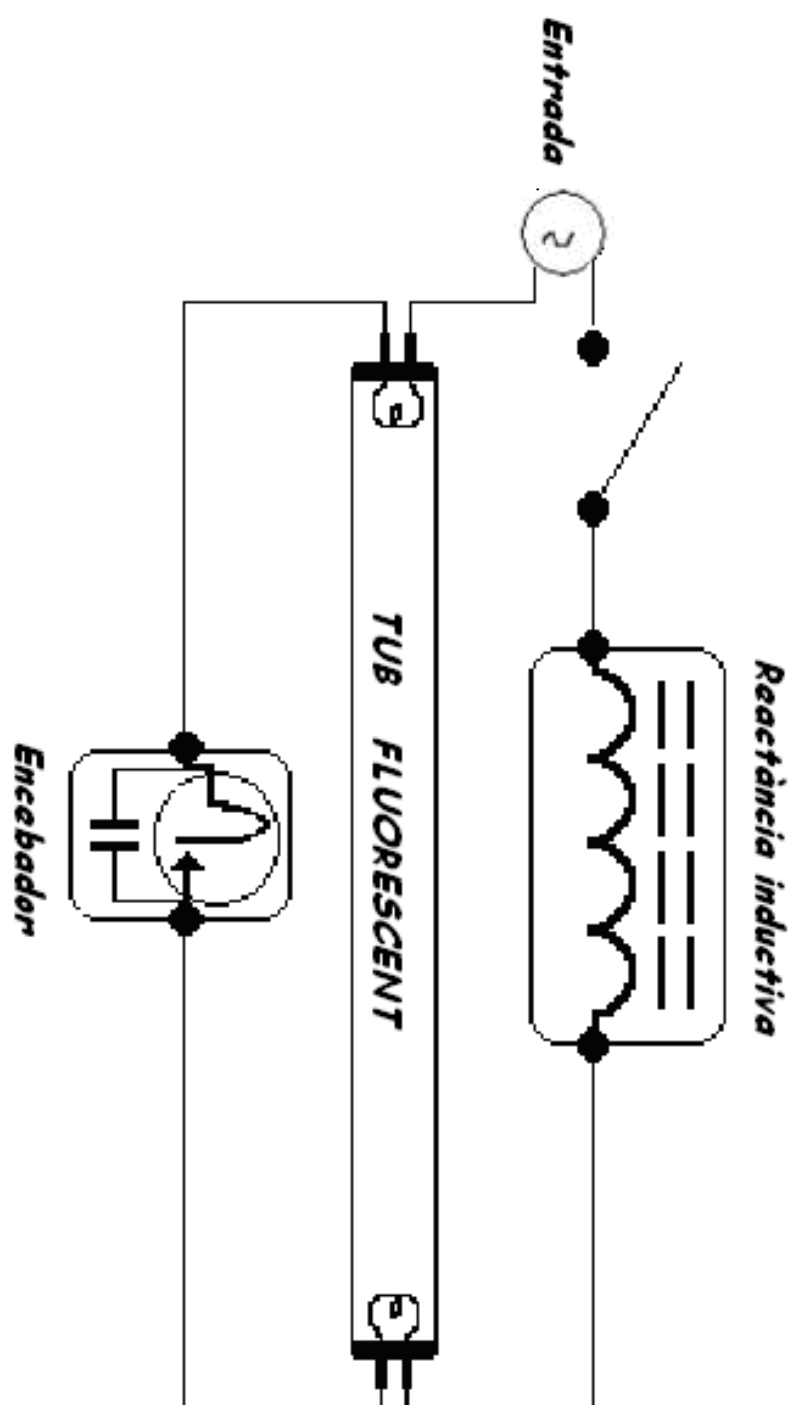
Compte amb el sol!

Escala 1:5

CAIXA DE RADIACIÓ ULTRAVIOLADA



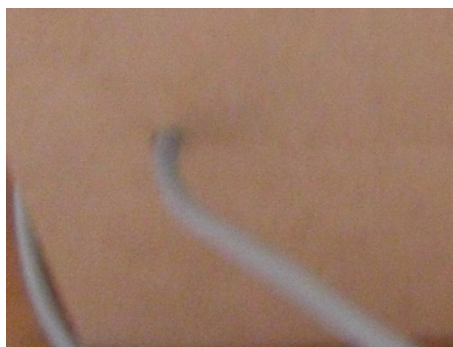
Esquema del circuit elèctric utilitzat al muntatge:





➤ PROCEDIMENT:

- 1- En una fusta de 410 x 180 mm, hi marquem amb llapis on col·locarem els elements del circuit elèctric. La marca del fluorescent anirà just al mig de la fusta, mentre que els altres dispositius els marcarem d'una forma similar a la del croquis del circuit elèctric.
- 2- Connectem tots els dispositius del circuit amb el fil elèctric, sempre tenint en compte la polaritat dels cables.
- 3- Amb una barra, fem els forats necessaris i muntem els dispositius en les marques fetes al pas 1. Aquests es subjectaran a la fusta mitjançant claus i clavilles. A més, amb un trepant farem un forat per on passarà el cable elèctric de l'endoll.



Imatge 78: Forat fet amb trepant per on passa el cable elèctric

Albert Minobes

- 4- Marquem, amb llapis, a les fustes de 410 x 180 mm, una línia paral·lela als costats menors, a 20 mm de cada extrem. traçarem una altra paral·lela a 30 mm de cada extrem dels costats més llargs. Allà on es creuin, hi aniran els claus que subjectaran els visos, amb la qual cosa hi farem forats amb la barra.



- 5- Repetirem el pas amb les fustes de 180 x 170 mm. En aquest cas, les línies paral·leles als costats curts seran a 10 mm i les dels costats llargs a 30 mm. Tornarem a fer forats amb la barrina on aquestes línies es creuin.
- 6- Posem les quatre fustes en perpendicular, mitjançant els visos, claus i les marques fetes anteriorment. Ha de quedar amb forma de caixa.



Imatge 79: Forma de col·locar les fustes correctament

Albert Minobes

- 7- Una vegada tenim el muntatge fet, marcarem al centre de les bases menors una línia paral·lela als costats de 410 mm i amb l'ajut de la barrina, hi ficarem els suports del vidre.



Imatge 80: Muntatge de la caixa sense vidre ni cartolines

Albert Minobes



- 8- Per donar un millor acabat a la caixa de radiació UV, hi passarem dues capes de vernís amb un pinzell.
- 9- Finalment, col·loquem el vidre als seus suports i enganxem les cartolines al costat on es troba el fluorescent, mitjançant xinxetes.



Imatge 81: Muntatge final de la caixa de radiació ultraviolada

Albert Minobes



6.2 COMPOSICIÓ MEDIS DE CULTIU

- **MEDI DE CULTIU YPD:**

GLUCOSA	2.5 g	5 g	10 g
PEPTONA	2.5 g	5 g	10 g
EXTRACTE LLEVAT	1.25 g	2.5 g	5 g
AGAR	2.5 g	5 g	10 g
TOTAL	125 ml	250 ml	500 ml

- **MEDI DE CULTIU SABOURAUD DEXTROSE AGAR**

DIGERIT ENZIMÀTIC DE CASEÏNA	10 g
DEXTROSA	40 g
AGAR	15 g
AIGUA DESTIL·LADA	1000 mL

