

# **EFFECTE DE DIFERENTS AGENTS MUTÀGENS SOBRE EL MATERIAL GENÈTIC CEL·LULAR**

---



**Pseudònim:** guitarrapiano

**Curs:** 2018 – 2019

# **ÍNDEX**

<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	Pàg. 1
<b>II. INTRODUCCIÓ TEÒRICA</b>	
II.1. Els àcids nucleics .....	Pàg. 3
II.2. El cicle cel·lular .....	Pàg. 5
II.3. Les mutacions .....	Pàg. 9
II.4. Mecanismes de reparació de danys l'ADN .....	Pàg. 13
II.5. Cèl·lules sanguínies .....	Pàg. 18
II.6. Els mutàgens .....	Pàg. 19
II.7. La radiació .....	Pàg. 21
II.8. Acció de la radiació ionitzant .....	Pàg. 25
II.19. Busulfan .....	Pàg. 28
<b>III. PART PRÀCTICA</b>	
III.1. Plantejament .....	Pàg. 30
III.2. Materials .....	Pàg. 31
III.3. Procediment .....	Pàg. 34
III.4. Resultats i anàlisis .....	Pàg. 43
<b>IV. CONCLUSIONS</b> .....	Pàg. 51
<b>V. VALORACIÓ CRÍTICA</b> .....	Pàg. 52
<b>VII. REFERÈNCIES I FONTS D'INFORMACIÓ CONSULTADES</b> .....	Pàg. 53
<b>VIII. ANNEX</b> .....	Pàg. 57

## I. INTRODUCCIÓ

El creixement i desenvolupament exponencial de la societat ha comportat la modificació de l'entorn que ens envolta i com a conseqüència el nostre cos es troba exposat a molts agents físics i químics que alteren el metabolisme i el material genètic d'alguna manera o altra.

Hem volgut escollir i tractar com a tema del treball de recerca els agents mutàgens i com aquests afecten al material genètic dels organismes, perquè durant el primer curs de Batxillerat, a l'assignatura de biologia, havíem profunditzat en la matèria i ens semblava un tema molt atractiu ja que, moltes de les malalties que produeixen més morts, dins la població, són causades per mutacions originades a les cèl·lules i concretament en el seu ADN. Una d'aquestes és el càncer, una de les malalties més comunes i esteses avui dia a la nostra societat.

En aquest treball ens hem proposat estudiar com les mutacions, és a dir, alteracions a l'atzar del material genètic (ADN), afecten visiblement al genoma dels organismes. Aquestes poden ser causades per errors genètics produïts durant la replicació de l'ADN o per agents externs que trobem al medi ambient.

Per fer-ho, ens centrarem en dos agents mutàgens. Aquests són les radiacions ionitzants, utilitzades en radioteràpia per destruir les cèl·lules canceroses, i el Busulfan o Busilvex, un medicament utilitzat principalment contra l'acció de la leucèmia sobre les cèl·lules sanguínies i que també s'empra en trasplantaments de medul·la òssia, tot i que afecta al material genètic causant mutacions i aberracions cromosòmiques.

Les nostres hipòtesis inicials són:

1. El material genètic de les cèl·lules experimenta diferents mutacions cromosòmiques depenent del tipus de mutagen a que són exposades.
2. Aquestes mutacions són de diferent intensitat i freqüència en funció de la dosi de mutagen a la qual s'ha exposat.

Per comprovar el efectes de dos agents mutàgens sobre els limfòcits, hem plantejat un experiment que ens permetrà observar l'acció que causen aquests sobre els cromosomes utilitzant una anàlisi comparativa i estadística entre les

cèl·lules afectades pels dos tipus de mutàgens i entre cèl·lules afectades pel mateix mutagen segons el grau d'exposició que han patit.

A partir de les hipòtesis plantejades i el resultats obtinguts elaborarem unes conclusions que ens permetin establir les relacions trobades entre les mutacions i els agents mutàgens.

## **II.1. Els àcids nucleics**

Els àcids nucleics són grans biomolècules orgàniques que contenen unitats bàsiques anomenades nucleòtids. Són les molècules encarregades d'emmagatzemar, transmetre i expressar la informació genètica, és a dir, la informació necessària per a la síntesis de proteïnes. Es troben en totes les cèl·lules de tots els éssers vius, des dels bacteris fins als éssers humans, i amb la mateixa composició química.

Existeixen dos tipus d'àcids nucleics, l'ADN i l'ARN. En el nostre treball experimentarem amb l'ADN.

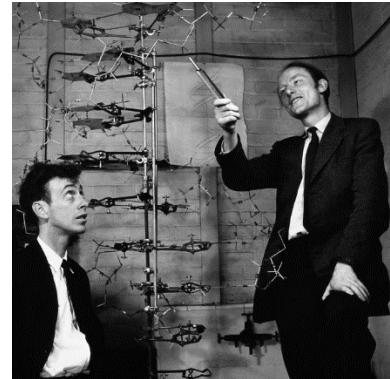
### **II.1.1. L'ADN o material genètic**

L'ADN o àcid desoxiribonucleic és una molècula complexa que conté la informació que un organisme necessita per desenvolupar-se, viure i reproduir-se. Aquesta informació es troba dins de les cèl·lules, més concretament en el seu nucli, i és transmesa de cèl·lules mare a cèl·lules filles.

Els segments de l'ADN que contenen la informació genètica s'anomenen gens i les demés seqüències d'aquest tenen un fi estructural.

Els gens són les unitats d'herència i controlen les característiques dels individus. Aquests tenen la informació necessària per codificar proteïnes que seran utilitzades per dur a terme les funcions cel·lulars o de l'organisme.

L'ADN adopta diferents configuracions espacials on trobem diferents nivells estructurals de composició creixent. Aquests són la estructura primària (seqüència lineal de nucleòtids), la secundària (doble hèlix formada per dues cadenes de nucleòtids enrotllades al voltant d'un eix imaginari i unides entre elles) i la terciària.



Watson i Crick descobrint la molècula d'ADN

L'estructura terciària són els diferents nivells d'empaquetament que adopta l'ADN per poder cabre dintre de la cèl·lula. A les cèl·lules eucariòtiques l'ADN es troba dins del nucli. Per això, ha de patir una sèrie de plegaments sobre si mateix. Aquesta estructura plegada es realitza mitjançant la unió amb unes molècules proteiques anomenades histones. Aquesta estructura comença a ser present quan la cèl·lula té intenció de començar a dividir-se.

En eucariotes l'empaquetament ha de ser més compacte i, per això, necessita la presència de proteïnes com les histones. La unió de l'ADN i proteïnes es coneix com a cromatina.

En un cromosoma, cada una de les còpies del material genètic rep el nom de cromàtide, i està unida a l'altra cromàtide mitjançant el centròmer. Cada una de les parts de la cromàtide que queden a banda i banda del centròmer s'anomenen braços.



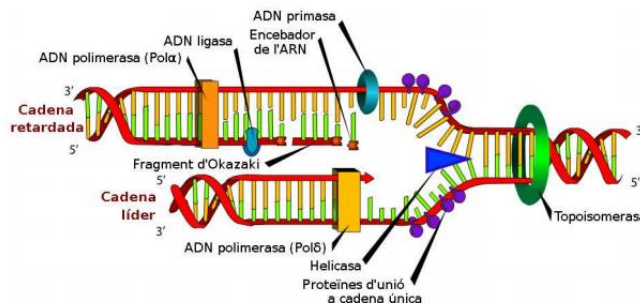
Cariotip humà observat durant l'anafase

Els cromosomes els trobem ordenats en el cariotip. Aquest és el patró cromosòmic d'una espècie expressat a través d'un codi, establert per conveni, que descriu les característiques dels seus cromosomes.

El cariotip de l'ésser humà conté 23 parells de cromosomes, és a dir, en total en tenim 46 cromosomes. Aquest només són visibles durant el procés de divisió cel·lular, concretament durant la metafase i l'anafase.

### **II.1.2. La replicació**

La replicació de l'ADN és el procés a través del qual una molècula d'ADN de doble hèlix és duplica i s'obté una altra molècula d'ADN amb la mateixa seqüència de bases que l'original.



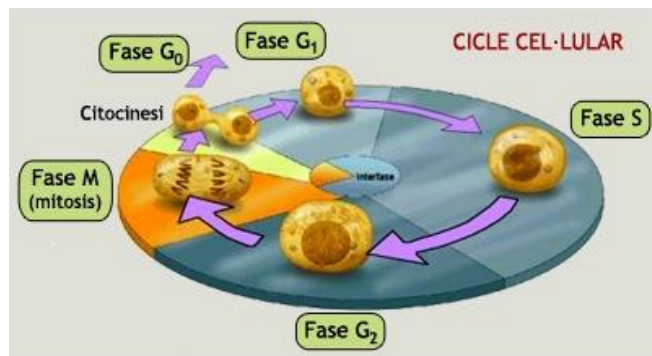
Replicació de la molècula d'ADN

La iniciació de la replicació de l'ADN la realitza una seqüència específica anomenada seqüència d'iniciació. Aquesta està formada per enzims i proteïnes especials que actuen d'iniciadors, ja que trenquen les unions entre les bases complementàries de la doble hèlix d'ADN (guanina amb citosina i timina amb adenina). A mesura que les cadenes se separen, altres proteïnes s'uneixen a les cadenes per tal que aquestes es mantinguin allunyades durant el procés de replicació. Mentre les hèlix simples d'ADN estan separades, es produeix la síntesi de noves cadenes, catalitzades per uns enzims anomenats ADN polimerases. Un cop acabat aquest procés, es disposa de dues cadenes dobles d'ADN idèntiques a les inicials.

Tot i així, durant el procés de replicació poden produir-se errors en la còpia de forma espontània o induïts per agents mutàgens.

## II.2. El cicle cel·lular de les cèl·lules eucariotes

La reproducció és el mecanisme mitjançant el qual es perpetuen les espècies i la vida. La reproducció cel·lular en les cèl·lules somàtiques consisteix en la formació de dues o més cèl·lules filles que han de tenir la mateixa informació genètica que



Cicle cel·lular de la cèl·lula

la cèl·lula mare. Per això cal que es dupliqui l'ADN i posteriorment el nucli es divideixi en dos mitjançant un procés anomenat mitosi o cariocinesis que, generalment va seguit d'una divisió del citoplasma o citocinesi. El cicle cel·lular consta de dos períodes o fases principals:

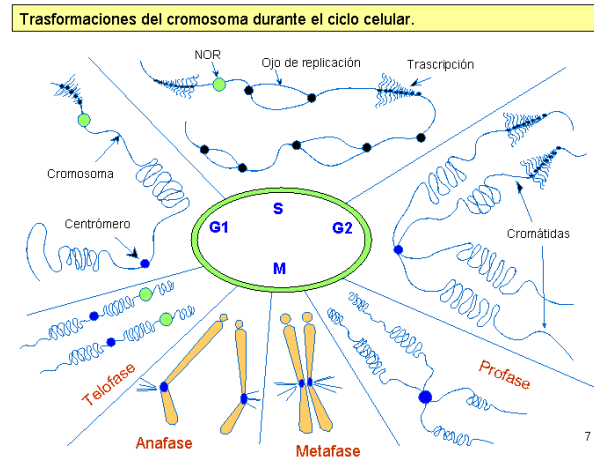
- **Interfase:** L'organització de la cèl·lula és centra en la autoconservació.
- **Mitosi:** L'organització de la cèl·lula està encaminada al repartiment equitatiu del material hereditari (reproducció).

## II.2.1. Les fases del cicle cel·lular

### II.2.1.1. La interfase

És el període comprès entre dues mitosis. És la fase més llarga del cicle cel·lular i comprèn tres períodes:

1. **Període G1:** És el període postmitòtic. És un període de creixement general on es produeix la duplicació d'òrgànuls. Al final de G1 hi ha un moment de no retorn (punt de restricció o punt R) a partir del qual és impossible aturar que se succeeixin les següents fases. Les cèl·lules que no es divideixen romanen en una fase especial anomenada G0.

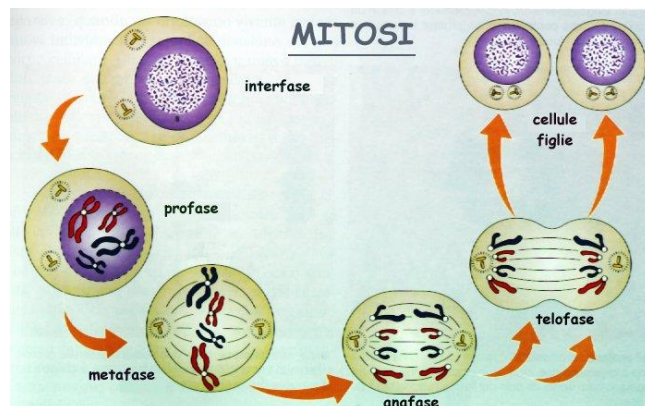


Fases del cicle cel·lular

2. **Període S:** És el període de síntesi en que es produeix la duplicació de l'ADN, de manera que el nucli té el doble de cromàtides, unides cada parell pel centròmer.
3. **Període G2:** És el període premitòtic. S'inicia quan acaba la síntesi d'ADN. Comencen a distingir-se els cromosomes. És la fase més curta.

### II.2.1.2 La fase M: Mitosi

La mitosi és el procés de divisió cel·lular a través del qual s'obtenen cèl·lules amb el mateix nombre de cromosomes que la cèl·lula mare. Aquests es divideixen en:



Fases de la mitosi



1. **Profase:** Durant aquest període es comença a trencar la membrana i els cromosomes es comencen a formar.
2. **Metafase:** Els cromosomes se situen a la zona equatorial de la cèl·lula (zona central). És en aquest moment quan els cromosomes són observables amb tècniques de microscopia òptica.
3. **Anafase:** Els microtúbuls s'escurcen desplaçant les cromàtides germanes en dues masses separades i situant-les en pols oposats.
4. **Telofase:** Reapareix la membrana nuclear a cada pol de la cèl·lula a partir del reticle endoplasmàtic i de les restes de l'anterior membrana nuclear i els cromosomes es comencen a desespiralitzar.

### II.2.1.3 La citocinesi

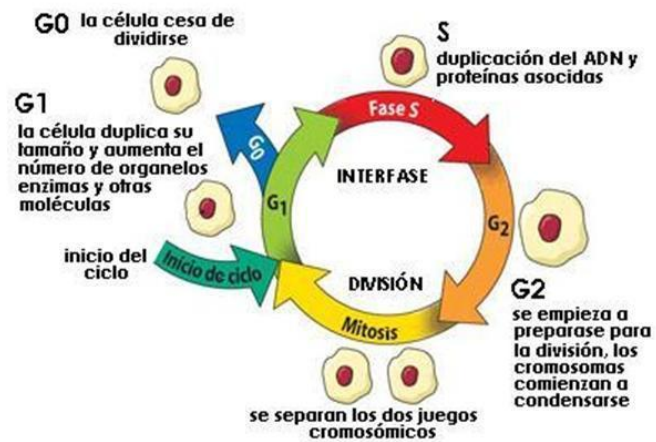
És el procés que duu a terme la cèl·lula per poder separa les dues cèl·lules filles formades en la mitosi, de manera que es va estrangulant la cèl·lula fins que finalment aquesta es divideix.

### II.2.2 Els punts de control

Els punts de revisió són etapes del cicle cel·lular eucariota que permeten examinar l'estat en el qual es troba la cèl·lula i permeten decidir si es pot seguir amb la divisió cel·lular.

Aquests actuen en llocs crucials del cicle cel·lular, és a dir, entre el final d'una etapa i l'inici de la

següent. Un dels punts de control es troba en G1, just abans d'entrar en fase S i l'altre a G2 abans d'iniciar la mitosi. En aquests punts de control s'examina l'estat nutricional, la massa cel·lular, els processos de creixement i l'estat de l'ADN, entre altres elements necessaris per a un cicle cel·lular normal.



Puntos de control del cicle cel·lular

### **II.2.2.1 El punt de control G1: Punt d'inici**

El punt de control que es troba entre les fases G1 i S és el punt de revisió principal en el cicle cel·lular. Si la cèl·lula supera aquest també superarà el punt de control d'entrada a la mitosi.

Per a que la cèl·lula superi aquest punt es necessiten tres condicions:

- La mida de la cèl·lula ha de ser l'adequada.
- La disponibilitat d'aliment ha de ser adient.
- Han d'existir demandes reproductives.

Si en algun moment una d'aquests requeriments falla, el sistema de control s'atura per proporcionar temps a la cèl·lula a realitzar el seu creixement adequadament.

En els éssers humans el dany en el material genètic (mutacions) es detecta a través de sensors que indueixen la seva reparació i paral·lelament detenen el cicle cel·lular.

### **II.2.2.2 El punt de control G2: Segon punt de control**

En el punt de revisió que es troba al final de la fase G2 es verifica que tot l'ADN es trobi duplicat i, com en el primer punt de control, també es comprova que en el material genètic no s'hagi produït cap mutació. En aquests cas s'iniciaran el mecanismes per aturar el cicle. Si tot és correcte i no es troba cap error es donarà pas a l'inici del període de divisió cel·lular (mitosi).

### **II.2.2.3 El punt de control M: Tercer punt de control**

L'últim punt de control es troba durant la fase M (fase de divisió), entre la metafase i l'anafase. Durant aquests període la cèl·lula s'encarrega de revisar que tots els cromosomes s'hagin unit al fus mitòtic.

En el cas de que un dels cinetocors no es trobi unit al fus mitòtic, la cèl·lula envia una senyal bloquejant l'activació de proteïnes implicades en la separació de cromàtides germanes, impedit que aquestes se separin fins que la senyal desaparegui.

### **II.2.3 La catàstrofe mitòtica**

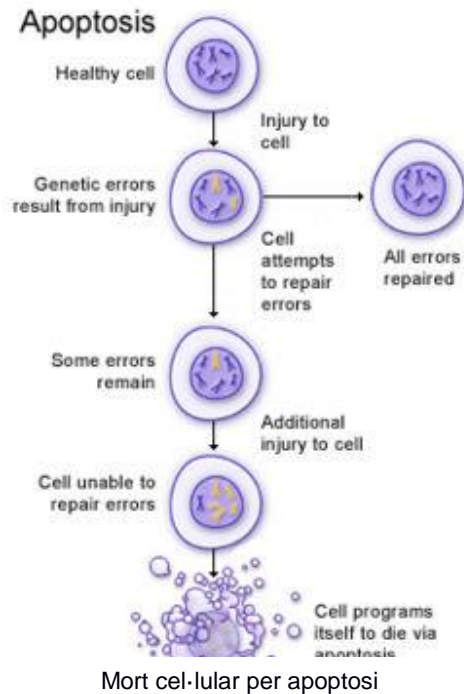
Com hem vist es poden produir errors durant el cicle cel·lular a causa del mal funcionament dels punts de control.

Aquestes errades poden conduir a la cèl·lula a una catàstrofe mitòtica.

Normalment en aquestes cèl·lules es produeix la mort cel·lular per apoptosi. En aquest procés la cèl·lula mor sense afectar a les cèl·lules que es troben al seu voltant.

Aquesta es condensa i redueix la seva mida, col·lapsant així el citoesquelet i produint la destrucció de la membrana nuclear i la fragmentació de l'ADN.

Finalment la superfície de la cèl·lula canvia de manera que es reconeguda per les cèl·lules veïnes i és fagocitada. També pot ser que la cèl·lula entri en un estat de senescència, de manera que la cèl·lula no mor però perd la capacitat de dividir-se, i així s'evita que es formin noves cèl·lules amb mutacions.



### **II.3. Les mutacions**

Les mutacions són alteracions a l'atzar del material genètic i normalment consisteixen en una variació de la seqüència dels nucleòtids. En general són recessives i no s'expressen però altres són negatives per a l'individu ja que li confereixen característiques diferents als individus de la seva espècie, o fins i tot letals per aquest.

Són dels fenòmens biològics més importants perquè és un dels factors que augmenta la variabilitat genètica de les diverses poblacions d'organismes.

Per limitar al màxim les mutacions tots els éssers vius posseeixen una sèrie de mecanismes cel·lulars que permeten reparar les anomalies genètiques que es produeixen a l'ADN.

Es distingeixen tres tipus de mutacions genètiques: Les mutacions gèniques, les mutacions cromosòmiques i les mutacions genòmiques.

### II.3.1. Els tipus de mutacions

**Mutacions gèniques:** són alteracions en la seqüència de nucleòtids d'un gen, pel que també s'anomenen puntuals. Es poden classificar en:

- **La substitució d'un nucleòtid** per un altre diferent, canviant així la base nitrogenada original.  
Com que només implica el canvi d'un nucleòtid tan sols altera un triplet de tota la seqüència, pel que no sol tenir efectes molt greus.
- **Inserció o pèrdua d'un nucleòtid** en la seqüència d'un gen. Aquestes mutacions s'anomenen addicions i delecions respectivament. Aquestes comporten un corriment de la lectura dels triplets de l'ADN a l'hora de transcriure'l pel que canvien el significat biològic de la seqüència de nucleòtids. Per aquest motiu solen tenir conseqüències greus per a l'organisme.
- **La inversió** d'una breu seqüència de nucleòtids del gen que es produeix per una ruptura d'un fragment de la doble hèlix i la seva immediata reinserció en direcció oposada dins la doble hèlix.

Les principals causes són:

- **Errors de lectura** que es produeixen durant la replicació l'ADN.
- **Lesions fortuïtes** que alteren l'estructura d'un o uns quants nucleòtids.

Les més freqüents són:

- a. La despurinització que implica la pèrdua de purines (adenina i guanina) degut al trencament de l'enllaç entre aquesta i la desoxiribosa.
- b. La desaminació que consisteix en la pèrdua de grups amino a les bases nitrogenades, que aleshores s'aparellen amb una diferent de la normal.
- c. Els dímers de timina que són enllaços entre dues timines contigües.

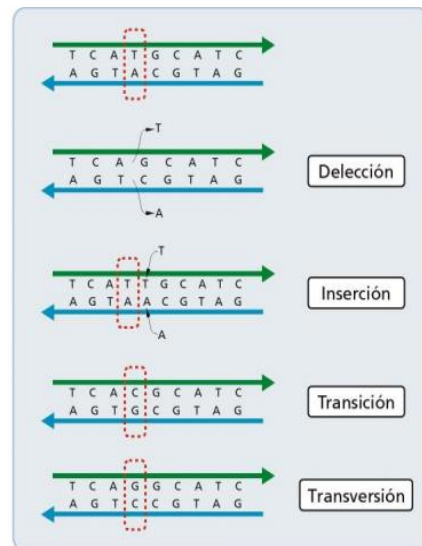
- **Tansposicions.** Són canvis espontanis de determinats segments d'ADN. Si la seqüència transposable se situa dins un gen produeix mutacions gèniques, en canvi si l'element transposable se situa dins un lloc on no hi ha cap gen produeix mutacions cromosòmiques.

- **Mutacions cromosòmiques:** Són canvis en la estructura interna dels cromosomes respecte el cariotip normal de l'espècie. Normalment es poden observar fàcilment durant la metafase quan la cèl·lula s'està dividint. La base molecular de l'alteració cromosòmica és el trencament de doble cadena (DSB, de l'anglès *Double Strand Break*) i aquests poden originar:

- **Deleció:** és la pèrdua d'un fragment de cromosoma. Si aquest conté una gran quantitat de gens la deleció pot tenir conseqüències patològiques o fins i tot letals. Si una deleció afecta als dos cromosomes homòlegs sol ser letal.

- **Duplicació:** és la repetició d'un segment d'un cromosoma. La rèplica pot trobar-se en el mateix cromosoma, es pot haver unit a un cromosoma no homòleg o es pot haver independitzat. La duplicació augmenta la quantitat de material genètic i gràcies a mutacions posteriors es poden generar nous gens durant el procés evolutiu.

- **Inversió:** és el canvi de sentit d'un fragment en el cromosoma. Les inversions no solen ser perjudicials per a l'individu però si per als descendents ja que, durant la meiosis, es produeix un encreuament de material genètic en el segment de la inversió.



Tipus de mutacions cromosòmiques

- **Translocació:** és el canvi de posició d'un segment de cromosoma. Es pot produir entre cromosomes no homòlegs o en el mateix cromosoma amb o sense reciprocitat.

Les mutacions cromosòmiques, després de l'actuació dels mecanismes de reparació de les mutacions, poden donar lloc a canvis en l'estructura i forma del cromosoma. Aquests tipus de mutacions s'anomenen aberracions cromosòmiques. Així, es poden originar:

- **Cromosomes dicèntrics, tricèntrics o tetracèntrics.**

Es produeixen quan el cromosoma té dos, tres o quatre centròmers respectivament.



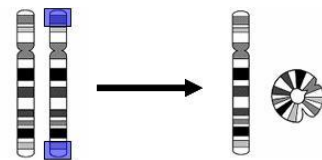
Cromosoma tricèntric

- **Cromosomes acèntrics.**

Es produeixen quan el cromosoma no té centròmer.

- **Cromosomes en forma d'anell.**

Quan s'ha produït una deleció en els extrems dels braços d'un cromosoma, aquests queden "enganxifosos" i tenen tendència a unir-se.

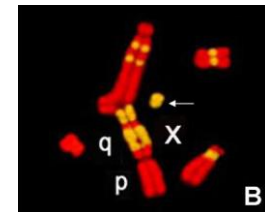


Cromosoma en forma d'anell

- **Estructures trirradials o tetrarradials.**

Aquesta és una alteració de tipus cromatídica, ja que altera l'estructura d'una única cromàtide.

S'observen quan s'ha produït una translocació entre dos cromosomes de part d'un braç cromosòmic, de manera que s'intercanvien aquest fragment. Durant l'ordenament dels cromosomes en la divisió cel·lular,



Estructura trirradial

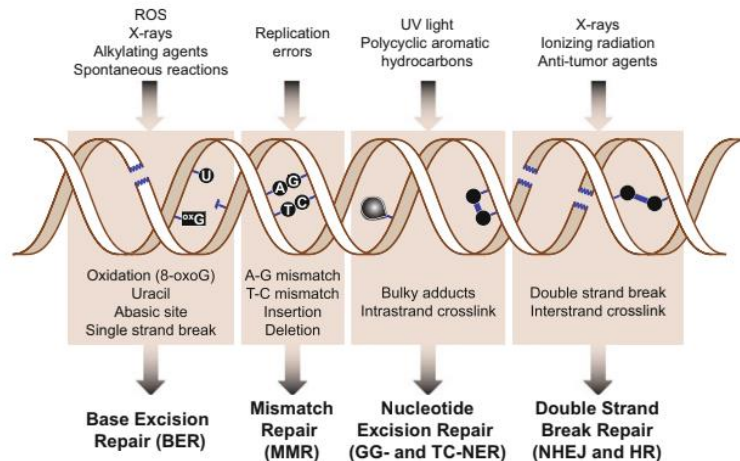
les cromàtides germanes tenen tendència a ajuntar-se. En aquest cas les cromàtides germanes estan en cromosomes diferents i, per tant, es deformen les estructures dels dos cromosomes per a que les dues cromàtides puguin estar juntes.

- **Gap.** S'anomena gap una ruptura d'un braç de cromosoma, de manera que el fragment trencat queda encara proper al braç del qual s'ha separat.

- **Mutacions genòmiques:** Les mutacions genòmiques són alteracions en el nombre de cromosomes presents en les cèl·lules d'una espècie respecte el nombre normal de cromosomes que sol tenir. Aquestes anomalies deriven principalment d'errors que es produeixen durant la meiosi.
  - **Aneuploïdia:** és l'alteració en el nombre normal d'exemplars d'un o més tipus de cromosomes sense arribar a afectar al genoma. Poden ser nul·lisomies (no hi ha cap exemplar d'un cromosoma concret), monosomies (només hi ha un exemplar), trisomies (hi ha tres exemplars), tetrasomies (hi ha quatre exemplars), etc.
  - **Euploïdia:** és alteració en el nombre normal de dotacions haploides d'un individu. Pot ser:
    - A. Monoploïdia o haploïdia:** Es produeix quan només hi ha una única dotació cromosòmica.
    - B. Poliploïdia:** Es produeix quan hi ha més de dues dotacions cromosòmiques completes.

## II.4. Els mecanismes de reparació de danys a l'ADN

Degut a la importància que té la molècula de l'ADN per a la supervivència de la cèl·lula, aquesta ha desenvolupat una sèrie de mecanismes de reparació per corregir i reparar els danys causats al material genètic i així evitar al màxim les



Mecanismes de reparació de l'ADN

mutacions. En funció de la gravetat del dany i de la fase del cicle cel·lular on es troba la cèl·lula s'activen diferents mecanismes de reparació.

## II.4.1 Els tipus de mecanismes de reparació

- **Reparació fotoactiva:**

Aquest tipus de reparació es produeix per la escissió fotoquímica (divisió) dels dímers de timina (enllaços covalents que es formen entre dues bases nitrogenades iguals). No implica l'eliminació de cap fragment de la molècula d'ADN i es produeix gràcies a l'enzim Photolyasa, que executa la seva funció amb l'energia proporcionada per la llum visible.

Aquest mecanisme es troba en bacteris i algunes cèl·lules eucariotes, però no es produeix en humans.

- **Reparació per escissió:**

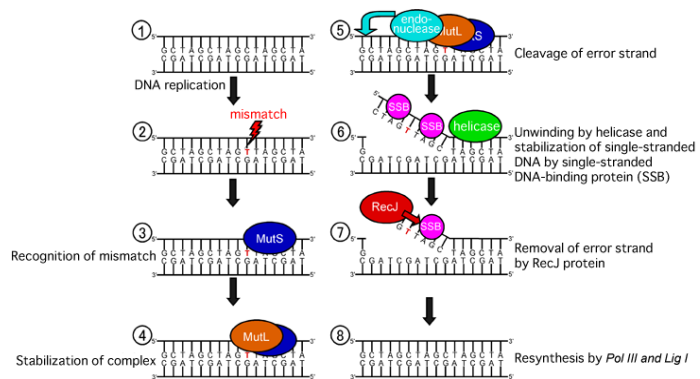
Aquest mecanisme pot actuar de dues maneres:

- **Reparació per escissió de bases:** Corregeix les bases malmeses individualment, i serveix per reparar la desaminació (ruptura d'un grup amino) i la despurinització (ruptura de l'enllaç glicosídic entre la base nitrogenada i el glúcid). La base malmesa és detectada per una molècula d'ADN glycolasa i s'extreu. Després l'enzim AP endonucleasa

treu de la doble hèlix la desoxiribosa amb el grup fosfat que anteriorment havia quedat sense base.

Finalment una

molècula d'ADN polimerasa sintetitza el nucleòtid correcte a partir de la cadena complementària.



Reparació per escissió de bases



- **Reparació per escissió de nucleòtids:** Serveix per extreure dímers de pirimidines (timina i citosina) i altres tipus de lesions estructurals. En aquest mecanisme actuen unes proteïnes que reconeixen les anomalies. Aleshores l'enzim NER endonucleasa fa dos talls al filament de la doble hèlix on es troba l'error i s'elimina aquest segment. Després l'ADN polimerasa sintetitza el fragment correcte a partir de la cadena complementària i l'enzim ligasa uneix tots els fragments. Aquest sistema és el més versàtil dels mecanismes de reparació i és molt útil sobretot en els errors que es van produint durant la replicació.
- **Reparació de mal aparellament:** Aquest mecanisme actua després de la replicació, corregint l'aparellament incorrecte entre les bases. Aquests aparellaments són reconeguts degut a que presenten enllaços anòmals. El nucleòtid correcte és el que es troba en la fibra d'ADN que ha servit com a motlle per a la síntesi de l'altra, i quan es reconeix quina és la fibra recent sintetitzada (la que conté l'error), s'extreu el nucleòtid erroni i se sintetitza el correcte.

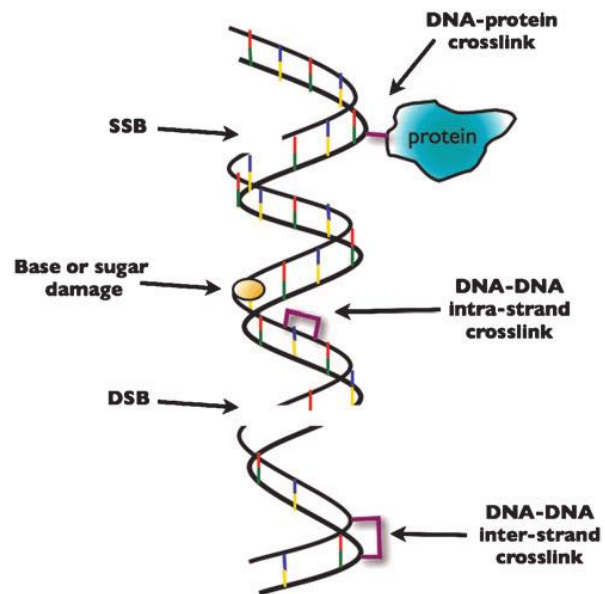
Els mecanismes descrits fins ara reverteixen directament el dany o utilitzen la fibra correcta de l'ADN per evitar les mutacions. Tot i així, algunes vegades el dany causat a una de les fibres de la doble cadena és tan greu que no es pot reparar la anomalia. Aleshores la cèl·lula aplica altres mecanismes de reparació com a última alternativa que a la vegada també causa danys a la fibra que vol reparar. Així, s'intenta evitar conseqüències greus com és la mort cel·lular. Danys molt perjudicials a l'ADN poden ser per exemple les ruptures de les dues fibres que formen la doble hèlix, anomenades també DSB (*Double Strand Break*).

- **Reparació de DSB**

- **Reparació de ruptures de les dues fibres de la molècula d'ADN:**

Aquestes ruptures afecten a les dues fibres, de manera que, com als altres mecanismes, no es pot utilitzar la fibra complementària com a motlle per a la síntesi d'un nou fragment. Aquest mecanisme de reparació es troba amb la dificultat d'identificar els extrems trencats de la molècula i tornar-los a unir amb l'objectiu de perdre el mínim de nucleòtids possible. Aquest pot actuar de dues maneres:

- **Unió d'extrems no homòlegs:** Un complex proteic se situa als extrems de la molècula que s'han separat i els torna a unir, gràcies a la posterior acció de l'enzim ligasa. Aquest procés és propens a formar altres errors perquè no contempla la possible pèrdua de nucleòtids i no té cap manera de comprovar que els dos fragments que ha lligat abans estiguessin units. Degut a aquesta propensió a l'error la cèl·lula només executa aquest sistema quan els altres mecanismes no poden actuar.



Reparació per l'actuació de les DSB

- **Mecanismes que actuen gràcies a la presència de seqüències homòlogues:**

Aquest mètode és més precís que l'anterior degut a la presència de seqüències homòlogues a les zones malmeses, pertanyents a la cromàtide germana de la cromàtide malmesa. Només es pot produir durant la divisió cel·lular ja que és quan es formen aquestes cromàtides.

Aquests mecanismes impliquen l'intercanvi temporal o permanent d'informació entre regions dels cromosomes. Hi ha dos mecanismes que actuen d'aquesta manera:

1. **SDSA (de l'anglès *synthesis-dependent strand annealing*).** Aquest mecanisme només s'activa si la síntesis de l'ADN ha acabat i cada cromosoma està condensat i format per dues cromàtides germanes. Quan en una cromàtide es produeix un error, a l'altra hi ha una còpia intacta de la informació que serveix com a motlle per a la reparació de la primera.

Primer, es retalla la cadena malmesa de la cromàtide. Després, es produeix una *invasió de cadena* a la cromàtide germana: una de les fibres de la cadena trencada busca a la cromàtide no malmesa la còpia del segment trencat, que s'obre formant un bucle. La fibra de la cadena malmesa i el bucle de la cadena homòloga s'ajunten, cosa que permet la replicació de part del segment mancat, que finalment es lliga a la zona d'on anteriorment ha sigut retallada la seqüència i s'omplen els buits que falten.

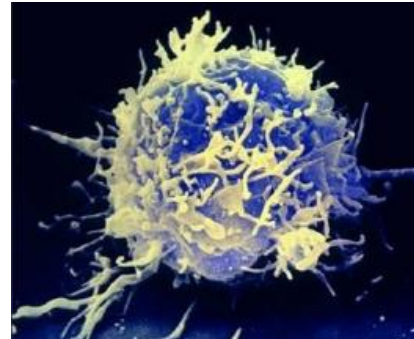
2. **Recombinació homòloga.** Aquest mecanisme implica un creuament de seqüències a les cromàtides germanes. La diferència que hi ha amb el mecanisme SDSA és que a la recombinació homòloga les dues fibres de la cadena malmesa intervenen en la reparació. Primer, es retalla la cadena danyada de la cromàtide. Després, es produeix la *invasió de cadena* a la cromàtide germana: les dues fibres de la cadena malmesa i la cadena homòloga oberta s'ajunten i es replica a les dues fibres part del segment mancat, i posteriorment s'ompliran els buits que faltin (de manera que les fibres de les cromàtides diferents segueixen creuades). Per formar una altra vegada dues cadenes diferenciades pot ser que hi hagi un encreuament permanent de les cadenes d'ADN entre les dues cromàtides, o pot ser que no es produeixi aquest encreuament.

Tant la recombinació homòloga com el mecanisme SDSA no tenen tanta propensió a l'error com la unió d'extrems no homòlegs, degut a la presència d'una seqüència idèntica per utilitzar com a motlle.

## II.5. Les cèl·lules sanguínies

La sang és un teixit líquid que circula per les venes, artèries i capil·lars dels éssers vius vertebrats. Aquesta està formada pel plasma sanguini (matriu extracel·lular) i pels elements formes on trobem les cèl·lules sanguínies generades a la medul·la òssia. Dins d'aquest grup tenim els limfòcits els quals s'encarreguen de la funció de defensa de l'organisme.

Els limfòcits són els leucòcits sobre els quals hem treballat en el nostre experiment. Tot i que també es troben a la sang, són molt més freqüents en el sistema limfàtic.



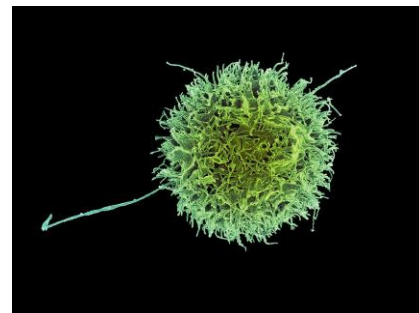
Limfòcit

Els limfòcits es poden classificar en:

- **Limfòcits B.** Són els que proporcionen la immunitat en el cos mitjançant el desenvolupament d'anticossos quan s'exposen als antígens.
- **Limfòcits T.** Són els que tenen un paper important en el manteniment del sistema immunitari, i són fonamentals en l'acció contra substàncies invasores perjudicials.

Els limfòcits T i B són les cèl·lules principals en el sistema immunitari adaptatiu o específic. Les cèl·lules immunitàries conserven la memòria de l'antigen (el cos estrany), cosa que permet que davant un segon contacte, la resposta immunitària sigui més ràpida i efectiva. Aquests reconeixen un sol tipus d'antigen, gràcies a la propietat d'especificat.

- **Limfòcits NK (*Natural Killers*).** Són els que actuen de manera immediata davant la presència d'antígens. Les cèl·lules assassines detecten canvis en les membranes de les cèl·lules infectades i provoquen l'alliberament de substàncies citotòxiques i, per tant, la mort cel·lular.



Limfòcit NK

També estan implicades en el reconeixement de cèl·lules tumorals. Si alguna cèl·lula esdevé cancerosa, les cèl·lules assassines les reconeixen com a estranyes i li provoquen la mort.

Els limfòcits són cèl·lules que generalment s'empren per a la dosimetria biològica, és a dir, la valoració quantitativa de les aberracions cromosòmiques en un individu irradiat per radiacions ionitzants ja que presenten molts avantatges, com poden ser:

- La seva facilitat al hora d'obtenir-los i cultivar-los.
- La estabilitat que presenten en el seu cariotip.
- El conjunt de la població està sincronitzada en G0, és a dir, que totes les cèl·lules es troben en una mateixa fase al mateix temps.
- L'exposició global, és a dir, que els limfòcits circulen pel tot el cos.
- La seva vida és mitjana (setmanes - anys).
- Sensibilitat a exposicions perjudicials tant in vitro com in vivo.

També es poden utilitzar per a la quantificació d'aberracions relacionades amb altres mutàgens, en el nostre cas amb el fàrmac Busulfan. Els limfòcits normalment no es divideixen, igual que la resta de cèl·lules sanguínies, sinó que es troben en la fase G0. Per quantificar el nombre d'aberracions cromosòmiques en cèl·lules irradiades i exposades a altres mutàgens es cultiven i es fa que entrin en la fase de divisió, que s'atura durant la metafase. És en aquest moment en el que es poden observar les aberracions cromosòmiques.

## **II.6. Els agents mutàgens**

Una gran part de les mutacions es produeixen de manera casual sobretot degut a errors durant la replicació de l'ADN. Tot i així, la probabilitat de patir mutacions augmenta notablement quan els organismes estan exposats a l'acció de substàncies o radiacions concretes que actuen directament sobre la molècula d'ADN causant anomalies. Aquestes substàncies o radiacions s'anomenen agents mutàgens.

Els agent mutàgens poden ser de naturalesa física o química.

### II.6.1 Els tipus de mutàgens

- **Mutàgens físics:** són principalment la calor i les radiacions d'alta energia. Aquestes poden actuar sobre l'ADN trencant enllaços que uneixen la molècula o causant anomalies.
- **Mutàgens químics:** Poden ser:
  - **Anàlegs dels nucleòtids:** són substàncies químicament similars als nucleòtids que formen l'ADN. Per aquest motiu són capaces de substituir les bases normals de l'ADN de manera que la seqüència es veu alterada, cosa que genera errors durant la replicació.
  - **Agents reactius amb els àcids nucleics:** Són substàncies capaces de reaccionar químicament amb les bases de l'ADN alterant-les.
  - **Agents que intercalen les bases de l'ADN:** són substàncies que les seves molècules tenen la mateixa mida que un parell de bases nitrogenades i poden introduir-se en la doble hèlix d'ADN.

Els mutàgens també es poden classificar segons la manera com actuen sobre la cèl·lula i el tipus d'alteració estructural que produeixen. Segons aquest criteri els mutàgens poden ser S-Dependents o S-Independents.

- **Mutàgens S-Dependents.** Són substàncies o fenòmens químics com la radiació ultraviolada o els agents alquilants que no causen directament ruptures o anomalies greus. Per dur a terme la seva acció mutagènica han de passar per la fase S del cicle cel·lular.

En el cas dels agents alquilants, la substància s'interposa entremig de la cadena d'ADN i només causa aberracions quan la cèl·lula passa per la fase S, ja que al intentar replicar la molècula d'ADN no ho pot fer perquè aquest agent es troba al mig. Les aberracions es produeixen quan se sintetitza malament la nova molècula de l'ADN, degut a que l'agent es trobava intercalat i els mecanismes de reparació no ho han solucionat correctament. Aquests tipus de mutagen causa alteracions de tipus cromatídic (estructures trirradials, tetraradials i gap).

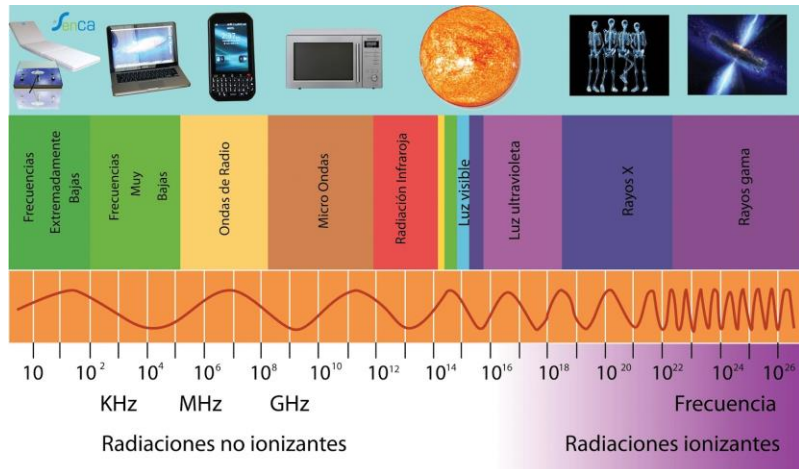
Un exemple d'aquest tipus de mutagen és el Busulfan que hem utilitzat a la part pràctica del treball.

- **Mutàgens S-Independents.** Són les substàncies o fenòmens físics com les radiacions ionitzants o els compostos químics radiomimètics capaços d'induir directament ruptures en la hèlix d'ADN sense necessitat de passar per la fase S del cicle cel·lular. Causen aberracions cromosòmiques quan la reparació de l'anomalia és incorrecta o bé no es produeix.

Generalment causen aberracions de tipus cromosòmic, és a dir, que afecta al cromosoma sencer (cromosomes dicèntrics, tricèntrics, tetracèntrics i anells). Un exemple d'aquest tipus de mutagen són les radiacions ionitzants que hem emprat en el nostre experiment.

## II.7. LA RADIACIÓ

La radiació és el transport o la propagació d'energia en forma de partícules altament energètiques o ones. Si la radiació és deguda a forces elèctriques o magnètiques es diu radiació



Espectre electromagnètic

electromagnètica. Però la matèria també pot emetre altres formes de radiació.

La matèria està constituïda per àtoms i agrupacions d'ells, les molècules.

Els àtoms consisteixen en un petit nucli format per protons, partícules que posseeixen càrrega elèctrica positiva, i neutrons, partícules similars als protons pel que fa a la massa però que no posseeixen càrrega elèctrica, és a dir, són neutres. Orbitant al voltant del nucli es troben els electrons que posseeixen càrrega elèctrica negativa.

Quan la quantitat d'electrons iguala en nombre als protons, llavors l'àtom és neutre i la seva càrrega elèctrica total és zero. Si això no és així, l'àtom té càrrega elèctrica i es diu que ha format un ió.

A la naturalesa, la gran majoria dels nuclis atòmics són estables i es mantenen inalterats en el temps. Hi ha, però, alguns nuclis atòmics que són inestables ja que poden emetre espontàniament partícules carregades o radiació electromagnètica (fotons), o fins i tot trencar-se en diversos nuclis més petits, modificant la seva forma inicial. Aquests nuclis inestables s'anomenen radionúclids o radioisòtops.

El procés d'emissió es diu desintegració radioactiva o radioactivitat. Si els productes de les desintegracions interaccionen amb un àtom o molècula i alliberen un electró, es diu que ha succeït una ionització. Totes les partícules o fotons que tenen prou energia com per produir una ionització es diuen radiacions ionitzants.

Les radiacions ionitzants poden arribar a ionitzar (formar ions) o trencar lligams en àtoms o molècules milions de vegades abans de perdre tota la seva energia. Aquesta és la raó central per la que poden tenir importants efectes biològics i sobre la salut.

### **II.7.1 Les radiacions ionitzants**

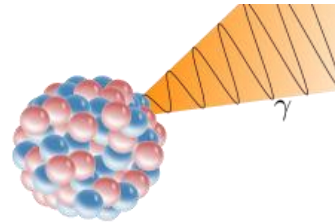
La radiació ionitzant és aquella radiació de més energia de l'espectre electromagnètic, és a dir, de menor longitud d'ona i major freqüència. Aquest tipus de radiació té l'energia suficient per arrencar electrons dels àtoms sobre els quals actua, de manera que aquests deixen de tenir càrrega elèctrica neutra per adquirir una càrrega diferent (positiva o negativa) , i per tant forma ions.

Les radiacions ionitzants es caracteritzen pel seu poder de ionització i per la seva capacitat de penetració, que principalment són conseqüència de la seva naturalesa.

Segons el seu tipus de naturalesa les radiacions ionitzants es poden classificar en:



- **La radiació electromagnètica:** és un fenomen físic provocat per la matèria que consisteix en l'emissió, propagació i absorció d'energia en forma d'ones. Dins l'espectre electromagnètic comprèn els Raigs X ( $3 \cdot 10^{16}$  Hz a  $3 \cdot 10^{18}$  Hz de freqüència) i els Raigs  $\gamma$  (freqüències superiors a  $10^{19}$  Hz).
- **Raigs X:** Són raigs procedents de l'escorça de l'àtom que es produeixen per l'acció d'electrons ràpids. Els raigs X són les radiacions ionitzants menys energètiques, i per tant amb menys poder de ionització. La radiació X és semblant a la gamma, però es produeix artificialment, a partir d'un material que no té radioactivitat pròpia.
- **Raigs  $\gamma$ :** Són radiacions procedents del nucli de l'àtom, que es produeixen quan l'àtom en estat excitat allibera energia i passa a l'estat fonamental.



Radiació gamma

Tant els Raigs X com els Raigs  $\gamma$  tenen la mateixa naturalesa que la radiació no-ionitzant, però són un tipus de radiació molt més energètica.

- **La radiació corpuscular:**

Estan constituïdes per partícules subatòmiques que es mouen a velocitats properes a la de la llum. La majoria dels àtoms tenen nuclis estables, és a dir, tenen el mateix nombre de protons i neutrons i no varia mai. En canvi, hi ha d'altres que el seu nucli és inestable (tenen la capacitat de desintegrar-se) aquests s'anomenen radionúclids. Són radionúclids aquells nuclis que tenen un nombre atòmic superior a  $Z=82$ .

L'origen de les radiacions ionitzants corpusculars està en el nucli d'àtoms radioactius inestables que es desintegren i emeten diferents partícules.

Són radiacions corpusculars:

- **Radiació  $\alpha$ :** Consisteix en l'emissió de partícules pesants formades per dos protons i dos neutrons, com el nucli d'heli, emeses per la desintegració d'àtoms d'elements pesants (urani, radó, plutoni. . . ).

- Les partícules alfa formen fàcilment ions, és a dir, el seu poder de ionització és alt. Com aquest conjunt de partícules té molta massa la seva capacitat de penetració en la matèria és molt petita i no són capaces de penetrar per irradiació directa.
- **Radiació  $\beta$ :** Consisteix en l'emissió d'electrons per la conversió d'un neutró en un protó. El poder de penetració en la matèria de la radiació beta és més alt que el de la radiació alfa, ja que l'electró té una massa més petita. La capacitat de ionització produïda és menor, ja que les petites dimensions de l'electró fan menys probable la interacció amb la matèria.
  - **Radiacions de neutrons:** És l'emissió de partícules sense càrrega, d'alta energia i gran capacitat de penetració. No hi ha fonts naturals de radiació de neutrons, sinó que es produeixen en les reaccions nuclears. Els reactors nuclears són els que generen neutrons amb més abundància.

Les fonts d'emissió de les radiacions ionitzants es poden dividir en:

- **Naturals:** quan la radiació prové de fenòmens naturals, com són els radioisòtops que es troben a la naturalesa o els raigs còsmics
- **Artificials:** quan la radiació prové de màquines o mètodes desenvolupats per l'ésser humà, com per exemple les màquines de Raigs X i els acceleradors de partícules.

La utilització de les radiacions ionitzants són variades. S'utilitzen en els camps de: indústria, mineria, salut, alimentació, agricultura, investigació i en estudis mediambientals. Dins d'aquests àmbits s'utilitzen per exemple per a esterilització i conservació d'aliments, per a la producció de radiofàrmacs, per al tractament contra determinats tipus de càncer, per a l'esterilització de teixits biològics, radiografies, gammagrafies i neutrografies, entre d'altres. Per aquest motiu els treballadors que es dediquen professionalment a aquests àmbits i totes les altres persones que es trobin exposades a la radiació ionitzant (com per exemple pacients subjectes a tractaments que impliquen l'exposició a la radiació ionitzant)

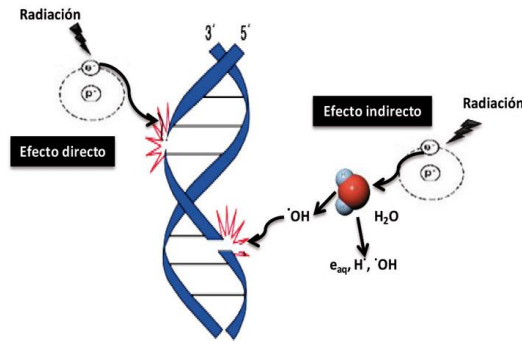
han de tenir un control i unes normes de seguretat estrictes sobre la utilització i exposició d'aquestes radiacions. Per mesurar l'exposició i els efectes de la radiació s'utilitzen dues unitats de mesura:

- **Dosi absorbida:** indica l'energia absorbida per unitat de massa del material que ha estat irradiat. La unitat de mesura en el SI és el Gray (Gy). Un Gy equival a l'absorció de un joule per quilogram de material irradiat ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ).
- **Dosi equivalent:** indica la radiació absorbida per la matèria viva, ponderada pels possibles efectes biològics produïts. Serveix per comparar el dany biològic provocat per tipus de radiació diferent. La unitat de mesura en el SI és el Sievert (Sv). Un Sv equival a l'absorció de un Joule per quilogram de la matèria viva que ha absorbit la radiació ( $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J/kg}$ ). En el cas de les radiacions electromagnètiques i la radiació  $\beta$  es compleix la igualtat  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Sv}$ . Tot i així, a partir de 1 Sv s'utilitza la unitat de dosi absorbida (Gy).

## **II.8. Acció de la radiació ionitzant sobre els cromosomes**

Sempre que es produeix una interacció entre la radiació ionitzant i la matèria viva, aquesta absorbeix energia procedent de la radiació. L'absorció d'energia produeix ionitzacions i/o excitacions en els àtoms de les molècules sobre les quals ha actuat la radiació, en funció de l'energia absorbida. La sola excitació dels àtoms també pot ser perillosa si l'energia d'excitació és superior a l'energia dels enllaços entre els àtoms d'una molècula, ja que pot provocar anomalies i trencaments en la molècula deguts a la pèrdua d'un o més electrons. Si aquest trencament no es produeix, la molècula pot tornar a ser estable perdent l'excés d'energia en forma d'emissió de fotons.

En la molècula d'ADN la ionització o excitació dels àtoms deguda a l'absorció d'energia procedent de la radiació ionitzant, pot provocar modificacions en l'estructura química de les pentoses i de les bases nitrogenades, pèrdua d'una o més bases, ruptures dels ponts d'hidrogen que uneixen les dues fibres de la doble hèlix d'ADN, ruptures d'una única fibra o de les dues fibres que conformen la molècula.



Acció de la radiació ionitzant sobre l'ADN

Quan els mecanismes de reparació no poden reparar el dany o ho fan erròniament és quan es produeixen les mutacions genètiques. Si aquestes alteren l'estructura del cromosoma i/o el nombre normal de cromosomes en el genoma de l'espècie s'anomenen aberracions cromosòmiques. Aquestes aberracions només es poden observar durant la metafase i l'anafase de la divisió cel·lular.

L'efecte més comú en els cromosomes irradiats són les ruptures simples, dobles o múltiples en un mateix braç del cromosoma o a la vegada en els dos braços. També es pot produir un amuntegament o adhesivitat dels cromosomes, de manera que aquests no es poden separar durant la divisió cel·lular.

Quan actuen els mecanismes de reparació, el 95% de les ruptures simples es reparen, mentre que a les ruptures múltiples solen produir reparacions errònies, i en aquest cas apareixen aberracions cromosòmiques: cromosomes acèntrics, dicèntrics, tricèntrics, fenòmens de delecio, translocació, inversió, cromosomes en forma d'anells, trirradials, quadrirradials, etc.

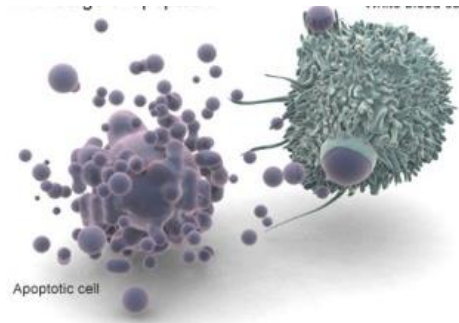
Tot i que qualsevol molècula present a les cèl·lules es pot veure alterada per l'exposició a les radiacions ionitzants, l'alteració de l'ADN sembla tenir un paper més important en el desenvolupament d'efectes nocius per la cèl·lula. El dany al material genètic pot causar la mort cel·lular per apoptosi o l'estat de senescència cel·lular. Si la cèl·lula malmesa sobreviu el seu metabolisme és anòmal i pot

transmetre les mutacions genètiques i les aberracions cromosòmiques a les cèl·lules descendents.

S'han establert tres tipus de respostes que generalment, després d'haver actuat els mecanismes de reparació:

- **Mort a interfase, mort no mitòtica o mort sense divisió.**

En aquest cas la cèl·lula mor sense haver arribat a la fase de divisió. Es pot produir en tot tipus de cèl·lules, generalment a una dosi superior a una radiació de 5Gy. En el cas de les cèl·lules més radiosensibles, com és el cas dels limfòcits, es pot produir a dosis superiors a 0,5Gy.



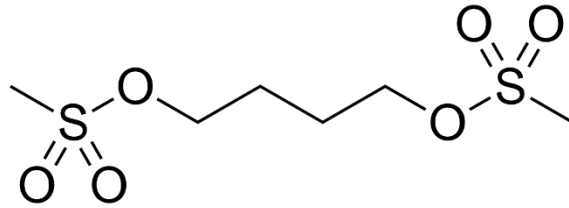
Mort no mitòtica de la cèl·lula

- **Error reproductiu.** Apareix a dosis baixes. Quan es produeix, la cèl·lula és incapaç de reproduir-se repetidament, es divideix un o uns quants cicles més i després deixa de dividir-se.
- **Retràs en la divisió o retràs mitòtic.** Apareix a dosis molt baixes. La cèl·lula irradiada atura el seu cicle abans d'entrar en divisió (fase G2). Aquest aturament és temporal, posteriorment es reanuda el cicle cel·lular i la cèl·lula inicia la fase de divisió. La duració d'aquest aturament depèn de la dosi de radiació.

## II.9. Acció del Busulfan sobre el material genètic

El nom genèric d'aquest fàrmac és Busulfan, encara que té altres noms més comercials com Busulfex® o Myleran®.

El Busulfan (1,4-butanodiol dimetanosulfonato) és un agent



Fórmula molecular del Busulfan

alquilant, és a dir, és un compost químic que reacciona amb les nucleoproteïnes de l'ADN i l'efecte que provoca és la inactivitat de la molècula d'ADN i, com a conseqüència, el bloqueig de la divisió cel·lular, per la qual cosa s'utilitza com a tractament contra el càncer.

Aquest tipus de fàrmac és citotòxic, això vol dir que actua en les cèl·lules bloquejant o reduint la velocitat de divisió de les cèl·lules tumorals i disminuint el creixement del tumor. En alguns casos, el tractament comporta la curació de la malaltia; en d'altres, es tradueix en un augment de l'esperança de vida i en la millora de la qualitat.

En comparació amb les mostasses nitrogenades i les nitrosourees (altres tipus d'agents alquilants), el Busulfan afecta principalment a cèl·lules mieloides (cèl·lules de la família dels limfòcits).

A dosis normals, el Busulfan té una citotoxicitat selectiva cap a les cèl·lules blanques de la sang sense afectar notablement a plaquetes i cèl·lules vermelles de la sang. Amb els règims de dosis altes, totes les línies cel·lulars mieloides es veuen afectades.

En general, el Busulfan no és actiu contra els tumors sòlids. S'utilitza per tractar la leucèmia mieloide crònica (LMC) en pacients que no són candidats al trasplantament de medul·la òssia.

El Busulfan no afecta la supervivència d'aquests pacients i només és útil en la fase crònica de la malaltia.



Busulfan

Els fàrmacs de quimioteràpia que destrueixen les cèl·lules canceroses només durant la divisió es diuen específics al cicle de la cèl·lula. En canvi, els que destrueixen a les cèl·lules canceroses durant la fase de repòs són no específics al cicle cel·lular. Aquest és el cas del Busulfan.

Aquest fàrmac pot produir efectes secundaris a causa de la seva alta citotoxicitat. Alguns d'ells són:

- **Baix recompte de cèl·lules sanguínies.** Els glòbuls blancs i vermells i les plaquetes poden disminuir temporalment. Això pot fer que el pacient es trobi en major risc de patir una infecció, anèmia i hemorràgies.
- **Nàusees i vòmits.**
- **Disminució de la fertilitat.** Això significa que el Busulfan pot afectar la capacitat de concebre. Aquest efecte depèn de la dosi.
- **Augment del risc de càncer secundari,** com leucèmia aguda, especialment amb l'ús a llarg termini del fàrmac.

### **III. PART PRÀCTICA**

#### **III.1. Plantejament**

Recordem que les nostres principals hipòtesis eren:

1. El material genètic de les cèl·lules experimenta diferents mutacions cromosòmiques depenent del tipus de mutagen a que són exposades.
2. Aquestes mutacions són de diferent intensitat i freqüència en funció de la dosi de mutagen a la qual s'ha exposat.

Per posar a prova les nostres hipòtesis vam plantejar el següent experiment. A unes mostres sanguínies els vam aplicar un tractament amb Busulfan, i altres les vam irradiar amb dues dosis de radiació ionitzants de 3Gy i 5Gy per observar-ne l'efecte sobre els cromosomes metafàsics dels limfòcits.

Si les metafases de les cèl·lules són afectades pels mutàgens, presentaran diversos tipus de mutacions. Les que vam poder observar amb l'ajuda del microscopi eren aberracions cromosòmiques, és a dir, mutacions cromosòmiques que han provocat estructures anòmales i canvis en el número normal de cromosomes en el genoma de les cèl·lules.

Les metafases les vam observar amb dos tipus de microscopi: un microscopi òptic comú connectat a una monitor i un microscopi que treballa amb el sistema Metafer. El microscopi del sistema Metafer funciona igual que un microscopi òptic convencional però porta incorporat un ordinador amb un hardware que s'encarrega de detectar autònomament les metafases presents al portaobjectes i de treure una fotografia a 63 augments.

Gràcies a les imatges obtingudes vam poder analitzar totes les metafases aptes per proporcionar informació sobre l'efecte dels mutàgens: amb un mínim de 40 cromosomes, i que els cromosomes es distingissin clarament i es poguessin comptar bé.

Les vam comptar una per una i vam fer una taula on constés el número i naturalesa de les mutacions a cada metafase. Així, vam poder determinar el número de cromosomes de cada metafase, la naturalesa, la quantitat de les aberracions presents i el número total d'anomalies a cada metafase.



Per analitzar amb més precisió els resultats obtinguts vam fer servir el test estadístic de Kruskal-Wallis, un test estadístic no paramètric de bondat d'ajustament, que mesura la diferència entre els resultats que s'esperen i els obtinguts.

Les hipòtesis nul·les (H0) en el nostre experiment eren que no hi havia diferències entre els resultats obtinguts en funció del mutagen i de la dosi. En canvi, les nostres hipòtesis inicials afirmaven que sí hi havia diferències entre les aberracions obtingudes per diferents mutàgens i per diferents dosis, pel que eren les hipòtesis alternatives (H1).

El test de Kruskal-Wallis ens va permetre establir si les diferències obtingudes eren suficientment significatives per acceptar les hipòtesis alternatives o si no ho eren, pel que es mantindrien les hipòtesis nul·les.

### **III.2. MATERIAL**

- **DMSO (Dimethyl sulfoxide).** És una substància orgànica ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) que s'utilitza com a dissolvent del medicament Busulfan per crear la solució stock, de concentració 25mg/mL.
- **Phytohemaglutinina.** És una proteïna que s'extreu d'algunes plantes. S'utilitza per separar leucòcits d'altres cèl·lules sanguínies per preparar cultius. Això és gràcies a la seva capacitat iniciadora de la mitosi. Actua sobretot en els limfòcits.
- **Medi de cultiu**
  - **RPMI 1640.** És un medi de cultiu preparat que permet treballar amb cèl·lules de mamífers. Entre les seves principals funcions destaquen la realització de cultius de limfòcits humans.
  - **Sèrum boví fetal inactivat.** S'utilitza generalment en els medis de cultiu com a suplement. Conté nutrients, hormones, factors de creixement, inhibidors de proteases (enzims que trenquen les proteïnes) i neutralitza substàncies tòxiques.

- **L - Glutamina.** És un aminoàcid que es troba de manera natural en el cos. A vegades s'administra per combatre alguns efectes secundaris de tractaments mèdics. S'utilitza també en els cultius cel·lulars perquè realitza funcions de proliferació, desenvolupament cel·lular i de manteniment del pH.
- **Heparina sòdica.** És una solució que té com a principal funció fer d'anticoagulant de la sang. Permet que la sang es mantingui líquida i no es formin coàguls.
- **Penicil·lina.** Les penicil·lines són antibiòtics que serveixen per combatre les infeccions bacterianes.
- **Colcemid.** És una solució de 10 µg/ml de N-desacetyl-N-methylcolchicin en PBS (Phosphate Buffered Saline). És un inhibidor del fus mitòtic. Evita que es creï el fus mitòtic i així la divisió cel·lular s'atura a la metafase.
- **Carnoy.** És una solució de 3 parts de Metanol i 1 part d'àcid acètic. L'àcid acètic trenca les membranes plasmàtiques de les cèl·lules sanguínies i el metanol fixa les metafases.
- **Màquina irradiadora de raigs gamma.** Aquest aparell funciona gràcies al Cesi 55Cs 137. Aquest isòtop té un període de semidesintegració de 30,17 anys. És un isòtop inestable, i al desintegrar-se per aconseguir ser estable ha d'alliberar en total 1.174 MeV i convertir-se en el Bari 56Ba137. Per fer-ho pot recórrer dos camins.
  - El 5,4% de les vegades allibera directament els 1.174 MeV en forma de radiació  $\beta$  i forma el Bari 56Ba137 estable.
  - El 94,6% de les vegades allibera 0.5120 MeV  $\beta$  (en forma de radiació  $\beta$  ) i forma un Bari 56Ba137m, que és inestable. Els 0.6617MeV que li queden per alliberar per formar el 56Ba137 estable els allibera en forma de radiació  $\gamma$ . Aquesta és la radiació que utilitza la màquina irradiadora.

Altres estris o materials utilitzats són:

- Bata i guants
- Mascareta de protecció de pols i gasos ulls-boca
- Campana d'extracció de gasos
- Balança
- Microtubs foscos
- Xeringues per extreure la sang
- Incubadora
- Màquina d'irradiació
- Substàncies necessàries per preparar un medi de cultiu
  - A. RPMI 1640 (medi cel·lular)
  - B. Sèrum Boví Fetal inactivat
  - C. Phytohemaglutinin
  - D. L-Glutamina
  - E. Penicil·lina/Estreptomicina
  - F. Heparina sòdica 1%
- Tubs de fons cònic
- Micropipeta de 500 µL
- Pipeta Pasteur
- Xuclador
- 100 µL Colcemid
- Màquina de centrifugació
- Solució Hipotònica (KCL 0.075M)
- Carnoy (3 parts de Metanol absolut i 1 part d'àcid acètic)
- Vòrtex
- Plataforma metàl·lica (estufa)
- Aigua destil·lada
- Portaobjectes (porta)
- Paper de cuina
- Reactius per a la tinció: Giemsa o Leishman i els seus respectius buffers
- Recipient i cubeta de tinció

### **III.3. Procediment**

L'experiment va durar 14 dies, començant pel dilluns 16 de juliol del 2018.

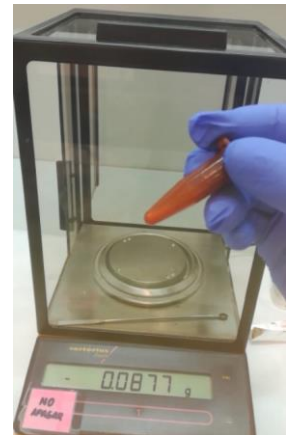
L'objectiu de la jornada era veure les diferències a nivell cromosòmic d'una mostra de sang perifèrica tractada amb diferents tipus d'agents cancerígens, com la radiació ionitzant i el fàrmac quimioteràpic busulfan.

Es va posar en marxa 3 tipus de cultius de sang perifèrica amb els diferents agents mutàgens: Sang irradiada a 3Gy, sang irradiada a 5Gy i sang tractada amb fàrmac Busulfan 500µM.

#### **PREPARACIÓ INICIAL DEL FÀRMAC BUSULFAN**

El Busulfan és una substància molt perillosa degut a la seva toxicitat, per això cal:

- Posar-se la bata, doble guant i mascareta de protecció de pols i gasos ulls-boca.
- Treballar a la campana d'extracció de gasos, portar allà la balança i equilibrar-la.
- Embrutar el mínim material possible. El Busulfan i el DMSO són productes citotòxics i altament cancerígens.
- Tot el residu que es generi es llença al bidó de citostàtics i el material utilitzat es renta amb abundant aigua i sabó.
- Netejar molt bé la zona de treball (taula i parets) després de recollir tot i d'utilitzar el producte.
- Pesar 20 mg de Busulfan, Molecular Weight: 246.30 g/mol .
- Posar-los a un microtub fosc i retolar el pes i el nom del producte, guardar fins el moment de la seva dissolució.



Balança amb la mostra de busulfan

Un cop dissolt la seva estabilitat és desconeguda, podria ser estable per només durant 4 hores. Per aquest motiu nosaltres només el vam pesar i el vam guardar. El dia que el vam utilitzar li vàrem afegim el DMSO dins per obtenir la concentració desitjada.

L'endemà s'iniciaren els cultius (extracció de la mostra, preparació dels fàrmacs, radiació i posada en marxa dels cultius)

Primer, vam fer l'extracció de la mostra, 12mL de sang perifèrica amb heparina sòdica al 1%.

A continuació, vam preparar el fàrmac Busulfan a la cabina d'extracció de gasos.

Segons la informació del fàrmac la dilució mínima de treball és de 25 mg/mL. Nosaltres vam pesar 20mg. Vàrem calcular el volum de dissolvent, DMSO que es necessita per fer una concentració final de 25mg/mL i vam afegir 25  $\mu$ L de Busulfan a 0.1015M (Stock inicial) a 5 mL de medi amb sang per obtenir una concentració final de 500  $\mu$ M.



Campana extractora de gasos

Després, vam tractar la mostra amb el fàrmac a la cabina de bioseguretat.

Es van fer 2 cultius de Busulfan.

En un tub es va posar 9 mL de RPMI 1640 + 1 mL de sang perifèrica heparinitzada + 50  $\mu$ L de Busulfan a 0.105M i tot seguit es va homogeneïtzar per decantació.

Després, es va deixar incubar 3h a una incubadora a 37°C perquè actués el Busulfan.

Més tard, vam irradiar la mostra a una radiació de 3Gy i 5 Gy a la Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR). Vam retolar els dos tubs com 3Gy i 5 Gy i vam repartir en ells la sang sobrant.

Les sangs es van irradiar de la següent forma:

3 Gy = 40 segons i 5 Gy = 67 segons

L'irradiador és una font d'exposició contínua, de manera que la quantitat de radiació que rep la mostra depèn del temps durant el qual es troba exposat. La relació temps-radiació la calcula el irradiador mitjançant un full de càlcul.



Irradiador

Un cop al laboratori, es va posar la sang a la incubadora i es va deixar reparar durant 2 hores a 37°C. Va ser quan van actuar els mecanismes de reparació.

A continuació, vam preparar el medi de cultiu base a la cabina de flux laminar.

- 100 mL RPMI 1640
- 20 mL Sèrum Boví Fetal inactivat
- 5 mL Phytohemaglutinin
- 2 mL L-Glutamina
- 1.5 mL Penicil·lina/Estreptomicina
- 1 mL Heparina sòdica 1%



RPMI 1640



Sèrum boví



Phytohemaglutini



L-Glutamina



Penicil·lina



Heparina sòdica

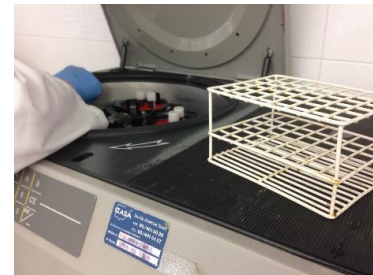
Vam repartir 5 mL de la mescla en tubs de fons cònic de 10 mL i els tubs amb medi que no vam fer servir es van guardar a -20°C.

Tot seguit, vam posar en marxa els cultius a la cabina de bioseguretat i vàrem retolar els tubs (data, tractament dosi radiació o fàrmac, temps de cultiu, n<sup>o</sup> cultiu, etc.)

### **Cultiu de sang irradiada:**

Es va homogeneïtzar la sang suaument i es va sembrar amb la micropipeta 500 µL a cada tub amb 5 mL de medi de cultiu complet.

Finalment es va tapar, homogeneïtzar i es va incubar a 37°C durant 48 hores.

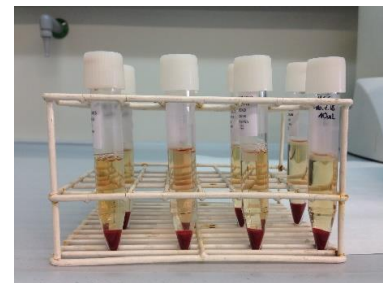


Centrifugadora amb les mostres

### **Cultiu de sang tractada amb fàrmac:**

Vam homogeneïtzar la sang suaument i la vam centrifugar a 1200 rpm durant 10 minuts. Amb una pipeta Pasteur i sense tocar el botó cel·lular vam eliminar el líquid transparent superior on eren el sèrum sanguini, l'RPMI 1640 i el fàrmac.

Es va suspendre suaument el botó cel·lular i es va sembrar amb la micropipeta 500 µL a cada tub amb 5 mL de medi de cultiu complet.



Mostres després de la centrifugadora

Es va tapar, homogeneïtzar i incubar a 37°C durant 48 hores.

El medi de cultiu on es va posar la sang contenia Phytohemaglutinina, que va estimular la divisió cel·lular, tant de les cèl·lules irradiades com les tractades amb el fàrmac.

La Phytohemaglutinina només va actuar sobre els limfòcits.

Tots els cultius es van incubar durant 48h a 37,5°C perquè les cèl·lules poguessin arribar a la metafase i així es pogués observar bé les aberracions cromosòmiques.

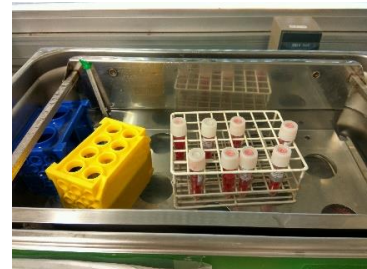
Més tard, es va afegir l'agent antimitòtic i es va fer l'extracció dels cultius. A més a més, vam posar a cada cultiu 100 µL de Colcemid®. Així mateix es va extraure els cultius.



Colcemid

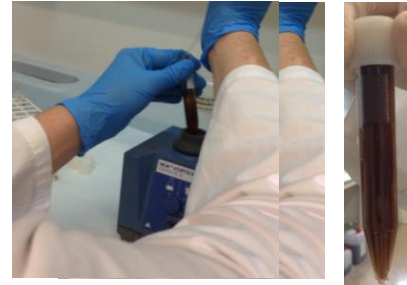
Procediment:

1. Centrifugar els tubs a 1200 rpm durant 10 minuts.
2. Eliminar el sobrenedant amb pipeta Pasteur o amb el xuclador fins on comença la part cònica sense tocar el botó cel·lular.
3. Mesclar el botó cel·lular suaument i al vòrtex omplir el tub amb Solució Hipotònica a 37°C. Les primeres pipetades gota a gota. La solució hipotònica va inflar les cèl·lules, ja que per osmosi va entrar l'aigua. Això va permetre que després es poguessin observar correctament els nuclis i els cromosomes.
4. Incubar al bany maria de 37°C durant 25 minuts.
5. Centrifugar els tubs a 1200 rpm durant 10 minuts.
6. Eliminar el sobrenedant amb pipeta Pasteur fins on comença la part cònica sense tocar el botó cel·lular.



Bany Maria

7. Mesclar el botó cel·lular suaument i al vòrtex omplir el tub de carnoy fresc i fred. Les primeres pipetades gota a gota. El carnoy rebenta les membranes cel·lulars de totes les cèl·lules i totes les membranes nuclears excepte la dels limfòcits. En el cas dels eritròcits, com contenen hemoglobina que té un àtom de ferro al centre, al rebentar la membrana cel·lular la hemoglobina queda en contacte amb l'aire i l'àtom de ferro s'oxida, per això queda de color marró.
8. Centrifugar els tubs a 1200 rpm durant 10 minuts.
9. Eliminar el sobrenedant per decantació suau del tub.
10. Mesclar el pellet al vòrtex omplir el tub de carnoy.
11. Repetir els passos del 7 al 10 un cop més. En total s'han de fer 3 rentats de carnoy. Després de tots els rentats de Carnoy només queden els nuclis i les metafases dels limfòcits. El Carnoy (en concret el metanol) actua com a fixador, pel que els nuclis i els cromosomes queden com dissecats.
12. Sense centrifugar, es resuspèn el cultiu i es guarden els tubs a 4°C fins al moment de fer les extensions.



Afegint carnoy per primera vegada a la mostra

### **Obtenció de les extensions**

La mostra es treu del refrigerador i es centrifuga a 1200 rpm durant 10 minuts. Es treu el carnoy antic i es posa 4 gotes de carnoy nou i fresc. Es resuspèn la mostra.

Per fer les extensions:

1. S'escalfa una plataforma metàl·lica sobre la qual es posa paper de cuina i es va mullar amb aigua destil·lada.
2. Amb una pipeta es tiren des d'una altura de 15-20 cm dues gotes de la mostra a cada portaobjectes. Amb l'altura s'aconsegueix que



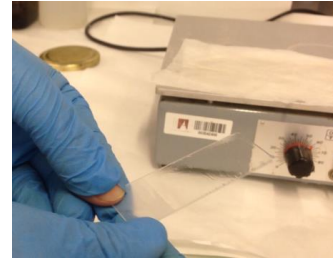
Plataforma metàl·lica



Secant l'extensió sobre una estufa



la mostra s'estengui bé en tot el portaobjectes. Els portaobjectes es van guardar anteriorment a 4°C en metanol, així es va evitar que estiguessin contaminats. Per fer-ho amb més precisió, també es va posar al portaobjectes 2 gotes d'àcid acètic al 70% i just a sobre dues gotes de la mostra (botó + Carnoy).



Extensió final sobre el portaobjectes

3. Es posa el portaobjectes a sobre del paper humit de la superfície metàl·lica escalfada i, així, el portaobjectes s'asseca en un ambient humit.

Es va repetir aquest procés per tota la quantitat de mostra disponible.

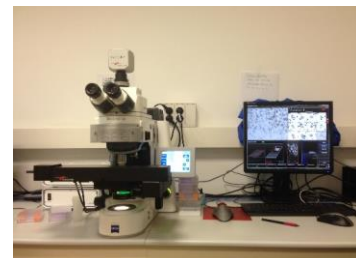
Després de fer les extensions es van deixar envellir els portaobjectes a 45°C durant mínim 24h, de manera que es van deshidratar els cromosomes i a l'hora de tintar-los els productes de tinció no els va afectar la seva morfologia.

### **Tinció i observació**

Vam observar les metafases en dos microscopis diferents, un microscopi òptic i un microscopi del sistema Metafer. En el microscopi òptic vam poder observar els cromosomes a 100 augments i per poder observar les metafases bé en aquest microscopi es va utilitzar el colorant Leishman, ja que era més intens. Per al microscopi Metafer es va utilitzar el colorant Giemsa, ja que era menys intens que el de Leishman. Per als dos mètodes el procediment de tinció va ser el mateix:

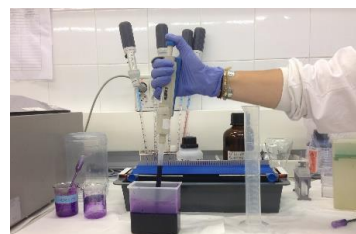


Microscopi òptic



Microscopi Metafer

1. Es va preparar una solució al 4% de tint Giemsa o Leishman en els respectius Buffer Giemsa o Buffer Leishman (els Buffer eren dissolvents, perquè el colorants sols eren molt concentrats).



Preparant el colorant

Per al Giemsa:

Gairebé tots els portaobjectes els vam observar amb el microscopi Metafer, ja que el colorant que més vam utilitzar va ser el Giemsa. Per aquests cas es preparà la solució amb 144mL de Buffer i 6 mL de tint i es va resuspendre la mescla.



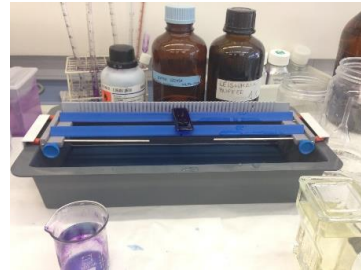
Cubeta amb els portaobjectes tenyint-se

Per al Leishman:

Només vam observar 2 portaobjectes, pel que només vam fer 50 ml de mescla: 48 mL de Buffer i 2 mL de tint.

2. Per a la tinció giemsa:

Vam posar la mescla en una cubeta especialitzada per a la tinció, ja que tenia espai per a molts portaobjectes. Es van posar dins la cubeta i es van deixar reposar durant 10 minuts.



Cubeta especialitzada per a la tinció

Per a la tinció Leishman:

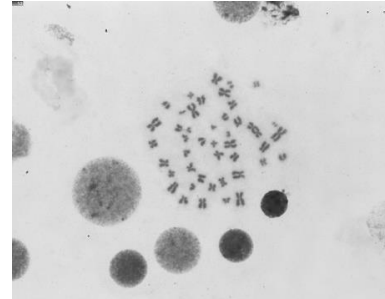
Com eren menys portaobjectes no va caldre una cubeta. S'hi van posar en una safata especialitzada per a la tinció i s'hi va abocar la mescla de Buffer i colorant sobre cadascun dels portaobjectes. Es deixà reposar durant 5 minuts.

3. Passat el període de temps necessari vam rentar els portaobjectes amb aigua destil·lada i es van deixar assecar.

Un dels problemes que vam tenir va ser que ens vam equivocar de colorant i en comptes de Leishman vam utilitzar Giemsa. Per solucionar-ho vam posar els portaobjectes amb el colorant equivocant en etanol al 96% per treure'l i vam fer tres rentats en etanol durant 5 minuts cadascun. Després vam tornar a tenyir els portaobjectes amb el colorant corresponent.

Després de la tinció es van posar els portaobjectes en els respectius microscopis i es va observar:

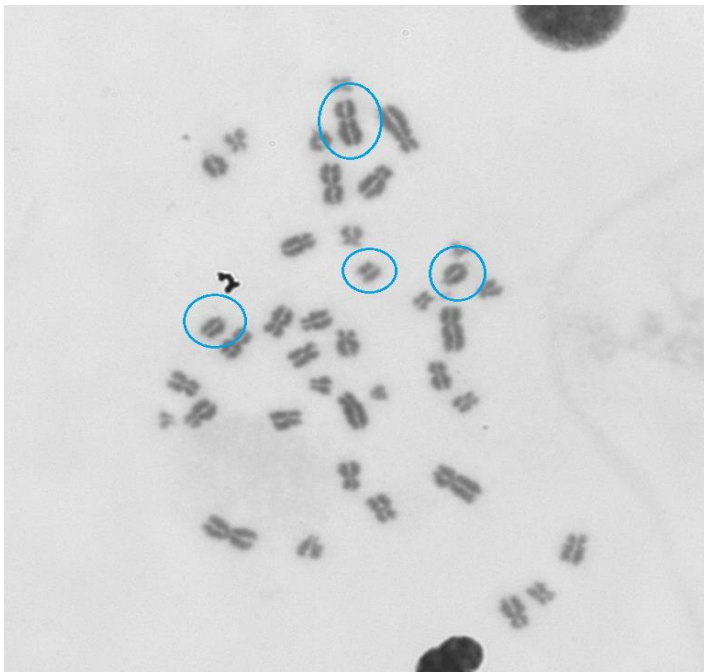
- Metafases
- Cercles de color girs clar: són nuclis que van iniciar la divisió cel·lular però no van arribar a la metafase.
- Cercles foscos: són nuclis que no es van estimular per la Phytohemaglutinina i no van iniciar la divisió cel·lular.



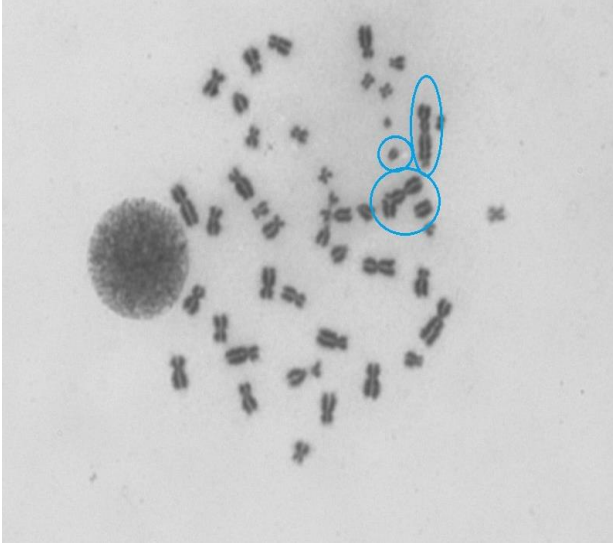
Una de les metafases observades

En els dos microscopis, a partir de 100 augments en el microscopi òptic i a partir de 63 augments en el microscopi Metafer, es va posar una gota d'oli mineral sobre els portaobjectes perquè es pogués observar la mostra correctament.

### **III.3.1. Fotografies de les metafases observades**

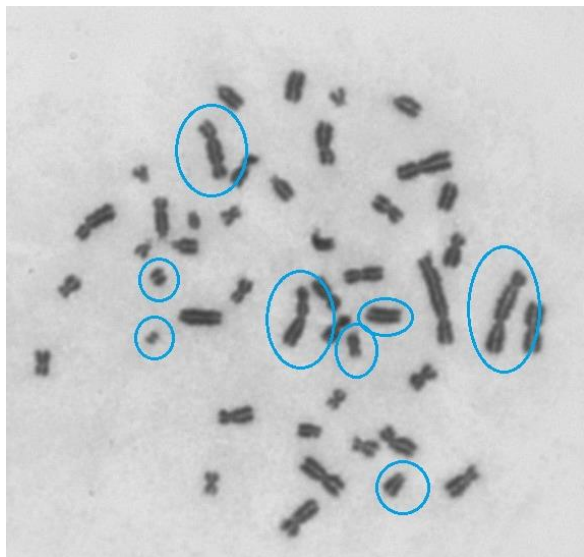
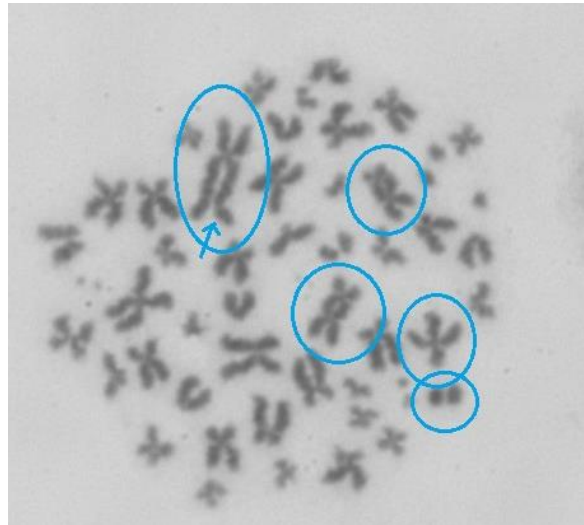


Metafase de la mostra de 3Gy, portaobjectes 1.  
D'esquerra a dreta s'hi observa un cromosoma acèntric, un dicèntric, un altre acèntric i un anell.



Metafase de la mostra de 3Gy, portaobjectes 2. D'esquerra a dreta s'hi observa un cromosoma acèntric, una estructura trirradial, un altre cromosoma acèntric i un cromosoma tetracèntric.

Metafase de la mostra de 3Gy, portaobjectes 2. D'esquerra a dreta s'hi observa un cromosoma amb un gap a un dels braços, dos dicèntric, una estructura tetrarradial i un cromosoma acèntric.



Metafase de la mostra de 5Gy, portobjectes 1. D'esquerra a dreta s'hi observen dos cromosomes acèntrics, un tricèntric, dos dicèntrics, dos acèntrics més i un altre dicèntric.

### **III.4. RESULTATS I ANÀLISI**

Després d'haver obtingut les imatges de les metafases vam haver de fer una selecció, ja que no totes les fotografies s'observaven correctament. Nosaltres vam comptar les metafases que tinguessin més de 40 cromosomes, ja que probablement els que faltaven no hi sortien degut a l'angle en que s'havia pres la fotografia. Imatge per imatge vam anar comptant el número de cromosomes de cada metafase i les aberracions que s'hi podien observar.

Per realitzar les taules on vam resumir els nostres resultats vam haver de tenir en compte uns quants factors.

#### **III.4.1. Taules de resultats**

Els cromosomes extra són tots aquells cromosomes acèntrics que no provenen de la formació d'un cromosoma dicèntric, tricèntric o tetracèntric, ja que el genoma humà en principi no hauria de presentar cromosomes acèntrics.

Un cromosoma dicèntric i un cromosoma acèntric compten com una única aberració, ja que, al formar-se un cromosoma dicèntric es forma a la vegada un d'acèntric.

En formar-se un cromosoma tricèntric es formen dos cromosomes acèntrics, així que un cromosoma dicèntric i dos cromosomes acèntrics compten com dues aberracions. També, en formar-se un cromosoma tetracèntric es creen tres cromosomes acèntrics, així que un cromosoma tetracèntric juntament amb tres cromosomes acèntrics compta com tres aberracions. Per tant, podem determinar que el nombre de cromosomes acèntrics és igual al nombre cromosomes dicèntrics + 2·nombre cromosomes tricèntrics + 3·nombre cromosomes tetracèntrics + nombre cromosomes extra.

Les aberracions gap, anells i estructures trirradials i tetrarradials són independents les unes de les altres, i cadascuna compta com una única aberració. D'aquesta manera el nombre d'anomalies total és igual al número de cromosomes acèntrics + gap + anells + estructures trirradials + estructures tetrarradials.

Mutgen i portaob jectes	Metaf ases analit zade s	Cromos omes analitzat s	Mitjana de cromos omes per metafas e	Número d'aberracions cromosòmiques per portaobjectes								Cromos omes extra per porta (acèntric s)	Número d'anom alies per porta
				Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Estructures trirradials	Estructures tetrarradials		
3Gy Porta 1	12	506	42.1667	44	6	0	0	1	3	0	0	38	48.
3Gy Porta 2	114	5262	46.1579	255	101	6	1	29	5	1	0	139	290
5Gy Porta 1	42	1891	45.0238	186	81	4	0	1	7	4	2	97	200
5Gy Porta 2	52	2433	46.7885	226	93	11	1	5	3	1	0	108	235
Busulfan n porta 1	1	47	47.0000	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Busulfan n porta 2	5	222	44.4000	4	3	0	0	2	0	1	0	1	7
Busulfan n porta 3	3	136	45.3333	5	3	0	0	0	0	0	0	2	5

Muta gen i porta objectes	Metafases analitzades	Cromosomes analitzats	Mitjana de cromosomes per metafase	Número d'aberracions cromosòmiques per portaobjectes								Cromosomes extra per porta (acèntrics)	Número d'anomalies per porta
				Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Estructures trirradials	Estructures tetrarradials		
Busulfan porta 5	1	32	32.0000	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Busulfan porta 6	1	46	46.0000	1	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Busulfan porta 7	2	89	44.5000	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5
Busulfan porta 8	2	91	45.5000	3	3	0	0	1	0	0	0	0	4
Busulfan porta 9	2	91	45.5000	6	0	0	0	0	1	1	0	6	8

Mutagen	Metafa ses analitza des	Cromoso mes analitza ts	Mitjana de cromoso mes per metafas e	Número d'aberracions cromosòmiques mutagen								Cromoso mes extra per mutagen	Número d'anom alies per mutage n
				Acèntr ics	Dicèntr ics	Tricèntr ics	Tetracèntr ics	Gap	Anel ls	Estruct ures trirradi als	Estructu res tetrarra dials		
3Gy	126	5768	45.7778	299	107	6	1	30	8	1	0	177	338
5Gy	94	4324	46.0000	412	174	15	1	6	10	5	2	205	490
Busulf an	17	754	44.3529	28	16	0	0	3	1	2	1	12	35



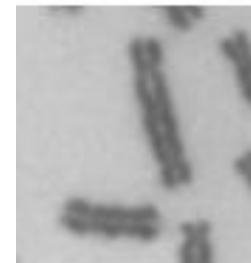
A partir de les dades obtingudes, i recollides a les taules anteriors, hem pogut realitzar la següent anàlisi.

En el cas del tractament amb radiació ionitzant 5Gy hem trobat molts cromosomes afectats, un 11,33% del total de cromosomes observats. Això és degut a que la molècula d'ADN absorbeix l'energia procedent de la radiació ionitzant provocant així modificacions en l'estructura química de les pentoses i de les bases nitrogenades, amb pèrdua d'una o més bases, ruptures dels ponts d'hidrogen que uneixen les dues fibres de la doble hèlix d'ADN o ruptures d'una única fibra o de les dues fibres que conformen la molècula. Malgrat que en aquests moments s'activin els



Estructura trirradial, tricèntric (a sobre), acèntric (sota l'estructura trirradial).

mecanismes de reparació, el dany provocat per la radiació és tan gran que actuen de manera errònia o directament no poden realitzar la seva funció, provocant d'aquesta manera les aberracions cromosòmiques de tipus cromosòmic (si afecta a tot el cromosoma) o cromatídic (si afecta a una sola cromàtide).



Cromosoma tricèntric (a sota) i tetracèntric (a sobre)

La radiació ionitzant és un mutagen S-independent, és a dir, el seu efecte es produeix independentment de la fase S del cicle cel·lular. Això provoca que el tipus d'aberracions cromosòmiques que causen siguin majoritàriament de tipus cromosòmic (que afecten a

tot el cromosoma). Així s'han obtingut unes majors freqüències i quantitats d'aberracions de tipus cromosòmic: acèntrics (9,53%), dicèntrics (4,02%), tricèntrics (0,35%), tetracèntrics (0,02%) i anells (0,23%); mentre que hem observat una menor quantitat i freqüència d'aberracions de tipus cromatídic: trirradials (0,12%), tetrarradials (0%) i gap (0,14%).



estructura tetrarradial (dreta), cromosoma sa (centre) i dicèntric (esquerra)

En la mostra del tractament amb radiació ionitzant 3Gy hem observat moltes aberracions cromosòmiques: un total de 7.84% dels cromosomes de la mostra estaven afectats. L'efecte que ha

tingut la dosi de 3Gy sobre la molècula d'ADN és de la mateixa naturalesa que la radiació de 5Gy ja que són radiacions ionitzants. Així, hem observat unes majors

freqüències d'aberracions de tipus cromosòmic: acèntrics (5,18%), dicèntrics (1,86%), tricèntrics (0,10%), tetracèntrics (0,02%) i anells (0,14%); mentre que hem observat una menor quantitat i freqüència d'aberracions de tipus cromatídic: trirradials, tetrarradials (0%) i gap.

En el cas de 3Gy podem veure un menor percentatge de aberracions cromosòmiques respecte a la mostra de 5Gy ja que al aplicar una dosi inferior de radiació sobre l'ADN, aquest no surt tan perjudicat.

En el cas del Busulfan hem observat moltes menys metafases perquè la dosi utilitzada és l'estàndard per a els tractaments anticancerígens, de manera que està preparada per provocar el mínim dany cel·lular possible i en tot cas, l'apoptosi cel·lular.

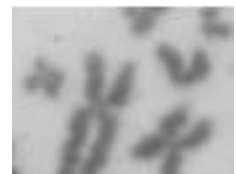
En aquest tractament aberracions de tipus cromosòmic: 2,92% d'acèntrics, un 2,12% de dicèntrics, cap tricèntric ni tetracèntric i un 0,13% d'anells. I de tipus cromatídic trobem un 0,27% de trirradials, un 0,13% de tetrarradials i un 0,4% de gaps.

Encara que de les aberracions de tipus cromosòmic en trobem més, la freqüència de les aberracions cromatídiques també és elevada. Això és degut a que el Busulfan és un agent alquilant. El fàrmac es situa entremig de la doble hèlix de ADN i quan aquesta se separa, per replicar-se, provoca formació d'enllaços creuats en les hèlix de la doble cadena que interfereixen en la replicació de l'ADN. És a dir, és un mutagen S-dependent.

Com que afecta a una part concreta de la cadena d'ADN, només causa errors en aquesta part quan la hèlix es condensa per formar el cromosoma. Això provoca que les aberracions de tipus cromatídic siguin més abundants.



Anell (a dalt) i cromosoma sa (a sota)



Cromosoma amb gap (a l'esquerra) i cromosoma sa

### III.4.2. Anàlisi estadística

Per analitzar millor els resultats obtinguts hem utilitzat la prova de Kruskal-Wallis, un test estadístic que ens permet comparar els tres tractaments realitzats i establir si les diferències obtingudes són o no significatives.

Considerarem que sí ho són (i per tant, acceptarem les nostres hipòtesis) si obtenim una probabilitat d'equivocar-nos, acceptant la hipòtesi que si hi ha diferències, inferior al 0.05 (5%), donada per aquest test. Aquest test és un test no paramètric que és menys precís que els tests paramètrics. No hem pogut utilitzar un test paramètric degut a que el nombre de dades i la distribució de tractaments del nostre experiment no s'ajustaven a les condicions exigides per aquests tests (nombre de dades recollides i normalitat de les dades).

Així, la variable que hem analitzat estadísticament és el quocient entre cada tipus d'aberració i el número de cromosomes. Aplicant la fórmula per calcular el paràmetre H del test de Kruskal-Wallis, hem obtingut els següents resultats:

#### Kruskal-Wallis Formula

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

**n** = nº d'observacions

**R** = suma de rangs

**H** = valor resultant que s'ha de comparar amb la distribució chi-quadrada

Acèntric	Dicèntric	Tricèntric	Tetracèntric	Gap	Anell	Trirradial	Tetrarradial	Extra	Total d'anomalies
5.82	3.51	5.39	0.00	2.0 2	4.17	0.05	0.65	2.96	5.82

Comparant aquests valors de H amb els valors corresponents de la distribució Chi-quadrat per n-1 graus de llibertat (en el nostre cas: 2) i per a un error  $\alpha$  (probabilitat d'equivocar-nos si acceptem la hipòtesi que hi ha diferències significatives) de 0,05, observem que per a què les diferències observades haguessin estat significatives hauríem d'haver obtingut valors iguals o superiors a 5.99. Degut en part a la escassetat i la distribució desigual de les mostres del nostre experiment, molts dels valors obtinguts són bastant inferiors a 5.99, raó per la qual no podem afirmar que les diferències obtingudes siguin significatives en el cas dels cromosomes dicèntrics, tetracèntrics, gap, anells, estructures trirradials i tetrarradials i cromosomes extra.

En el cas dels resultats obtinguts en els cromosomes acèntrics, tricèntrics i en el nombre total d'anomalies els valors s'acosten bastant més a 5.99, raó per la qual podem considerar que les diferències entre els tres tractaments en aquests paràmetres marginalment significatives.

Tenint en compte que els tests no paramètrics són molt menys sensibles que els tests paramètrics equivalents (en aquest cas una anàlisi de la variança), aquests resultats ens reafirmen en una de les respostes a les nostres hipòtesis: els tractaments presenten diferents mutacions cromosòmiques depenent del tipus de mutagen a que són exposats i que aquestes mutacions són de diferent intensitat i freqüència en funció de la dosi de mutagen a la qual s'ha exposat.

## **IV. CONCLUSIONS**

En acabar el nostre treball, hem arribat a les següents conclusions:

1. Hi ha una major proporció de mutacions per metafase i per quantitat de cromosomes amb la dosi de 5Gy (un 56,79% del total de mutacions analitzades) en comparació amb la dosi de 3 Gy (39,17%) i la mostra tractada amb Busulfan (4,06%). Tot i així, degut als resultats obtinguts estadísticament no podem confirmar totalment la nostra primera hipòtesi, ja que els resultats del test de Kruskal-Wallis indiquen que algunes diferències no són significatives i altres només ho són marginalment (probabilitat de cometre error acceptant la hipòtesi lleugerament superior a 0,05).
2. Les mutacions produïdes per les dues dosis de radiació són molt superiors a les produïdes pel Busulfan. Això és degut que hem utilitzat una dosi i concentració estàndard de Busulfan per a tractaments mèdics contra el càncer, pensada expressament per a que el dany a l'ADN sigui el mínim possible. En canvi, les dosis de radiació gamma a les quals s'han exposat les mostres són superiors a les utilitzades en les tècniques de radioteràpia.
3. En les mostres irradiades hem obtingut una major quantitat de cromosomes acèntrics, dicèntrics, tricèntrics, tetracèntrics i anells que no pas en les mostres tractades amb Busulfan. Això és degut a que la radiació ionitzant és un mutagen S-independent, cosa que provoca que el tipus d'aberracions cromosòmiques que causa siguin majoritàriament de tipus cromosòmic (que afecten a tot el cromosoma).
4. A les mostres tractades amb Busulfan les aberracions cromatídiques (estructures trirradials, tetrarradials i gaps) són més abundants que no pas a les mostres irradiades. Això és degut a que el Busulfan és un mutagen S-dependent, i la seva actuació consisteix en l'alquilació d'una petita sèrie de nucleòtids concrets d'ADN. En la fase S del cicle cel·lular és quan se separen les dues fibres de les hèlix de l'ADN i és en aquest moment en el que es produeixen les aberracions cromosòmiques.

Tot i així hem observat una major presència de cromosomes acèntrics i dicèntrics de l'esperada ja que són aberracions de tipus cromosòmic. Pensem que ha estat degut a l'atzar.

D'aquesta manera, comprovem que la nostra segona hipòtesi (les mutacions són de diferent intensitat i freqüència en funció de la dosi de mutagen a la qual s'ha exposat) també es confirma.

## **V. VALORACIÓ CRÍTICA**

De tota manera aquests resultats són limitats degut a que només hem pogut treballar amb mostres sanguínies d'un individu, en una única ocasió i sense un grup control amb el qual comparar els resultats. Tampoc hem tingut en compte les característiques individuals de la persona (edat, sexe, possibles malalties genètiques...) de la qual hem extret la mostra. Per aquests motius els nostres resultats no són plenament generalitzables .

## VII. REFERÈNCIES I FONTS D'INFORMACIÓ CONSULTADES

- Scielo, *Alteraciones cromosómicas en linfocitos humanos inducidas por rayos X* [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332002000300003](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332002000300003) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Agencia para substàncies tòxiques y el registro de enfermedades, *Radiación ionizante* [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts149.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts149.html) ToxFAQs™ - (Ionizing Radiation) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Google Books, Llibre UPC *rayos y sus efectos biológicos* [https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=Q5vG3UIIYm4C&oi=fnd&pg=PA17&defidq=radiaci%C3%B3n+ionizante+rayos&ots=8TEYGHLL--y&sig=oqlqJRT7aPDJcC32\\_M2PEznenOA#v=onepage&q&f=true](https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=Q5vG3UIIYm4C&oi=fnd&pg=PA17&defidq=radiaci%C3%B3n+ionizante+rayos&ots=8TEYGHLL--y&sig=oqlqJRT7aPDJcC32_M2PEznenOA#v=onepage&q&f=true) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Radiobiología Universidad de Málaga, Nieves Alegre Bayo, *Radiobiología: rayos ionizantes* [http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/Radiobiologia/Revista/Numeros/RB1\(2001\)9-11.pdf](http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/Radiobiologia/Revista/Numeros/RB1(2001)9-11.pdf) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Researchgate, Bernardo Fontal, Llibre espectre electromagnètic i aplicacions [https://www.researchgate.net/profile/Bernardo\\_Fontal2/publication/228871821\\_El\\_Espectro\\_Electromagnetico\\_y\\_sus\\_Aplicaciones/links/59946c10aca272ec9087f8bb/El-Espectro-Electromagnetico-y-sus-Aplicaciones.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Bernardo_Fontal2/publication/228871821_El_Espectro_Electromagnetico_y_sus_Aplicaciones/links/59946c10aca272ec9087f8bb/El-Espectro-Electromagnetico-y-sus-Aplicaciones.pdf) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Pediamecum, *busulfan* <http://pediamecum.es/busulfan/> [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- International Atomic Energy Agency, López Iturbe Ma. del Rosario, Valiarino-Kelly Teresita y Morales Ramírez Pedro, *Inferencia de algunos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del busulfan, mediante el análisis de su cinética de inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados de Busufan* <http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/Public/33/013/33013260.pdf> [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Scielo, C. M. Cabrera Morales; M. A. López-Nevot, *Radiació ionizant* [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-48352006000700003](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000700003) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Instituto Nacional del Cáncer, *definición de alquilante* <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/alquilante> [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Berta Torrents i Andrea Portero, *Què és la radiació?* <https://sites.google.com/site/elscucsinfinit/introduccio/ii-3-marc-teoric/7> [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Institut Obert de Catalunya, Marta Abad Boveda, *Radiacions ionitzants* [https://ioc.xtec.cat/materials/FP/Materials/1954\\_PRP/PRP\\_1954\\_C03/web/html/media/fp\\_prp\\_c03\\_u7\\_pdfindex.pdf](https://ioc.xtec.cat/materials/FP/Materials/1954_PRP/PRP_1954_C03/web/html/media/fp_prp_c03_u7_pdfindex.pdf) [Consulta: 4 de Juliol de 2018]
- Scielo, Silvana Zanlungo M, Marco Arrese J, Attilio Rigotti R., *Medicina molecular* [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98871999000800014&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98871999000800014&script=sci_arttext&tlng=en) [Consulta: 11 de Juliol de 2018]

- Xunta de Galicia, *cicle cel·lular*  
[http://www.edu.xunta.gal/centros/iespuntacandieira/system/files/10\\_Ciclo\\_y\\_divisi%C3%B3n\\_celulares.pdf](http://www.edu.xunta.gal/centros/iespuntacandieira/system/files/10_Ciclo_y_divisi%C3%B3n_celulares.pdf) [Consulta: 11 de Juliol de 2018]
- DEpartameto de embriología de la Facultad de Medicina de la UNiversidad Nacional Autónoma de México, Marlon De Ita Ley, Guadalupe Sánchez-Bringas, *Fundamentos de ciclo celular y conceptos básicos sobre de su regulación*,  
<http://embriologia.facmed.unam.mx/documentos/ciclocelular.pdf>  
[Consulta: 11 de Juliol de 2018]
- Comisión Chilena de Energía Nuclear, *Radiación ionizante*  
[http://www.cchen.cl/mediateca/PDF/folletos2015/02\\_Tript\\_Rad\\_Ionizante.pdf](http://www.cchen.cl/mediateca/PDF/folletos2015/02_Tript_Rad_Ionizante.pdf)  
[Consulta: 13 de Juliol de 2018]
- Universidad de Navarra, *Radiaciones ionizantes*,  
[http://www.unavarra.es/digitalAssets/146/146686\\_100000Radiaciones-ionizantes.pdf](http://www.unavarra.es/digitalAssets/146/146686_100000Radiaciones-ionizantes.pdf)  
[Consulta: 13 de Juliol de 2018]
- Leonardo David Lomanto Díaz, *El ciclo cel·lular*  
[https://www.biologia.bio.br/curso/r616\\_ae\\_c1.pdf](https://www.biologia.bio.br/curso/r616_ae_c1.pdf)  
[Consulta: 15 de Juliol de 2018]
- Universidad Nacional Autónoma de México, *Ciclo Cel·lular*  
<https://biologiamyblog.files.wordpress.com/2016/03/ciclo-celular.pdf>  
[Consulta: 15 de Juliol de 2018]
- Marlon De Ita Ley, Guadalupe Sánchez-Bringas, *Fundamentos de ciclo celular y conceptos básicos sobre de su regulación*  
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://embriologia.facmed.unam.mx/documentos/ciclocelular.pdf> [Consulta: 15 de Juliol de 2018]
- Llibre upc  
[https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=Q5vG3UIIYm4C&oi=fnd&pg=PA17&dq=radiaci%C3%B3n+ionizante+rayos&ots=8TEYGHLY&sig=oqlqJRT7aPDJcC32\\_M2PEznenOA#v=onepage&q&f=true](https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=Q5vG3UIIYm4C&oi=fnd&pg=PA17&dq=radiaci%C3%B3n+ionizante+rayos&ots=8TEYGHLY&sig=oqlqJRT7aPDJcC32_M2PEznenOA#v=onepage&q&f=true) [Consulta: 18 de Juliol de 2018]
- Nieves Alegre Bayo, *radiobiología* [http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/Radiobiologia/Revista/Numeros/RB1\(2001\)9-11.pdf](http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/Radiobiologia/Revista/Numeros/RB1(2001)9-11.pdf)  
[Consulta: 18 de Juliol de 2018]
- Llibre espectre electromagnètic i aplicacions  
[https://www.researchgate.net/profile/Bernardo\\_Fontal2/publication/228871821\\_El\\_Espectro\\_Electromagnetico\\_y\\_sus\\_Aplicaciones/links/59946c10aca272ec9087f8bb/El-Espectro-Electromagnetico-y-sus-Aplicaciones.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Bernardo_Fontal2/publication/228871821_El_Espectro_Electromagnetico_y_sus_Aplicaciones/links/59946c10aca272ec9087f8bb/El-Espectro-Electromagnetico-y-sus-Aplicaciones.pdf) [Consulta: 18 de Juliol de 2018]
- Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., *limfocits*  
<https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/3659/linfocito-t-cd4>  
[Consulta: 19 de Juliol de 2018]
- *Emidio Lascano, Observación de cromosomas* <https://slideplayer.es/slide/2373386/#>  
[Consulta: 6 d'Agost de 2018]



- Neutrofilos, <https://www.neutrofilos.top/> [Consulta: 7 d'Agost de 2018]
- Eosinofilos, <https://www.eosinofilos.info/> [Consulta: 7 d'Agost de 2018]
- Monocitos, <https://www.monocitos.org/> [Consulta: 7 d'Agost de 2018]
- Leucocitos, <http://leucocitos.org/linfocitos/> [Consulta: 7 d'Agost de 2018]
- Maria lluisa, *El sistema immunitari* <http://blocs.xtec.cat/marialluisa/files/2013/07/1.-El-sistema-immunitari.pdf> [Consulta: 7 d'Agost de 2018]
- file:///C:/Users/usuario/Desktop/TdR%20Cromosomes/bioquimicaharper.pdf [Consulta: 9 d'Agost de 2018]
- Immunologia:  
<http://blocs.xtec.cat/marafapremiademar/files/2012/10/2.04.Immunologia.pdf>  
[Consulta: 9 d'Agost de 2018]
- American association for Cancer Research, invetigació Leucocits humans, *Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes*,  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/20/4/462.short>, [16 d'Agost de 2018]
- Cayman chemical, *Product Information Busulfan*  
<https://www.caymanchem.com/pdfs/14843.pdf>, [16 d'Agost de 2018]
- Thermofisher, RPMI Media 1640
- <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/rpmi.html>, [16 d'Agost de 2018]
- Sigma-Aldrich, *L-Glutamine in Cell Culture*, <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glutamine.html>, [16 d'Agost de 2018].
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios,  
[https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/56465/56465\\_ft.pdf](https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/56465/56465_ft.pdf) , [16 d'Agost de 2018]
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios,  
[https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/p/56029/Prospecto\\_56029.html](https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/p/56029/Prospecto_56029.html), [16 d'Agost de 2018]
- Thermofisher, *Colcemid*, <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15212012>, [16 d'Agost de 2018]
- University of Pittsburgh Medical Center, United States ,*Medios de cultivo celular: una revisión*, Medis de cultiu, <http://www.labome.es/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>, [16 d'Agost de 2018]
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, *Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas*,[http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/301a400/ntp\\_354.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/301a400/ntp_354.pdf), [Consulta: 23 d'Agost de 2018]
- XTEC Blocs, *Genètica molecular*  
<http://blocs.xtec.cat/marafapremiademar/files/2012/10/3.03.Gen%C3%A8ticamolecular.pdf> , [Consulta: 23 d'Agost de 2018]
- Tesis Doctorales en Red, Silvia Puerto Navarro,  
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3847/spn1de2.pdf?sequence=1>  
,[Consulta: 23 d'Agost de 2018]

- Khan Academy, *Mecanismos moleculares de la replicación del ADN*, <https://es.khanacademy.org/science/biology/ADN-as-the-genetic-material/ADN-replication/a/molecular-mechanism-of-ADN-replication> [Consulta: 23 d'Agost de 2018]
- Khan Academy, *Reguladores del ciclo celular*, <https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/cell-cycle-regulators/> , [Consulta: 23 d'Agost de 2018]
- Canavos, George C.; *Probabilidad y estadística aplicaciones y métodos*, 1988, México, McGRAW-HILL.
- Tymoczko, John L.; Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; *Bioquímica: Curso básico*, 2014, Basuri, Editorial Reverté.
- Tymoczko, John L.; Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; *Bioquímica con aplicaciones clínicas*, 2016, Espanya, Editorial Reverté, Séptima edición, Volumen II.
- Hardin, Jeff; Bertoni, Gregory; *Becker's world of the cell*, 2016, The United States of America, Pearson, Ninth edition.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; *Farmacología*, 2000, Barcelona, Ediciones Harcourt S. A., Cuarta edición.
- Burton, Denis R.; Riott, Ivan M.; Delves, Peter J.; Martin, Seamus J.; *Riott's Essential Immunology*, 2017, Chichester, Wiley Blackwell, Thirteenth Edition.
- Owen, Juthith A.; Punnt, Jenni; Stranford, Sharon A.; *Kuby Immunología*, 2013, China, McGraw Hill Education, Séptima edición.
- Aramburu Ortega, Xavier; Jorba Bisbal, Jaume; *Las Radiaciones ionizantes : utilización y riesgos*, 1996, Barcelona, Edicions Universitat Politècnica de Catalunya, Volúmenes I y II.
- *Biología 1 BTX*, 2016, Barcelona, Santillana, Sèrie Observa
- Behl, Christian; Ziegler, Christine; *SpringerBriefs in Molecular Medicine*, 2014, Heidelberg, Springer.

Mathews, Lesley A; Cabarcas, Stephanie M.; Hurt, Elaine; . Dexheimer, Thomas S.; *ADN Repair of Cancer Stem Cells*, 2013, Netherlands, Springer.

- Cummings, Michael R.; *Human Heredity*, 2016, Boston, Cengage Learning.
- Strachan, Tom; Read, Andrew P; *Genética Humana*, 2006, México, McGraw Hill Interamericana editores, Tercera edición.

## **VIII. ANNEX**

### **ANÀLISI DEL TOTAL D'ABERRACIONS CROMOSÒMIQUES PER TIPUS DE MUTAGEN**

<b>Aberracions cromosòmiques totals produïdes pels tres mutàgens emprats</b>			
En 3Gy	En 5Gy	En Busulfan	En total
338	490	35	338+490+35 = 863

Per representar la taula en percentatges hem de tenir en compte que el número total d'aberracions produïdes pels tres mutàgens és de 863 aberracions. Aquesta xifra simbolitza el 100 %, per tant, a través de la proporcionalitat podem extreure els percentatges que representa cada mutagen respecte el nombre total d'aberracions cromosòmiques. Així que:

En 3Gy:  $338 \cdot 100863 = 39,17\%$  En Busulfan:  $35 \cdot 100863 = 4,06\%$

En 5Gy:  $490 \cdot 100863 = 56,79\%$

Com que les aberracions cromosòmiques engloben diferents mutacions que es poden produir en els cromosomes, per poder comparar les resultats d'aquestes en diferents mutàgens tornarem a necessitar elaborar percentatges per, més tard, representar els resultats en les gràfiques.

Per fer-ho utilitzarem el mateix mètode de proporcionalitat tenint en compte que el total de número d'aberracions cromosòmiques en cada mutagen està representat en diferents tants per cents. Per tant:

<b>Tipus d'aberracions cromosòmiques en 3Gy (338 → 39,17%)</b>							
Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Trirradials	Tetrarradials
299	107	6	1	30	8	1	0

Acèntrics:  $299 \cdot 39,17338 = 26,54\%$

Gap:  $30 \cdot 39,17338 = 3,48\%$

Dicèntrics:  $107 \cdot 39,17338 = 12,4\%$

Anells:  $8 \cdot 39,17338 = 0,93\%$

Tricèntrics:  $6 \cdot 39,17338 = 0,7\%$

Trirradials:  $1 \cdot 39,17338 = 0,12\%$

Tetracèntrics:  $1 \cdot 39,17338 = 0,12\%$

Tetrarradials:  $0 \cdot 39,17338 = 0\%$

<b>Tipus d'aberracions cromosòmiques en 5Gy (490 → 56.79%)</b>							
Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Trirradials	Tetrarradials
412	174	15	1	6	10	5	2

Acèntrics:  $412 \cdot 56,79490 = 47,75\%$

Gap:  $6 \cdot 56,79490 = 0,7\%$

Dicèntrics:  $174 \cdot 56,79490 = 20,17\%$

Anells:  $10 \cdot 56,79490 = 0,1,16\%$

Tricèntrics:  $15 \cdot 56,79490 = 1,74\%$

Trirradials:  $5 \cdot 56,79490 = 0,58\%$

Tetracèntrics:  $1 \cdot 56,79490 = 0,12\%$

Tetrarradials:  $2 \cdot 56,79490 = 0,0.23\%$

<b>Tipus d'aberracions cromosòmiques en Busulfan (35 → 4,06%)</b>							
Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Trirradials	Tetrarradials
22	16	0	0	3	1	2	1

Acèntrics:  $22 \cdot 4,0635 = 2,55\%$

Gap:  $3 \cdot 4,0635 = 0,35\%$

Dicèntrics:  $16 \cdot 4,0635 = 1,86\%$

Anells:  $1 \cdot 4,0145 = 0,12\%$

Tricèntrics:  $0 \cdot 4,0635 = 0\%$

Trirradials:  $2 \cdot 4,0635 = 0,23\%$

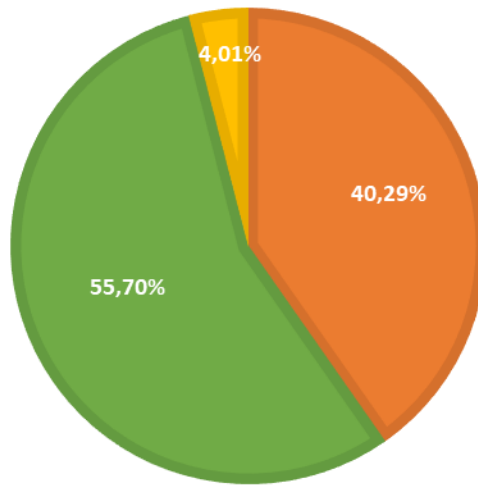
Tetracèntrics:  $0 \cdot 4,0635 = 0\%$

Tetrarradials:  $1 \cdot 4,0635 = 0,12\%$

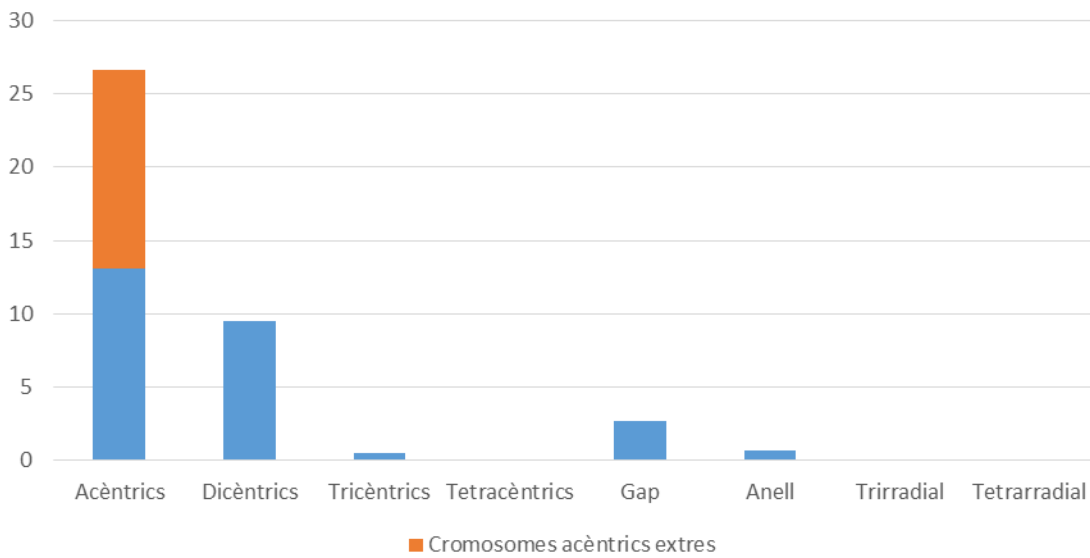
A partir dels percentatges obtinguts en cada modalitat de mutació dins del mutagen corresponent, elaborem les gràfiques que ens permetran comparar els resultats finals.

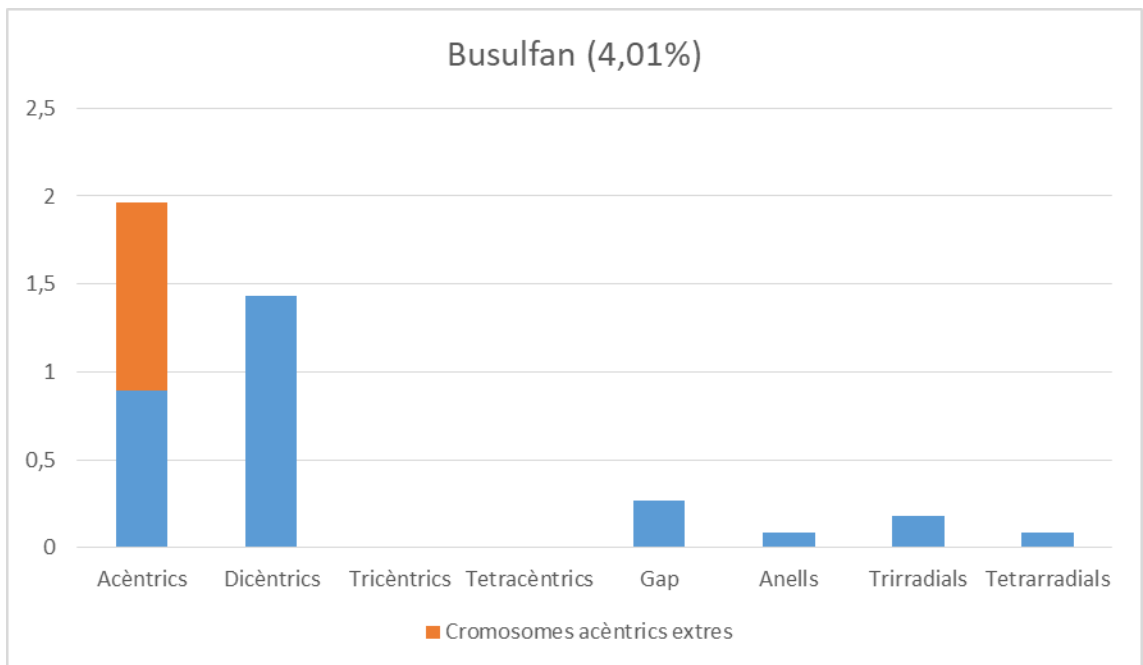
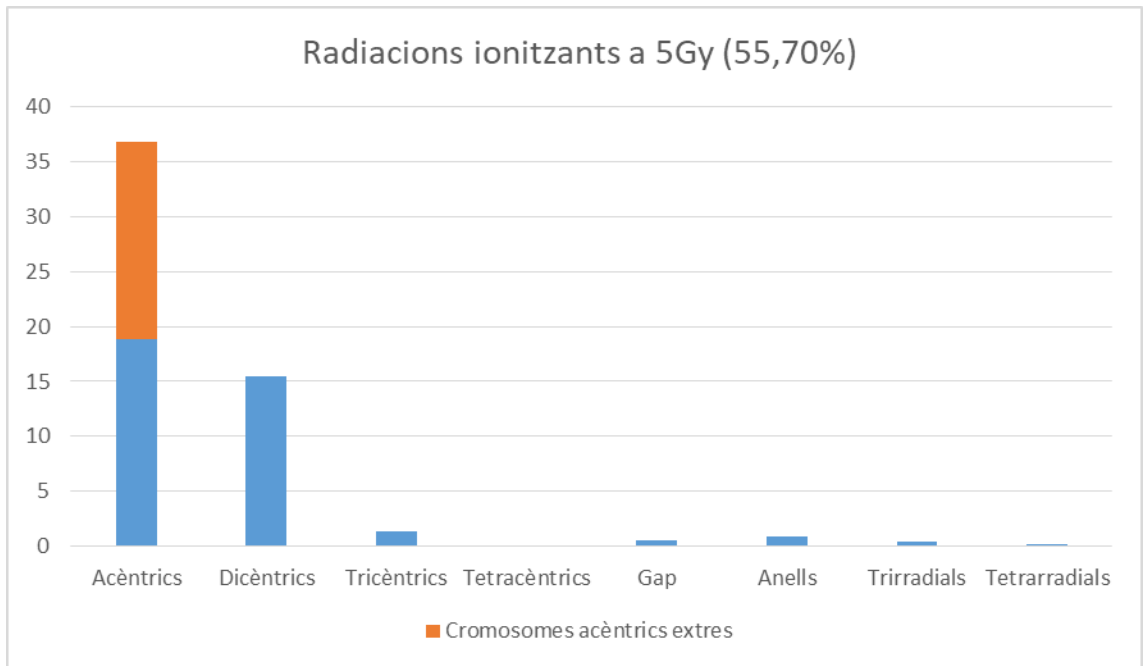
## NÚMERO TOTAL D'ABERRACIONS CROMOSÒMIQUES

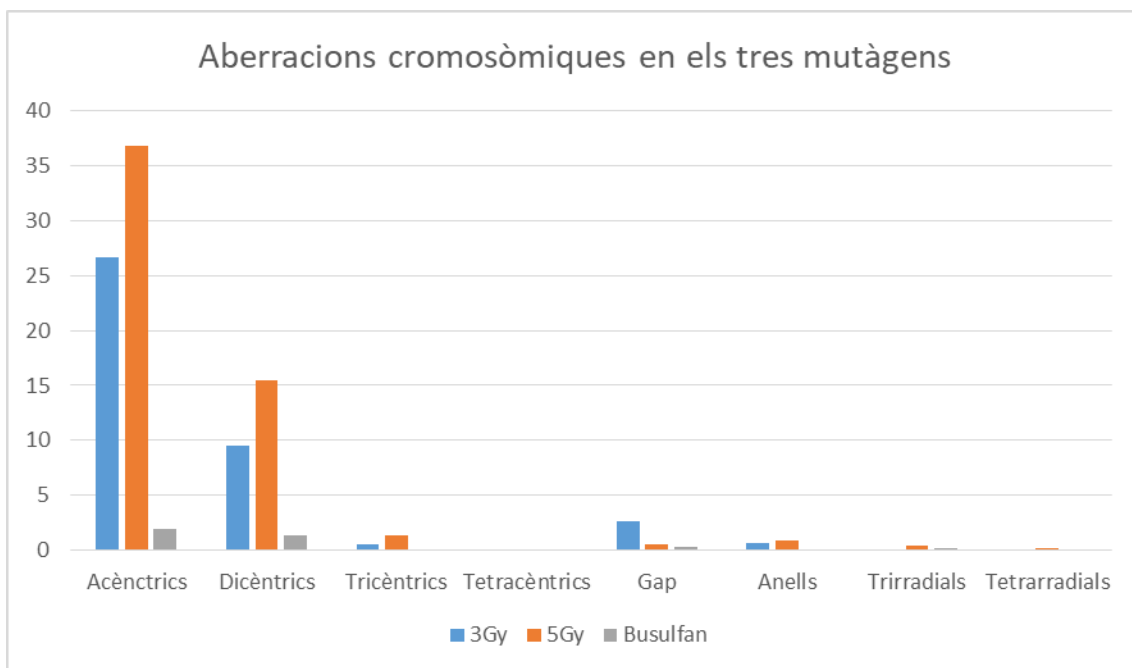
■ 3 Gy ■ 5 Gy ■ Busulfan



## Radacions ionitzants a 3Gy (40,29%)







**PERCENTATGES PER TOTAL DE CROMOSOMES**

Mutàgen	Cromosomes analitzats	Mitjana de cromosomes per metafase	Percentatge d'aberracions sobre el total de cromosomes d'un mateix mutàgen								Percentatge de cromosomes extra (acèntrics que no corresponen a dicèntrics, tricèntrics o tetracèntrics)	Percentatge cromosomes sense aberracions
			Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntrics	Gap	Anells	Estructures trirradials	Estructures tetrarradials		
3Gy	5768	45.7778	5.1838%	1.8551%	0.1040%	0.0173%	0.5201%	0.1387%	0.0173%	0%	3.0687	94.1401%
5Gy	4324	46.0000	9.5282%	4.0241%	0.3469%	0.0231%	0.1388%	0.2313%	0.1156%	0.0463%	4.7410	88.6679%
Busulfan	754	44.3529	2.9178%	2.1220%	0%	0%	0.3979%	0.1326%	0.2653%	0.1326%	1.5915	95.3581%

## TAULA ANÀLISI ESTADÍSTICA Kruskal Wallis

	Acèntrics	Dicèntrics	Tricèntrics	Tetracèntric	Gap	Anells	Trirradials	Tetrradial	Extra	Anomalies
3Gy Porta 1	0,087 <b>(10)</b>	0,012 <b>(3)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,002 <b>(8.5)</b>	0,006 <b>(11)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,075 <b>(12)</b>	0,095 <b>(10)</b>
3Gy Porta 2	0,048 <b>(6)</b>	0,019 <b>(5)</b>	0,001 <b>(10)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,006 <b>(10)</b>	0,001 <b>(8.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,026 <b>(7)</b>	0,055 <b>(6)</b>
	<b>T: 16</b>	<b>T: 8</b>	<b>T: 15</b>	<b>T:13</b>	<b>T:18.5</b>	<b>T: 19.5</b>	<b>T:10</b>	<b>T: 11</b>	<b>T: 19</b>	<b>T: 16</b>
5Gy Porta 1	0,098 <b>(12)</b>	0,043 <b>(11)</b>	0,002 <b>(11)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,001 <b>(7)</b>	0,004 <b>(10)</b>	0,002 <b>(10)</b>	0,001 <b>(11)</b>	0,051 <b>(9)</b>	0,106 <b>(12)</b>
5Gy Porta 2	0,093 <b>(11)</b>	0,038 <b>(10)</b>	0,005 <b>(12)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,002 <b>(8.5)</b>	0,001 <b>(8.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,044 <b>(8)</b>	0,097 <b>(11)</b>
	<b>T: 23</b>	<b>T: 21</b>	<b>T:23</b>	<b>T: 13</b>	<b>T: 15.5</b>	<b>T: 18.5</b>	<b>T: 15</b>	<b>T:16.5</b>	<b>T:17</b>	<b>T: 23</b>
Busul fan porta 1	0,064 <b>(8)</b>	0,000 <b>(1.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,064 <b>(10)</b>	0,064 <b>(8)</b>
Busul fan porta 2	0,018 <b>(1)</b>	0,014 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,009 <b>(11)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,005 <b>(11)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,005 <b>(5)</b>	0,032 <b>(2)</b>
Busul fan porta 3	0,037 <b>(5)</b>	0,022 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,015 <b>(6)</b>	0,037 <b>(3)</b>
Busul fan porta 5	0,031 <b>(3)</b>	0,031 <b>(8)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,000 <b>(2.5)</b>	0,031 <b>(1)</b>
Busul fan porta 6	0,022 <b>(2)</b>	0,022 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,022 <b>(12)</b>	0,000 <b>(2.5)</b>	0,043 <b>(4)</b>



Busul fan porta 7	0,056 <b>(7)</b>	0,056 <b>(12)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,000 <b>(2.5)</b>	0,056 <b>(7)</b>
Busul fan porta 8	0,033 <b>(4)</b>	0,033 <b>(9)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,011 <b>(12)</b>	0,000 <b>(4)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,000 <b>(2.5)</b>	0,044 <b>(5)</b>
Busul fan porta 9	0,066 <b>(9)</b>	0,000 <b>(1.5)</b>	0,000 <b>(5)</b>	0,000 <b>(6.5)</b>	0,000 <b>(3.5)</b>	0,011 <b>(12)</b>	0,011 <b>(12)</b>	0,000 <b>(5.5)</b>	0,066 <b>(11)</b>	0,088 <b>(9)</b>
	<b>TOT.: 39</b>	<b>TOT.: 49</b>	<b>TOT.: 40</b>	<b>TOT.: 52</b>	<b>TOT.: 44</b>	<b>TOT.: 40</b>	<b>TOT.: 53</b>	<b>TOT.: 50.5</b>	<b>TOT.: 42</b>	<b>TOT.: 39</b>

