

Treball de Recerca
IES. Màrius Torres

PENDRE EL SOL SENSE DEIXAR-HI LA PELL



Alumna: Marta Cosano Serra
Curs: 2n Batxillerat D curs 2012-2013
Modalitat: Científic
Tutora: Montse Perpinyà

ÍNDEX

1.- INTRODUCCIÓ.....	4
2.- OBJECTIUS.....	6
3.- MATERIAL I MÈTODES.....	7

Seguretat i higiene

EXPERIMENTACIÓ

3.1.- Mostres: Incubació de les cèl·lules.....	7
❖ <i>PROTOCOL 1: Congelació Cèl·lules</i>	
❖ <i>PROTOCOL 2: Preparació Medi</i>	
3.2.- Irradiació amb UV i control de la viabilitat.....	9
3.2.1. Experiment 1	
❖ <i>PROTOCOL 3: Cristall Violeta</i>	
3.2.2. Experiment 2	
3.2.3. Experiment 3	
3.2.4. Experiment 4	
3.2.5. Experiment 5	
3.3 .- Irradiació amb UV i control de DNA.....	12
3.3.1. Experiment 9	
3.4. Irradiació amb UV amb crema protectora i control de la viabilitat.....	
3.4.1.Experiment 6	
3.4.2. Experiment 10	
3.4.3. Experiment 11	
3.5. Irradiació amb UV amb crema protectora i control de DNA	
3.5.1.Experiment 7	
❖ <i>PROTOCOL 4: Lisi de cèl·lules per a Western Blot</i>	
3.5.2. Experiment 8	

4.- ANÀLISIS DELS RESULTATS	24
4.1.- Irradiació amb UV i control de la viabilitat (3.2.).....	24
4.2.- Irradiació amb UV i control de DNA (3.3.).....	25
4.3.-Irradiació amb UV amb crema protectora i control de la viabilitat(3.4.).....	25
4.4.- Irradiació amb UV amb crema protectora i control de DNA(3.5.)	26
5.- CONCLUSIONS.....	30
6.- AGRAÏMENTS.....	32
7.- BIBLIO-WEBGRAFIA.....	33

8.-ANNEXES

Annexe 1. Seguretat i higiene (*Riscos al laboratori de cultius cel·lulars*)

Annexe 2. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, ACS Publications (2012). Article. *Photoprotective Potencial of Strawberry*

Annexe 3. EXPERIMENTAL DERMATOLOGY (2003) *Oxidative and premature skin ageing*

Annexe 4. *PHOTODERMATOLOGY, PHOTOIMMUNOLOGY &PHOTOMEDICINE (2011). UVA-activated synthesis of metalloproteinases 1,3 and 9 is prevented by a broad-spectrum sunscreen.*

Annexe 5. *Imatges de confluència*

Annexe 6. Vídeo pràcticWestern

Annexe 7. La Mañana (29/11/2012). *Estudian los beneficios de los alimentos según la genética individual. Profesor de la Udl. Manuel Portero-Otin*

1. INTRODUCCIÓ

Tant lluny que veia el treball de recerca quan me'l comentaven a primer de batxillerat i ara ja hi sóc escrivint-lo.

En un primer moment, quan ens van preguntar el tema a tractar ja sabia que el volia fer relacionat amb la biologia., però al moment de decidir-me pel tema va ser tot un calvari. La meva primera intenció va ser fallida, ja que volia fer la recerca sobre els perfums i les cremes antienvelliment...volia relacionar-ho amb els món dels cosmètics, però encara no tenia cap hipòtesi.

Vaig navegar per internet buscant nous arguments pel treball. Pretenia trobar quins factors influeixen en l'envelliment cel·lular, així com investigar l'efectivitat dels medicaments, cosmètics i aliments oxidants sobre aquest procés . Però, no tenia el suport material necessari per realitzar-ho.

La meva tutora, Montse Perpinyà, em va recordar l'anomenat Projecte ITINERA¹.coordinat per l'ICE. Vam enviar la sol·licitud de participació, em van acceptar i vaig passar a tenir com a segon tutor el professor Manuel Portero², de l'IRB de la UdL.

El Professor Portero em va ajudar a definir el camí, rebutjant algunes propostes i proposant-ne d'altres. Respecte a la idea dels cosmètics antienvelliment s'havia de recrear la dermis (com ho fèiem?) i per utilitzar cosmètics havíem de tenir en compte que els cosmètics eren sòlids i els havíem d'aplicar en un medi líquid, el medi de les cèl·lules (com ho aplicàvem?). En conseqüència, varem decidir que utilitzaria cremes protectores solars en cèl·lules irradiades amb UV i comprovaria la seva efectivitat.

La idea de treballar en un laboratori m'agradava. Me'ls imaginava gent seriosa, vestits amb bates blanques, treballant amb ratolins, descobrint nous medicaments per una societat cada vegada més avançada, resultat de llargues hores d'esforç i paciència. I tot estrictament net.

Va arribar finals de juliol i vaig començar a anar al laboratori. La idea d'anar-hi sola, sense la Montse, amb gent que no coneixia, sense saber gairebé què era una pipeta o com es feia una dissolució 1:10, era una tasca que m'assustava. Primer vaig haver de llegir uns articles científics en anglès per conèixer que s'havia fet en aquest camp. Els primers dies anava bastant peix, sort que tenia l'ajut de l'Anna (treballava al centre de biomedicina) i el Guillem (feia les pràctiques de farmàcia al laboratori) que tenien paciència en explica'm cada cosa fil per randa.

¹ Itinera. Projecte que pretén proporcionar a l'alumnat de batxillerat nous coneixements, recursos i eines per a orientar i facilitar l'elaboració del seu treball de recerca. Tanmateix, l'objectiu prioritari del progrma és oferir la possibilitat que l'alumnat pugui dos tutors, la del centre on estudia i un altra de la UdL.(Documentació entregada a l'alumne elegit del projecte Itinera).

² Dr.Manuel Portero-Otín és el professor, investigador i director de NUTREN, el centre de recerca, desenvolupament i transferència tecnològica de la Universitat de Lleida

Des de finals de juliol a principis de setembre hi he anat cada dia de dilluns a divendres. Que m'havia d'imaginar que el treball em portaria tants dies, pensava que em sortiria a la primera i en una setmana ja el tindria acabat; innocent! A finals d'agost, sincerament, se'm feia una mica pesat anar-hi, els amics gaudint a la piscina i jo fent el treball de recerca al laboratori. Els experiments no sortien, els repetia, canviava el procediment i semblava que no obtenia resultats. Buscava a la bibliografia experiments similars.... En definitiva, vaig poder comprovar la frase feta de: “la paciència és la base de la ciència”, quanta raó!

Mentre jo esperava els meus resultats, ajudava a fer els experiments dels altres i alhora aprenia altres coses.



(Centre Biomedicina juliol 2012)

El temps anava passant, em van adjudicar com a “consultor immediat”, dels problemes que em sortien, a l'Omar (noi becari que estudiava al Centre de Biomedicina). En aquest últim període ja vaig començar a tenir bons resultats. Per fi el treball de les darreres últimes setmanes començava a veure la llum. Ja tenia tota la part pràctica acabada, només en calia organitzar tota la informació obtinguda.

Aquí us presento la meua investigació sobre la influencia de les cremes solars en la supervivència les cèl.lules HEK 293 (cèl.lules humanes de ronyó) irradiades amb diferents dosis de UV.

2. OBJECTIUS

Per tots es sabut que el sol és beneficiós, però tots sabem que prendre el sol sense protecció és perjudicial. La pell quan s'exposa a la irradiació ultraviolada del sol fa que la melamina reaccioni i les persones ens tornen morenes, en una exposició incontrolada la pell es fa malbé.

El que m'he proposat principalment ha estat comprovar:

- L'eficàcia de les cremes solars davant els rajos ultraviolats,
- La importància d'una bona protecció alhora de prendre el sol.
- Si protegirà el mateix una crema amb factor de protecció 15 que una altra de 50.
- Si les cèl·lules irradiades, es moren indefectiblement o poden mutar per sobreviure.

Alguns objectius personals que em van portar a fer aquest treball van ser:

- Saber del món de la investigació . Emmarcar el meu treball de recerca dins una vessant científica.
- Participar en un treball de laboratori i alhora admetre errors, criticar i obtenir resultats.
- Aprofitar l'experiència de treballar i adquirir coneixements.
- Conèixer la l'efectivitat real de les cremes protectores, saber si es reduïa a una qüestió de marketing.
- Treballar en un laboratori em podia ajudar a decidir què fer en un futur, què estudiar.



3. MATERIAL I MÈTODES

❖ Seguretat i higiene

Abans de començar a treballar al laboratori hi havia algunes coses que calia saber: els riscos al laboratori, em van donar unes normes que s'havia de seguir. (Veure **annexe 1**) Cal remarcar:

- El ús de campanes³ (**Figura 1.**) per a treballar amb les cèl·lules
- Netejar-les i desinfectar-les- utilitzant lleixiu, etanol i engegant el flux d' UV uns vint minuts- abans i després del seu ús.
- El ús de guants i bata.



Figura 1.

EXPERIMENTACIÓ

3.1. Mostres: Incubació de les cèl·lules

a). Es va utilitzar les cèl·lules HEK 293 (cèl·lules de ronyó humà) ja que eren més fàcils per a treballar-hi, es reproduïen més fàcilment i eren més difícils de contaminar-se que les cèl·lules de la dermis.

b) Les cèl·lules es trobaven congelades en nitrogen líquid a 0 K.

❖ PROTOCOL 1: CONGELACIÓ DE CÈL·LULES

Per congelar les cèl·lules s'ha d'utilitzar un crioprotector, hi ha de diferents tipus però nosaltres utilitzarem el DMSO que incorporarem al medi de congelació que està compost per:

-DMEM -P/S
-5%DMSO -20% SÈRUM (FBS (per a L6 i Caco2)) i (BCS (per 3T3)).

1. Preparar el medi de congelació:
 - 1.1. DMEM + P/S
 - 1.2. DMSO
 - 1.3. esperarem una estona a ficar el sèrum, ja que el DMSO genera calor i si l'afegim després del sèrum potser que les proteïnes es desnaturalitzin al afegir el DMSO.
2. Rentarem 3 cops les cèl·lules amb medi sense sèrum.
3. Hi afegirem la Tripsina aprox. 1mL /placa 3'-5' min.

³ Campana de flux laminar. Cabina que utilitza un ventilador per forçar el pas d'aire i així eliminar les partícules d'aire que ens podrien contaminar les cèl·lules.

4. Neutralitzar la tripsina amb medi + sèrum aprox.9mL
5. Homogenitzar bé les cèl·lules amb el pipetor.
6. Un cop tinguem ben homogenitzades les cèl·lules les passarem a un tub de 10mL.
7. Centrifugarem i propagarem 1:5 a 1000rpm.
8. Eliminarem el sobrenadant amb una pipeta Pasteur (aspirant el medi) sense tocar el residu que quedi a baix.
9. Afegir 1.5mL de medi de congelació per cada tub.
10. Resuspndre les cèl·lules en el medi de congelació i barrejar-ho tot.
11. Aliquotar els tubs de congelació(taronges, 1.5m/tub). Els tubs han d'estar prèviament etiquetats amb "Tipus cel·lular, pas on es troben, grup de treball i data".
12. Posar els tubs amb una caixa blanca de forexpan plena de papers i ficar-ho al congelador -80°C (aprox. 24h), això es fa perquè les cèl·lules vagin perdent temperatura poc a poc, preparant-les per ser congelades amb nitrogen líquid.
13. Passades les 24 hores, congelarem els viells amb nitrogen líquid.
14. Es aconsellable assegurar-nos que el procés està bé, que no hi hagin aglutinacions i no es morin moltes cèl·lules, per això al cap d'uns dies descongelarem una al·liqüota i comprovarem la seva eficàcia..

c) Les varem descongelaren i varem cultivar amb el següent medi:.

❖ PROTOCOL 2:PREPARACIÓ MEDI

Per preparar el cultiu es va necessitar:

- 500ml medi DMEM⁴(*dulbecco's modified eagle's medium*), que porta 4'5 g/L de glucosa
- 5ml de P/S (penicilina i streptomicina són els antibiòtics)
- 5ml de L-glutamina
- 10% de suero FBS (per poder fer el 10% trèiem 50ml de medi de cultiu DMEM i afegim 50ml de FBS).



d)Aleshores, les cèl·lules amb el cultiu es distribueixen en plaques que es posen a l'incubador (**Figura 2.**)

e)Als incubadors hi ha les condicions necessàries, 37° C i 5% de CO₂. S'espera el temps necessari (1 o 2 dies) i un cop tenen la confluència⁵ necessària, es pot experimentar

Figura 2. Incubador

⁴ DMEM. Mitjà de cultiu que conté básicamente MEM. El que usavam conté Phenol red (indicador de PH), vitamines, aminoàcís i glucosa. Útil per la majoria de cèl·lules.

⁵ Confluència. Quantitat de cèl·lules d'una placa. Per exemple, quan hi ha una confluència del 80% (es calcula a ull), es fa un pase, d'una placa se'n divideix a d'altres.(**Veure annex 5**)

3.2. Irradició amb UV i control de la viabilitat

3.2.1. Experiment 1

a) En primer lloc necessitàvem saber el temps just abans de la mort de les cèl·lules. (veure **Taula 1**) Les cèl·lules control ens serveixen per a comparar amb les que estan irradiades, les control han d'estar vives, si no ho estan; les cèl·lules irradiades no s'han mort pels rajos UV sinó per altres causes. En tot experiment sempre s'ha de tenir un control que ens donarà seguretat a l'experiment.

Irradiades al microones UV Stratalinker 1800					
Temps d'irradiació	Control (0'')	10''	40''	60''	Amb tapa
Medi	MEM				
Després	Sense incubació				

Taula 1.

b) Un cop irradiades varem fer la prova Cristall violeta i posant-ho al espectrofotòmetre⁶ miràvem la viabilitat de les cèl·lules.

❖ PROTOCOL 3: CRISTALL VIOLETA

Per a placa de 24 pous:

Rentar amb PBS 1ml/pou

- Addicionar 250µl de cristall violeta per pou
- Incubar 20 minuts
- Rentar amb aigua 2 vegades 1ml/pou
- Afegir 500µl SDS 1% a cada pou
- Llegir a una absorbància de 595nm
- * SDS (dodecilsulfat sòdic), per desnaturalitzar les proteïnes



El primer resultat ens va sortir que totes les cèl·lules estaven vives. Per tant, al pròxim experiment, s'havia d'irradiar-les més temps.

3.2.2. Experiment 2

El medi que utilitzàvem al irradiar les cèl·lules era MEM, que era transparent perquè no conté phenol red. Aquest cop, però, ens varem oblidar de canviar-ho i les varem irradiar amb DMEM, que era de color vermell. Es van irradiar al microones de rajos UV amb temps de 10', 5', 2' i les control (veure **Taula 2** i **Figura 4**).

Irradiades al microones UV Stratalinker 1800					
Temps d'irradiació	Control (0'')	2'	5'	10'	Amb tapa
Medi	DMEM				
Després	Sense incubació				

Taula 2.

⁶ Espectòmetre. Aparell que serveix per mesurar, generalment, l'intensitat de la llum



Es va fer el control cristall violeta i van sobreviure totes, no semblava que les haguéssim irradiat. Ens varem suposar que potser el phenol red del DMEM les protegia dels rajos UV.

Figura 4. MEM i DMEM

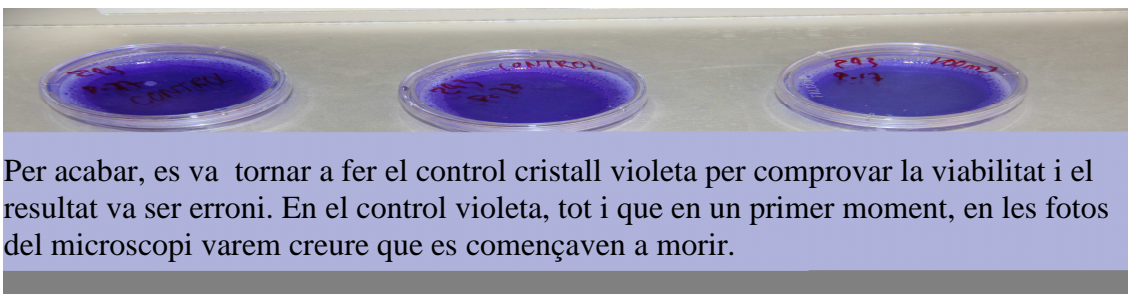
3.2.3. Experiment 3

Vist els anteriors experiments en aquest intent varem irradiar-les en temps més llargs, amb MEM (el medi transparent) i varem treure la tapa de les plaques (potser la tapa les protegia), també es va cobrir les tapes amb paper de transparències.

Quan treballes amb les cèl·lules s'utilitza unes campanes. Abans i després del seu ús per a desinfectar-les, s'irradien amb rajos UV. Varem utilitzar aquesta capacitat per a irradiar les nostres cèl·lules.

Irradiades a la campana						
Temps d'irradiació	Control (0'')	10'	15'	20'	25'	Sense tapa, amb paper de transparències
Medi	MEM					
Després	Sense incubació					

Taula 3.



Per acabar, es va tornar a fer el control cristall violeta per comprovar la viabilitat i el resultat va ser erroni. En el control violeta, tot i que en un primer moment, en les fotos del microscopi varem creure que es començaven a morir.

Figura 5. Control cristall Violeta.

En la figura 7 hi ha algunes cèl·lules que estan de diferent color en comparació amb la resta, estan blanques, aquestes estan mortes. Tot i així n'hi ha molt poques com per dir que s'han mort per irradiació.

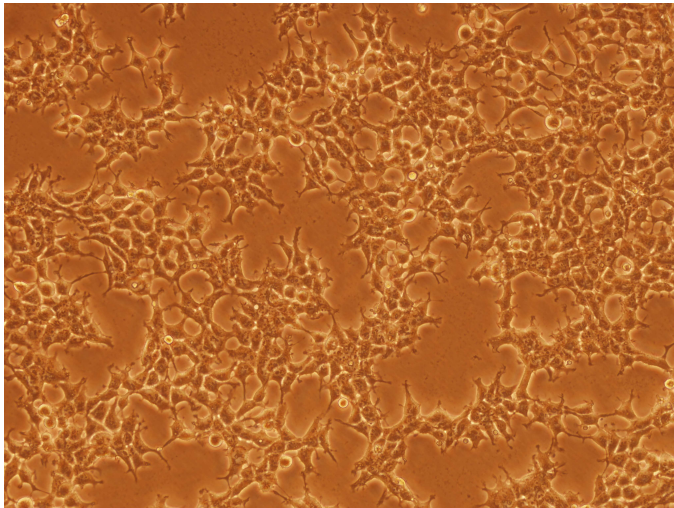


Figura 6.Control

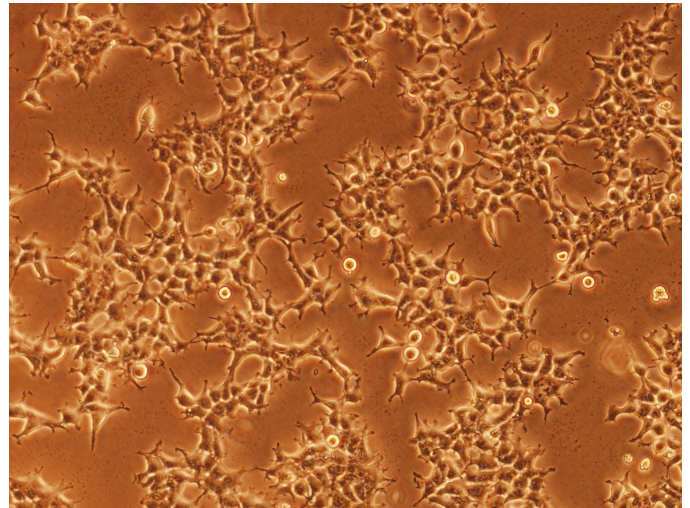


Figura 7. 25' d'irradiació

3.2.4. Experiment 4

Ja que en els altres experiments les cèl·lules ens van sobreviure, en aquest experiment varem irradiar-les més estona, ho varem tornar a fer a la campana -creiem que el microones de rajos UV no anava bé perquè no ens matava les cèl·lules, en aquell moment és el que buscàvem-, sense medi de cultiu i amb tapa. Les varem irradiar 2h, 1h i 30'. Ens varem oblidar de fer un control.(veieu **Taula 4**)

Irradiades a la campana				
Temps d'irradiació	30'	1h	2h	Amb tapa
Medi	Sense medi			
Després	1h d'incubació			

Taula 4.

A continuació, varem deixar les cèl·lules irradiades una hora als incubadors, poder la mort de les cèl·lules no era immediata.

Per acabar, varem fer el cristall violeta i no varem tenir els resultats desitjats, no es van morir

3.2.5. Experiment 5

Es va tornar a repetir el experiment 4, aquest cop amb cèl·lules control.(veieu **Taula 5**)

Taula 5.

Irradiades a la campana					
Temps d'irradiació	Control (0'')	30'	1h	2h	Amb tapa
Medi	Sense medi				
Després	1h d'incubació				

Per últim es va fer la prova cristall violeta i el resultat que ens va sortir era que en les cèl·lules irradiades mitja hora tenien menys viabilitat que les irradiades dos hores. No va sortir el que esperavem i no sabem que va passar. Pot ser que sigui error alhora de sembrar les cèl·lules (que hi haguessin més cèl·lules al pou on s'ha fet la incubació de les dos hores...)ja que hem repetit les mateixes condicions que l'Experiment 4 i a l'Experiment 4 no ens va sortir bons resultats, no les vam matar. Haguèssim estat bé que s'haguessin fet resistents a les radiacions UV.

3.3 Irradiació amb UV i control de DNA

3.3.1. Experiment 9



En aquest experiment es va canviar el microones, a partir d'ara s'utilitzaria el microones UV Strtalinker 2400. El microones que s'estava utilitzant fins ara (UV Stratalinker 1800) no es podia calcular la potencia la qual s'irradiava, es feia amb "time mode", ara el microones que s'utilitzaria es podia posar el milijoules amb els quals irradiàvem.

Figura 8. Microones UV.Strtalinker

Aquest cop irradiàvem les cèl·lules sense tapa, les cobríem amb unes enganxines (veure **Fig.9**) que vàrem encomanar i es comptava les cèl·lules abans de irradiar-les amb la càmera Neubauer⁷.(veure **Fig. 10**)

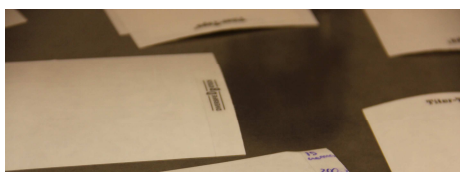


Figura 9. Enganxines 1



Figura 10. Càmera de Neubauer

Irradiades al microones UV Stratalinker 2400							
Energia d'irradiació	Control	Control	100mJ/cm ²	200mJ/cm ²	500mJ/cm	999mJ/cm ²	Sense tapa, amb les enganxines
Medi	MEM						
Després	24h d'incubació						

A la fi, a simple vista s'observa que a la placa de 999 mJ les cèl·lules floten molt més, per tant, estan mortes i a la de 500 mJ algunes també floten. Varem canviar el medi transparent (MEM) hi varem posar el DMEM.

⁷ Càmera Neubauer .Instrument utilitzat per fer un recorte de cèl·lules en un medi líquid, en el meu cas el cultiu.

Després de 24 hores incubant, les cèl·lules irradiades a 100 mJ es comprova que s'han mort poques, 200 mJ una mica més i de 500 i 999 mJ no en queden cap i al control estan vives totes. En altres paraules, ens han sortit bons resultats.

En la figura 11 es veu com en un control, en una placa no irradiada, hi ha moltes cèl·lules.

En la figura 12 hi ha molt poques cèl·lules que viuen després de irradiar-les a 999mJ i deixar-ho incubar.



Figura11. Control

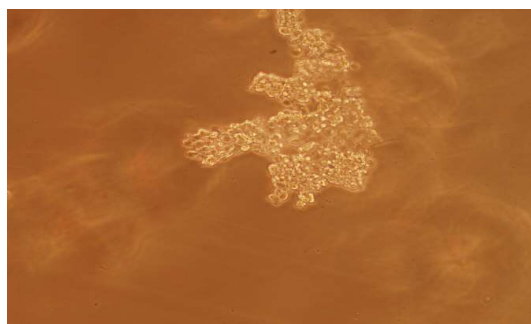


Figura12. 999mJ

No varem fer un control cristall violeta; varem posar DAPI, que tenyien el nucli de les cèl·lules i així podem mirar quina forma té el nucli. Segons la forma podem saber si és apoptosi, necrosi o no, ja que el nucli té una forma característica. Els nuclis tenyits han de flotar i han de ser com a puntejats, això vol dir que hi hagué apoptosi o necrosi; se'n diu **condensació nuclear**. Si ha passat una certa estona de l'apoptosi no és marca.

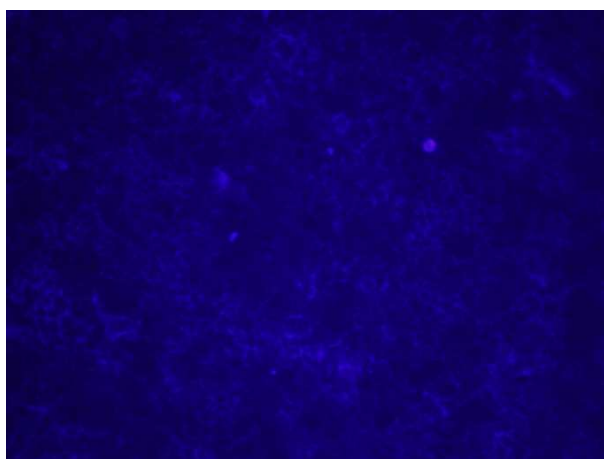


Fig 13: Control

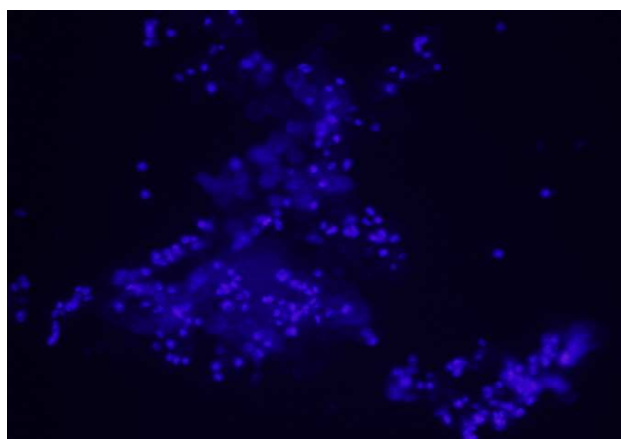


Fig.14: 999mJ

Per últim, varem posar un filtre de color blau de 500nm al microscopi i podem veure el DAPI, que et marca els nuclis. Veiem en les control(veure **Fig.13**) que hi ha molts nuclis (hi ha molt blau) en conseqüent, moltes cèl·lules. En les irradiades a 999mJ(veure **Fig.14**) hi ha molt poques cèl·lules en comparació amb el control, ja que hi ha menys blau. Per saber si aquests pocs nuclis tenen dany al ADN havíem d'haver fet una foto a més ampliació per poder veure si els nuclis estan puntejats. Si el nucli estan puntejats vol dir que hi ha mort (apoptosi o necrosi).

- **Apoptosi:** la cèl·lula sap que està danyada, és una mort programada, venen els macròfags i la maten.
- **Necrosi:** la cèl·lula no pot fer res per suïcidar-se. Tot el que hi ha dins la cèl·lula surt al citosol danyant les cèl·lules del cantó. Queden tots de trossets que no es poden recollir, en canvi, a l'apoptosi els trossos s'empaqueten. En la necrosi la cèl·lula es trenca i pot ser perillós.
- Quan es dona la necrosi o l'apoptosi, pot produir-se la **pícnosi**. A la pícnosi el volum del nucli es redueix, en efecte de la pèrdua de materials del nucli i de la condensació de la cromatina residual.

3.4. Irradiació amb UV amb crema protectora i control de la viabilitat

3.4.1. Experiment 6

Irradiades al microones UV Stratalinker 1800								
	Sense crema					Crema solar de 50		
Temps d'irradiació	Control	1'	2.5'	5'	5'	1'	2.5'	5'
Medi	Sense medi				MEM			
Després	4h d'incubació							

Les cèl·lules amb i sense medi van morir. Les cèl·lules sense medi i amb crema de factor 50 van morir perquè no tenien medi, no tenien aliment. Se'ns han mort totes les cèl·lules, les control també, les control no se'ns haurien d'haver mort ja que no han estat irradiades però al no tenir medi se'ns han mort, ja que els hi faltava el seu aliment.

3.4.2. Experiment 10

Convé destacar que en aquest experiment varem sembrar menys, ja que l'últim cop teníem moltes cèl·lules. Alhora de comptar amb la càmera Neubauer agafàvem menys cèl·lules; amb això vull dir que si teníem més cèl·lules que les que necessitàvem dissolíem més.



Figura 15. Comptador de cèl·lules

En aquest moment, ja es va començar a utilitzar la crema de protecció solar de factor 50 i 15(veure **Taula 10**)

Irradiades al microones UV Stratalinker 2400										
	Sense crema			Crema solar de 15			Crema solar de 50			Sense tapa, amb les enganxines transparents
Energia d'irradiació	Control	200mJ/cm ²	500mJ/cm ²	Control	200mJ/cm ²	500mJ/cm ²	Control	200mJ/cm ²	500mJ/cm ²	
Medi	MEM									
Després	24h d'incubació									

Després de 24 hores incubant ja es podia veure a simple vista que les cèl·lules mortes són les que el medi DMEM no ha canviat de color, es troba en color vermell. Les que portaven crema en el moment de la irradiació estan vives, ja que el medi ha canviat de color, es troba en color groc, dit d'una altra manera ha metabolitzat.

Abans de fer el control violeta varem posar DAPI i al mirar-ho al microscopi es veien els nuclis fosforescents, ja que el nucli estava danyat.

Al fer el control violeta vam poder apreciar que les cèl·lules irradiades a 200mJ sense crema tenien menys viabilitat que les control sense crema, les irradiades a 500mJ la majoria havien mort. En canvi, a les cèl·lules que tenien cremes solar hi havia més viabilitat. Hi havia diferència, no gaire gran, entre la crema amb factor de protecció 15 i la de 50.

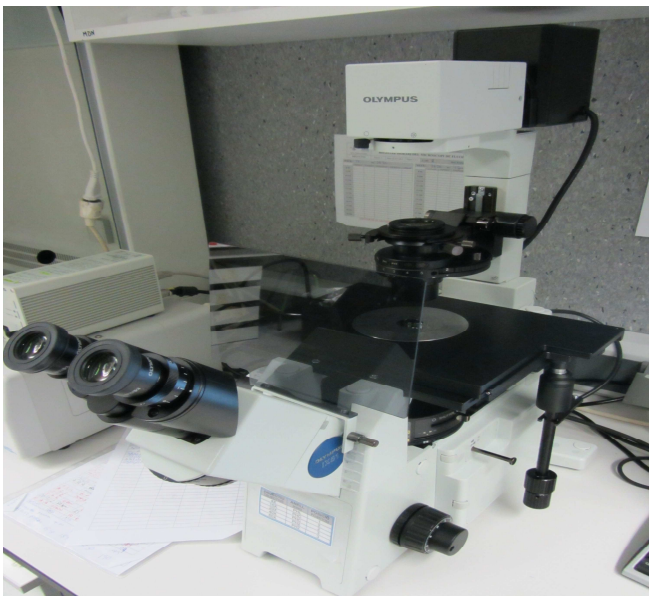


Fig. 15. *Microscopi*

3.4.3. Experiment 11

Abans d'irradiar les cèl·lules ens hem oblidat de canviar el medi, de DMEM a MEM. S'utilitzava les enganxines, és a dir, les plaques no portaven tapa.(veure **Taula 11**)

Irradiades al microones UV Stratalinker 2400										
	Sense crema			Crema solar de 15			Crema solar de 50			Sense tapa, amb les enganxines transparents
Energia d'irradiació	Control	500mJ/cm ²	999mJ/cm ²	Control	500mJ/cm ²	999mJ/cm ²	Control	500mJ/cm ²	999mJ/cm ²	
Medi	DMEM									
Després	24h d'incubació									

Taula 11.

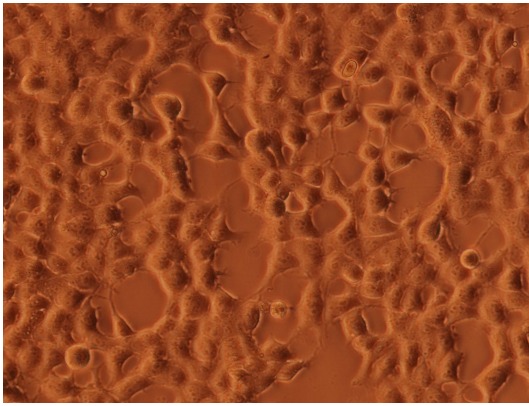
Per acabar l'experiment, les irradiades a més milijoules (999 milijoules) tenien molt poca viabilitat, quasi bé estaven totes mortes.(veure **Fig.18**)

A la mateixa irradiació amb crema de 15 i de 50 hi havia més viabilitat(veure **Fig.21 i 25**), hi havia diferència entre la crema de 50 i la de 15, la de 50 protegia més.

El mateix passava amb les cèl·lules irradiades a 500 sense crema tenien menys viabilitat(veure **Fig 17**)que les control sense crema i alhora més viabilitat que les irradiades a la màxima energia (999 milijoules). En les irradiades amb crema havien sobreviscut moltes més, i hi havia més viabilitat en les cèl·lules irradiades amb crema de 50 que en les irradiades amb la crema de 15.

En comparació amb l'experiment 10, al no canviar el medi adequat per irradiar-les no s'aprecia tanta mort, per exemple en el cas de les cèl·lules irradiades a 500 milijoules, ja que el phenol red del DMEM les ha protegit.

Sense crema



Fig_16_.Control

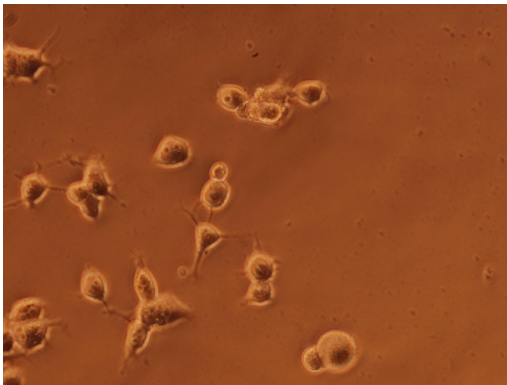


Fig 17. Irradiades a 500mJ

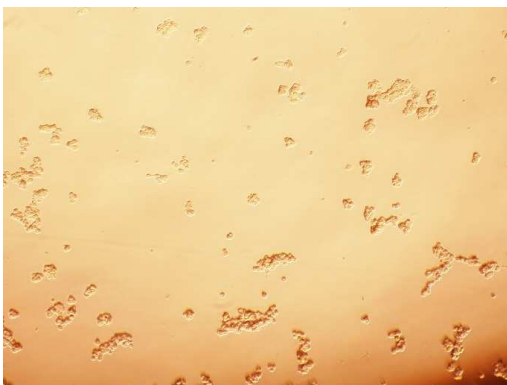


Fig.18. Irradiades a 999mJ

Crema de 15

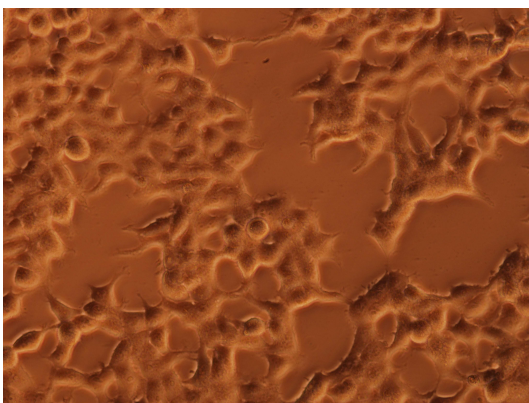


Fig.19.Control crema de 15

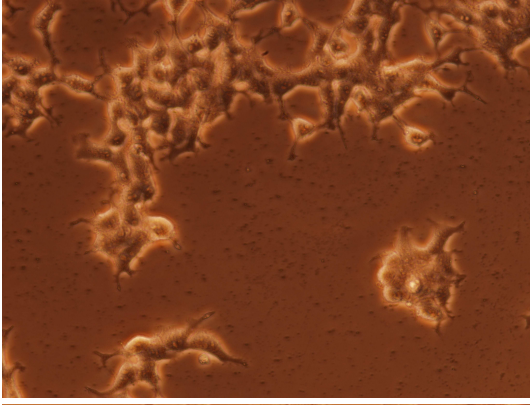


Fig.20. Irradiades a 500mJ amb crema de 15

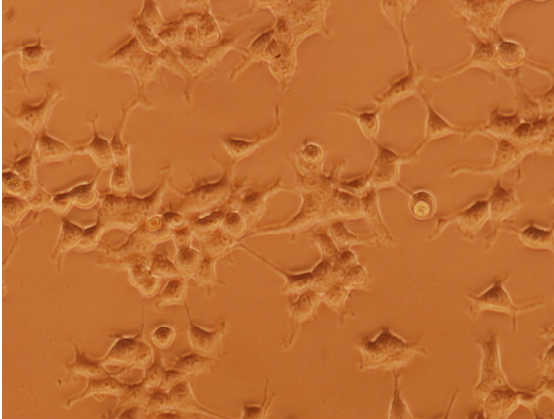


Fig21. Irradiades a 999mJ amb crema de 15

Crema de 50

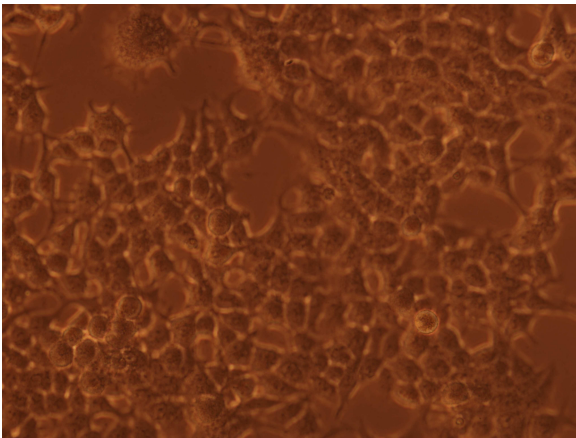
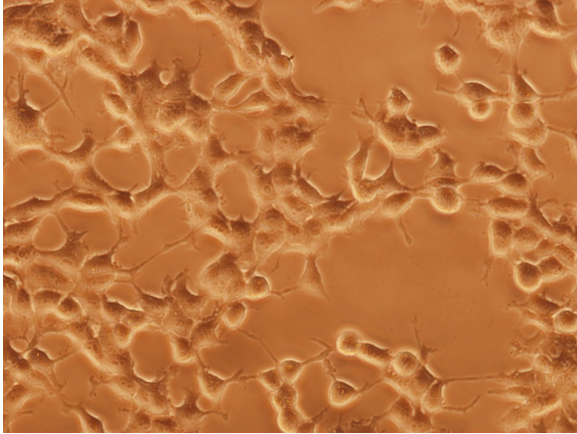


Fig22 Control crema de 50



50

Fig23. Irradiades a 500mJ amb crema de

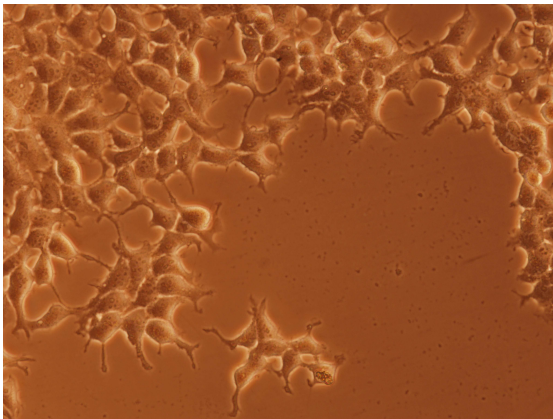


Fig. 24 Irradiades a 999mJ amb crema de 50

3.5. Irradiació amb UV amb crema protectora i control de DNA

3.5.1.Experiment 7

Aquest cop volíem comprovar si hi havia dany al ADN després d' irradiar amb rajos UV, Aquestes proves ens van durar tres dies.

a) En aquest experiment varem utilitzar crema de 50.Posavam la crema cubrint la placa. Varem posar Sòdium ascorbate (vitamina C) i Tocopherol (vitamina E). (veure **Taula 7**)

- El Sòdium ascorbate és una sal de l'àcid ascòrbic(vitamina C). La vitamina C és antioxidant, hidrosoluble i és fotoprotector.

- El Tocopherol actua com a vitamina E. La vitamina E és liposoluble, és a dir, no és soluble en aigua. El Tocopeherol esta d'una determinada manera per a que es pugui dissoldre. A més a més, la vitamina E és antioxidant, així dons, protegeix les cèl·lules de la radiació solar.

b) Per comprovar si hi havia dany al ADN, després d' irradiar amb rajos UV, varem fer:

- primer una lisi cel·lular⁸ i el mètode Bradford⁹.

RESULTAT DEL BRADFORD		Muestra	Azul	Agua	
		1	63,5	25	11,5
		2	71,1	25	3,9
		3	71,5	25	3,5
		4	67,2	25	7,8
		5	64,0	25	11,0
		6	63,1	25	11,9
		7	61,9	25	13,1
		8	48,4	25	26,6
		9	61,3	25	13,7
		10	60,7	25	14,3
		11	64,2	25	10,8
		12	62,4	25	12,6
		13	64,9	25	10,1
		14	70,6	25	4,4

El Bradford ens has servit per igualar la quantitat de proteïna.

El Blau és una sèrie de components per desnaturalitzar les proteïnes i perquè la mostra pugui córrer bé al gel quan fem l' electroforesis en gel (el western blot).

Igualem la quantitat proteïna posant més o menys mostra i igualant amb el volum d'aigua.

- un western blot¹⁰ (veure **Fig. 25 i 26**) Fent el western buscavam una proteïna anomenada gamma-H2AX (una histona), que apareix per reparar el ADN. Veurem el dany del DNA, quant més n'hi hagi, més dany hi haurà. **La proteïna, en aquest cas gamma-H2AX**, es posa en un organisme (per exemple un conill) llavors es crea inmonoglobulines (antirabbit). S'extreu les inmonoglobulines i es posen en un altre organismes que fabricarà anticossos que detectaran les inmonoglobulines del primer organisme.

- Per acabar ho varem posar al Chemidoc, l'aparell per llegir el western, se'ns va cremar el marcador i la proteïna gamma-H2AX no va sortir marcada.

	Sense crema				Crema solar amb factor de protecció 50				Amb tapa
	Control	1'	2.5'	5'	Control	1'	2.5'	5'	
Temps d'irradiació									
Altres plaques amb vitamina C			✓	✓			✓	✓	
Altres plaques amb vitamina E				✓				✓	
Irradiades al microones UV Stratalinker 1800									

⁸ Lisi cel·lular. Primera tècnica per a fer un western.. Consisteix en el trencament de les membranes cel·lulars per mitjà de detergents.

⁹ Bradford. Tècnica per quantificar la quantitat de proteïna i així seguidament poder fer el western i tenir normalitzada la quantitat de proteïna. És a dir, fem el mètode de bradford i ens diu que tenim ug/ul i després normalitzen totes les mostres a la mateixa quantitat per alhora de carregar poder posar la mateixa quantitat de proteïna.

¹⁰ Western Blot. Mètode que serveix per detectar proteïnes específiques a través del seu pes molecular. (veure vídeo Annexe 6)

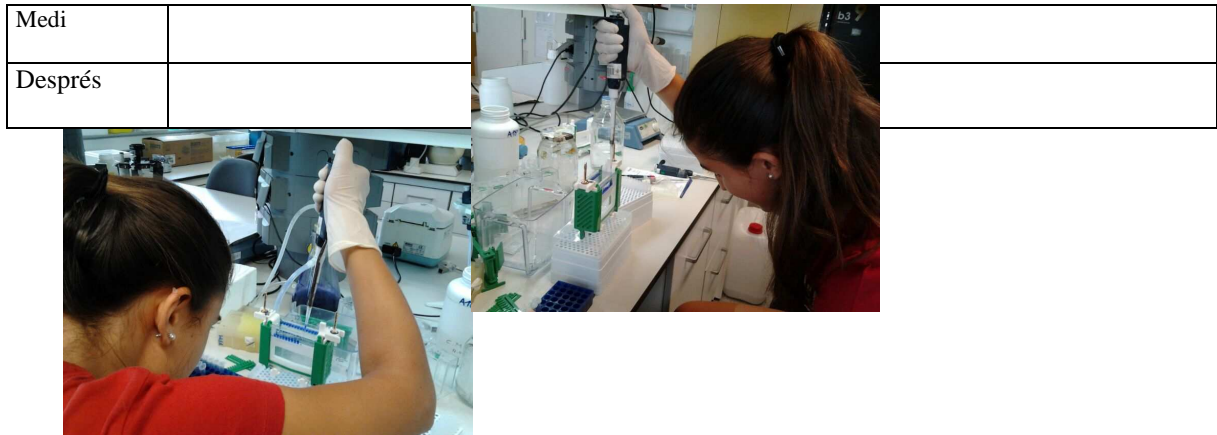


Figura 25 i 26. Western blot

Taula 7.

❖ **PROTOCOL 4: LISI DE CÈL·LULES PER A WESTERN BLOT**

Primer de tot prepararem la solució per a fer els rentats a les cèl·lules i el tampó de lisi: (ho posarem tot amb gel)

Tampó de rentat: PBS (200mL) + NaVO₄ (1mL) ho ficarem amb gel

Tampó de lisi: (per 4 plaques de 6 wells)

10mL RIPA (4°C)

100µL Inhibidors de proteases (-4°C)

50µL NaVO₄ (-4°C) 200mM

20µL NaF (-4°C)

26.6µL DTPAC (-4°C)

10µL BHT 1mM T.A

<p><u>RIPA:</u> (100mL) TRIS (A181)→0.6057G TWEEN →1MI NaCl(A158)→0.8766g EDTA(A71)→0.0372g Deoxycholic Acid →0.25g (A62)</p>
--

Procediment:

1. Agafarem les cèl·lules de cultius i les deixarem a la mateixa placa on estan però les baixarem al laboratori amb un recipient amb gel.
2. Farem de 3 a 4 rentats amb el tampó de PBS i VO₄ i aspirarem el medi.
3. Afegirem el tampó de lisi (350µL/ well, 1.750mL/placa de 10mL).
4. Un cop hem afegir el tampó amb l'espàtula aixecarem les cèl·lules del fons, inclinarem la placa per a recollir millor la mostra i amb la mateixa pipeta ho remenarem una mica per homogeneïtzar-ho millor.
5. Ho recollirem amb un eppendorf, sempre ho tindrem tot amb gel.
6. Sonicarem la mostra, ficarem l'eppendorf a dins d'un vas de precipitat amb gel i ho sonicarem, ja que el sonicador crea escalfor. Ho farem fins que veiem que la mostra es queda d'un color blanquinós.
7. Quant ho tinguem tot fet ja podem quantificar la mostra per mètode Bradford.

Determinació de la quantitat de proteïnes (Mètode Bradford)

Depenent de la quantitat de la mostra homogeneïtzada, serà necessari realitzar una dissolució prèvia a la quantificació de proteïnes per el mètode Bradford.

1. Diluir la mostra homogeneïtzada en agua destil·lada. Segons la mostra es pot fer dissolucions: 1:10, 1:15, 1:20.

2. Preparar corba patró de BSA. Existeix una solució mare de BSA amb una concentració de 0.1 µg/µL

BSA (0.1 µg/µL)	Agua destilada	Concentració (µg/µL)
0 µL	160 µL	0
1 µL	159 µL	0.000625
6 µL	154 µL	0.00375
14 µL	146 µL	0.00875
20 µL	140 µL	0.0125
40 µL	120 µL	0.025

- 160 µL de mostra (1 a 3 µL de mostra a un volumen de 160 µL).
 - 40 µL de reactiu Bradford, agitar con multipipetor.
3. Deixar reaccionar 10 minuts y llegir absorbància 596 nm
4. Quantificar la quantitat de proteïna a la mostra.

❖ WESTERN BLOT

PROCEDIMENT

1.- Preparació dels gels:

- Gel empilador (5%) 6 ml (on posarem el pinte)
 - * Acrilamida: 1ml
 - * SDS (10%): 60 ul
 - * TRIS 0,5M: 1,5 ml
 - * PA (10%): 40 ul
 - * Aigua: 3,4ml
 - * TEMED: 7,5 ul
- Gel separador (10%) 10 ml
 - o Acrilamida: 3,34 ml
 - o TRIS 1,5M: 2,5ml
 - o SDS: 100ul
 - o PA: 80ul
 - o Aigua: 3,96 ml
 - o TEMED: 7,5ul

S'ha de vigilar amb l'acrilamida, perquè és molt tòxica; el PA i TEMED s'han de ficar l'últim perquè sinó és comença a polimeritzar.

2.- Preparam primer el separador

3.- Ho ficarem entre mig dels vidres (aquests segons el gruix que vulguem)

4.- Afegirem isopropanol (2-3ml) per eliminar les possibles bombolles i fer el gel uniforme.

5.- Esperarem 20 minuts.

6.- Treurem l'isopropanol amb paper de filtre.

7.- Afegir l'empilador i ficar el pinte i deixar gelidificar uns 20 minuts (quan estigui el gel mirarem que no quedin bombolles i sino ficarem més empilador.

8.- Preparar i cargar les mostres.

- * Calentar les mostres 3 minuts a 95°C i farem un spinning
- * Carregarem 10-20 ul a cada pouet
- * Carregarem 25 ul de marcador al 1r pouet de cada gel. Quan carreguem ficar running buffer.

9.- Electroforesis:

- * Aproximadament una hora a una intensitat de 15mA/gel
- * 1 hora a una intensitat de 30mA/2 gels
- * Ficarem a la capsa running buffer
- * Pararem l'electroforesis quan la mostra blava arribi abaix de tot.
- * Desmontar els vidres i fer una marca al gel al costat contrari on hem ficat el marcador.

- 10.- Equilibrat de les membranes (ho podem fer mentres es fa l'electroforesis)
 * Rentar les membranes amb metanol reciclat i després amb transfer buffer 1x (a la nevera); 3 cops cada 5 minuts.
 * Marcarem cada una de les membranes (a, b, c, d...)
- 11.- Transferència (Sandwich)
 - Preparar per tallar el gel
 - Agafarem 2 cartrons i 2 esponges i ho ficarem amb remull amb buffer transfer 1x.
 - Sandwich: esponja-cartró-gel-cartró-esponja
 - Ha de coincidir el tall del gel amb el de la membrana.
 - Transferirem durant 1 hora a 100 u independentment si transferim 1o 2 gels.
- 12.- Bloqueig
 - Es realitza amb 15-20ml (BLOK), aproximadament 1 hora.
- 13.- Anticossos primaris
 - Dependrà del que vulguem detectar (mirar els prospectes).
- * La incubació amb l'anticòs primari és pot fer de dos maneres:
 - Parafilm: afegir l'anticòs a la dilució indicada (1ul/membrana)
 Tapar la membrana amb parafilm
 Incubar a 4°C
 - Falcon: dilució (3ml/falcón)
 Tapar amb parafilm
 Incubar a 4°C
- 14.- Rentats: 3x TBST (0,05%) 5 minuts
- 15.- Substrat:
 - Barrejar amb 1:1 luminol (marró) peròxid (blanc)
 - Necessiten 1,5ml de barreja/membrana
 - Deixar reaccionar 5 minuts i exposar el LUMI
- 16.- Lectura:
 - QUEMIDOC
 - Ordenador, mirar el programa "Quantitiy one"
 - Sempre només amb PAST.

3.5.2.Experiment 8

Aquest ens va durar tres dies. Varem preparar sis condicions (veure **Taula 8**) Varem fer una immunohistoquímica.¹¹ on hem posat DAPI (tenyirà el genoma del nucli blau, així veurem els nuclis).-Fen la immunohistoquímica mirariem el danys dels raigs UV-. D'anticòs secundari varem posar la mateixa concentració que l'anticòs primari.

D'anticòs secundari em varem posar en tots els falcons i d'anticòs primari en tots menys en un, per així poder apreciar la inespecificitat de l'anticòs secundari, és a dir, faríem un control a l'anticòs secundari.

Fem la immunohistoquímica volíem veure [la proteïna gamma-H2AX](#) i també [la P53](#).

- Gamma-H2AX és una histona que es troba al nucli, que apareix per reparar el ADN quan esta danyat.
- P53 és una proteïna que s'encarrega de parar el cicle cel·lular quan l'ADN està danyat.
- L'anticòs primari és anti- gammaH2AX i anti-P53. Un anticòs està creat al conill contra gamma-H2AX i els el tenyirà de color vermell. I l'anticòs contra P53 està creat a la rata i els tenyirà de color verd.
- L'anticòs secundari és l'anti-rabbit i anti-mouse.

¹¹ Immunohistoquímica: Procediment que es basa en la utilització anticossos específics, prèviament marcats amb un enzim que farà que siguin visibles quan les irradiem amb llum i ens servirà per a detectar la proteïna que busquem.

Irradiades al microones UV Stratalinker 1800									
	Sense crema				Crema solar amb factor de protecció 50				Amb tapa
Temps d'irradiació	Control	5'	5'	5'	Control	5'	5'	5'	
Altres plaques amb vitamina C			✓				✓		
Altres plaques amb vitamina E				✓				✓	
Medi	MEM								
Després	2h d'incubació								

Taula 8

Per acabar, el resultat no va sortir, varem pensar que era per la inespecificitat de l'anticòs secundari.

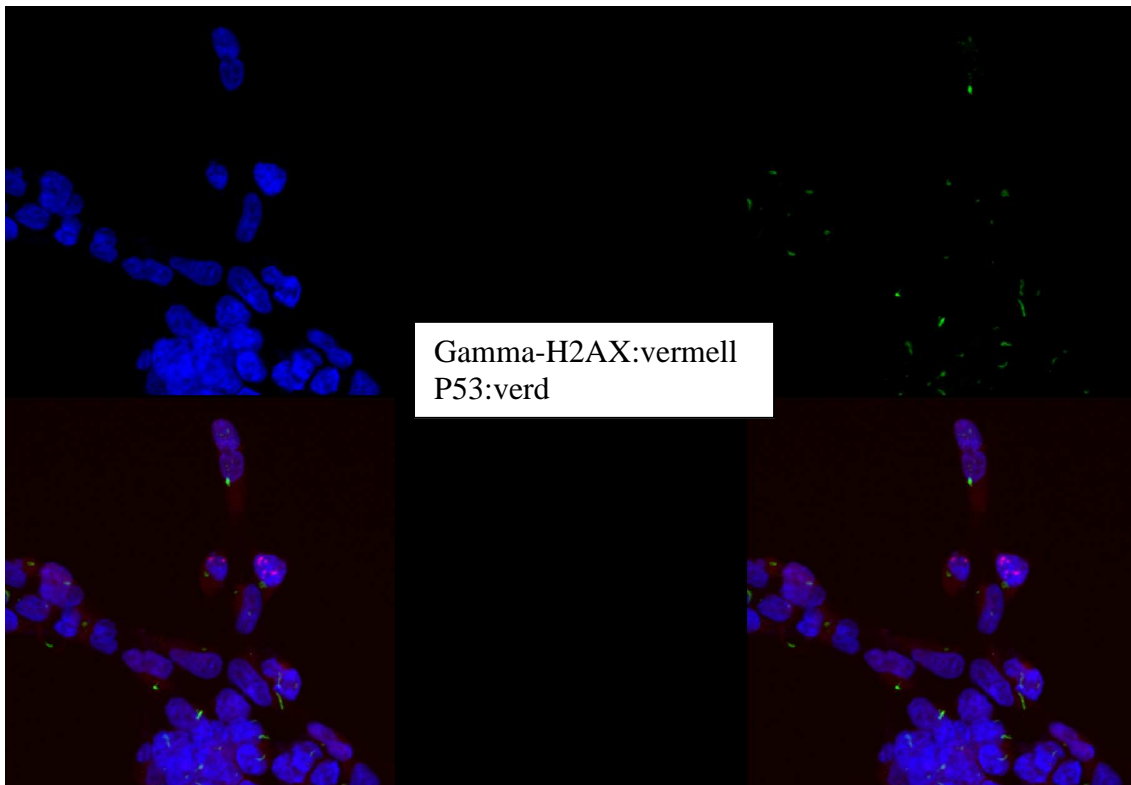


Figura 27: *Vitamina C sense crema*

D'unes mateixes cèl·lules es va fer diferents fotos. Les més importants: la primera, la de color blau (**veure foto a dalt, a l'esquerra**), es marca els nuclis, per així saber on estaran posades les proteïnes que busquem. I les fotos de baix, que són les mateixes, ens surt marcades les proteïnes que busquem. En vermell s'aprecia el gamma-H2AX

però només marca dos cèl·lules (les que estan puntejades de color vermell), només dos cèl·lules tenen dany al ADN. En verd s'aprecia el P53, aquesta proteïna hauria de sortir després del gamma-H2AX, hi ha cèl·lules que no tenen el gamma-H2AX, això no hauria de ser així; les cèl·lules que estiguessin "pintades" de color verd també ho haurien d'estar de vermell. El P53 hauria de sortir puntejat i no ho fa (**veure foto de dalt, a la dreta**)

4. ANÀLISIS DELS RESULTATS

4.1.- Irradiació amb UV i control de la viabilitat (3.2.)

Experiment 1. El primer resultat ens va sortir que totes les cèl·lules estaven vives. Per tant, al pròxim experiment, s'havia d'irradiar-les més temps.

Experiment 2. Es va fer el control cristall violeta i van sobreviure totes, no semblava que les haguéssim irradiat. Ens varem suposar que potser el phenol red del DMEM les protegia dels rajos UV.

Experiment 3.

Per acabar, es va tornar a fer el control cristall violeta per comprovar la viabilitat i el resultat va ser erroni. En el control violeta, tot i que en un primer moment, en les fotos del microscopi varem creure que es començaven a morir.

En la figura 7 hi ha algunes cèl·lules que estan de diferent color en comparació amb la resta, estan blanques, aquestes estan mortes. Tot i així n'hi ha molt poques com per dir que s'han mort per irradiació.

Experiment 4

Per acabar, varem fer el cristall violeta i no varem tenir els resultats desitjats, no es van morir.

Experiment 5

Per últim es va fer la prova cristall violeta i el resultat que ens va sortir era que en les cèl·lules irradiades mitja hora tenien menys viabilitat que les irradiades dos hores. No va sortir el que esperàvem i no sabem que va passar. Pot ser que sigui error alhora de sembrar les cèl·lules (que hi haguessin més cèl·lules al pou on s'ha fet la incubació de les dos hores...)ja que hem repetit les mateixes condicions que l'Experiment 4 i a l'Experiment 4 no ens va sortir bons resultats, no les vam matar. Hagués estat bé que s'haguessin fet resistents a les radiacions UV.

4.2 Irradiació amb UV i control de DNA (3.3.)

Experiment 9

Després de 24 hores incubant, les cèl·lules irradiades a 100mJ es comprova que s'han mort poques, 200 mJ una mica més i de 500 i 999 mJ no en queden cap i al control estan vives totes. En altres paraules, ens han sortit bons resultats .

Per últim, varem posar un filtre de color blau de 500nm al microscopi hi ha més llum, en altres paraules, hi ha més mort en les cèl·lules amb més irradiació.

4.3 Irradiació amb UV amb crema protectora i control de la viabilitat(3.4.)

Experiment 6

A la fi, les cèl·lules amb i sense medi van morir. Les cèl·lules sense medi i amb crema de factor 50 van morir perquè no tenien medi, no tenien aliment.

Experiment 10

Després de 24 hores incubant ja es podia veure a simple vista que les cèl·lules mortes són les que el medi DMEM no ha canviat de color, es troba en color vermell. Les que portaven crema en el moment de la irradiació estan vives, ja que el medi ha canviat de color, es troba en color groc, dit d'una altra manera l' han metabolitzat.

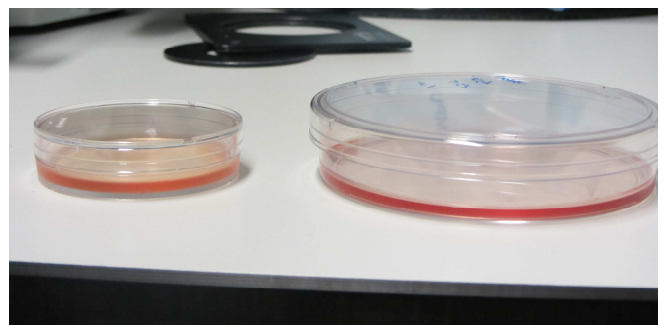


Figura 27 A l'esquerra medi metabolitzat i a la dreta no.

Abans de fer el control violeta varem posar DAPI i al mirar-ho al microscopi es veien els nuclis fosforescents, ja que el nucli estava danyat.

Al fer el control violeta varem poder apreciar que les cèl·lules irradiades a 200mJ sense crema tenien menys viabilitat que les control sense crema, les irradiades a 500mJ la majoria havien mort. En canvi, a les cèl·lules que tenien cremes solar hi havia més viabilitat. Hi havia diferència no gaire gran entre la crema amb factor de protecció 15 i la de 50.

Experiment 11

Per acabar l'experiment, les irradiades a més milijoules (999 milijoules) tenien molt poca viabilitat, quasi bé estaven totes mortes.

A la mateixa irradiació amb crema de 15 i de 50 hi havia més viabilitat, hi havia diferència entre la crema de 50 i la de 15, la de 50 protegia més.

El mateix passava amb les cèl·lules irradiades a 500 milijoules, sense crema tenien menys viabilitat que les control sense crema i alhora més viabilitat que les irradiades a la màxima energia (999 milijoules). En les irradiades amb crema havien sobreviscut moltes més, i hi havia més viabilitat en les cèl·lules irradiades amb crema de 50 que en les irradiades amb la crema de 15.

En comparació amb l'experiment 10, al no canviar el medi adequat per irradiar-les no s'aprecia tanta mort, per exemple en el cas de les cèl·lules irradiades a 500 milijoules, ja que el phenol red del DMEM les ha protegit.

4.4.- Irradiació amb UV amb crema protectora i control de DNA(3.5.)

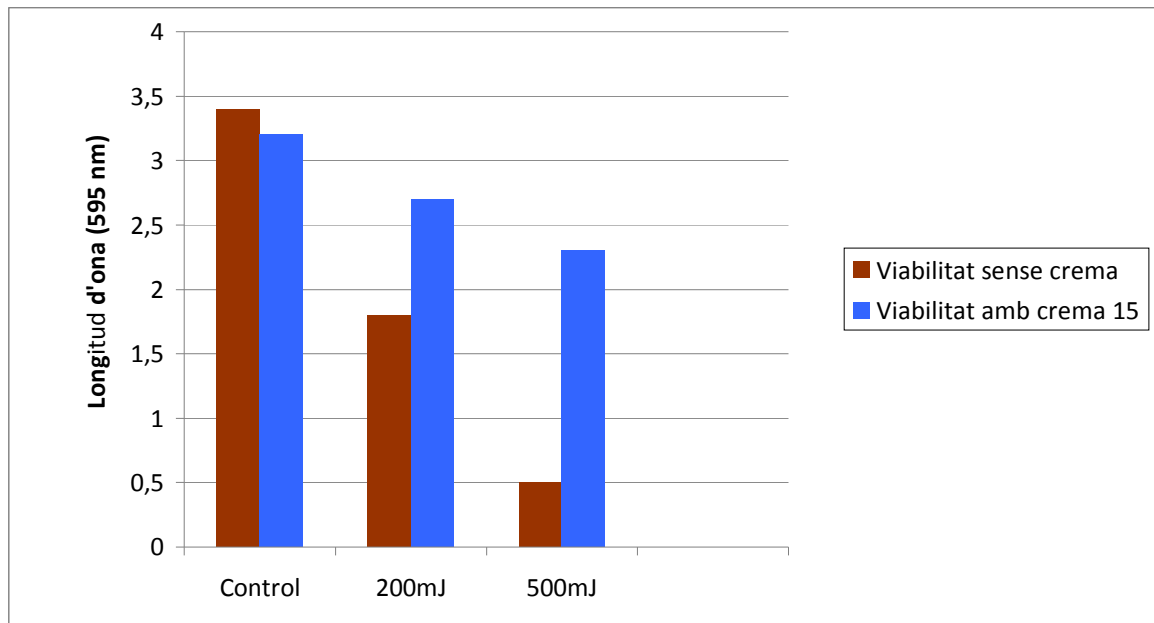
Experiment 7

Se'ns va cremar el marcador i la proteïna gamma-H2AX no va sortir marcada.

Experiment 8

Per acabar, el resultat no va sortir, varem pensar que era per la inespecificitat de l'anticòs secundari.

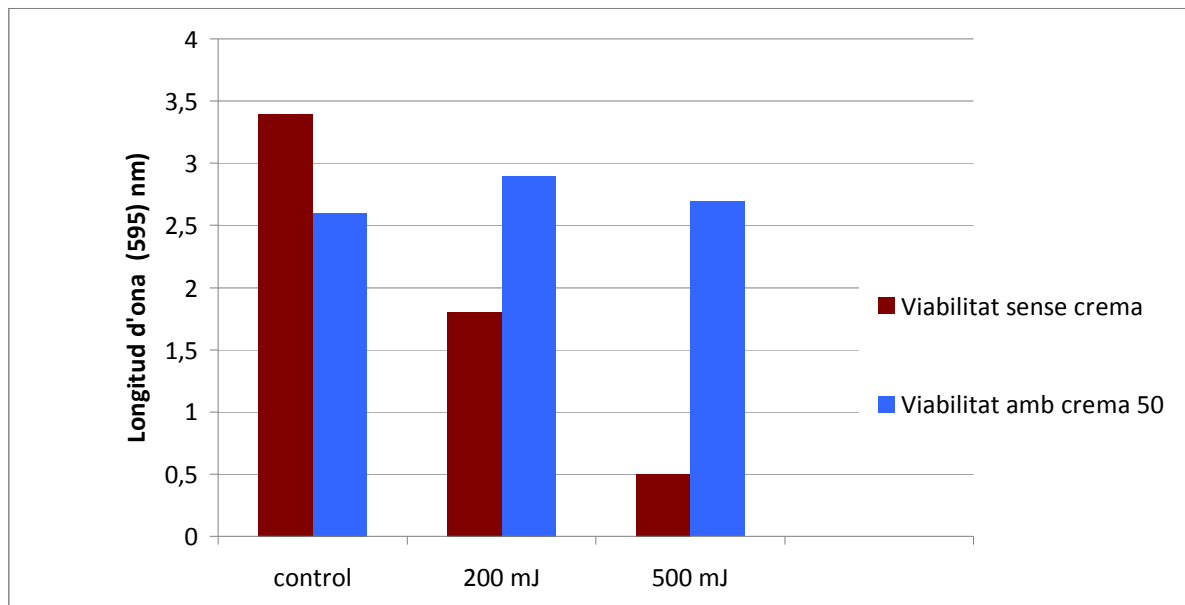
Per concloure, basant-nos en l'experiment 10, que va ser el que va donar millors resultats vaig **realitzar unes gràfiques:**



Gràfica 1.

Gràfica 1: Segons els resultats del control violeta del experiment 10. Quan comparem cèl·lules de ronyó humà irradiades amb crema de factor de protecció solar 15 i sense es pot comprovar com en la màxima irradiació, en aquest cas a 500mJ, hi ha poca viabilitat quan les cèl·lules no estan protegides amb la crema. En canvi, a la mateixa irradiació i amb crema de 15 hi ha molta més viabilitat cel·lular, ja que les protegeix dels raigs UV. El mateix passa quan les irradiem a 200mJ però la diferència entre portar crema i no portar-ne no és tanta com a màxima irradiació.

Al control hi ha més viabilitat en la placa sense crema, pot ser degut a que hi ha més cèl·lules, que al moment de distribuir el medi i les cèl·lules en les plaques aquí n' haguem posat més que en el control amb crema.

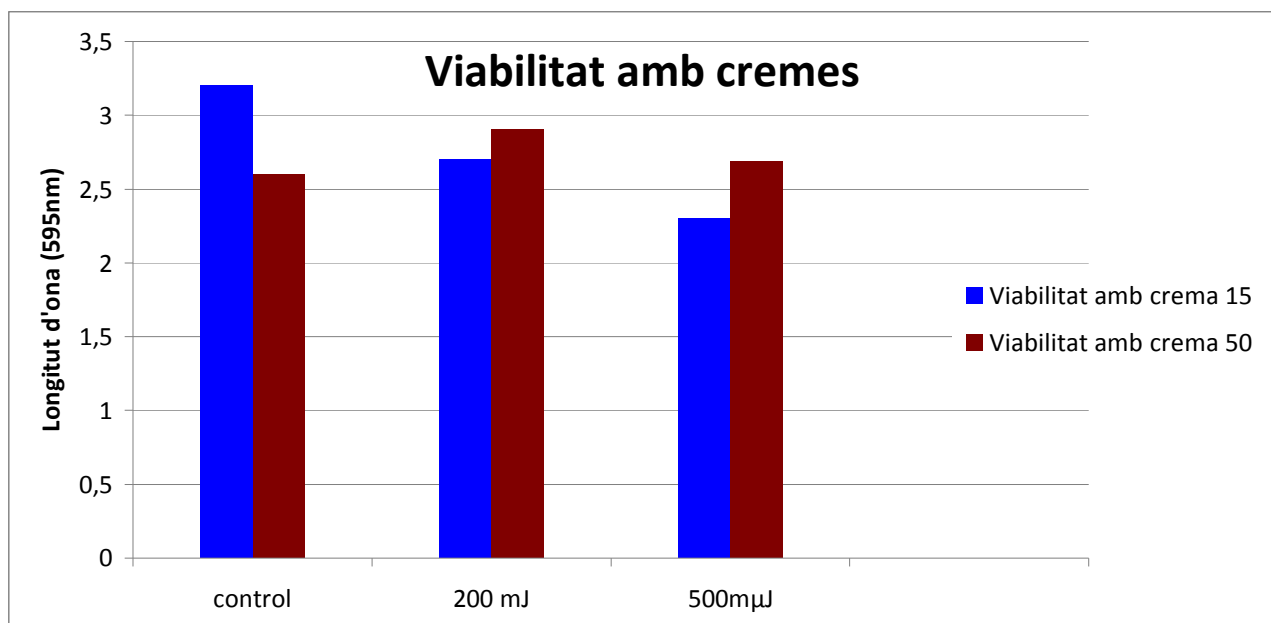


Gràfica 2.

Gràfica 2: Ens torna a passar el mateix que a l'anterior gràfica, però aquest cop amb diferències més notables.

Irradiant a 500 mJ la viabilitat quan les irradiem sense crema és molt baixa, en canvi a la mateixa irradiació amb crema de 50 hi ha molta viabilitat.

En la baixa irradiació a 200mJ sense crema hi ha més viabilitat que a la de 500 mJ; però no tanta com al control. Irradiant a 500 mJ i amb crema hi ha viabilitat que sense crema.



Gràfica 3

Gràfica 3: Comparant les dues cremes, la de 50 i la de 15. En irradiar a 500 mJ la crema de 50 protegeix que la de 15, ja que hi ha més mort a la de 15.

A 200 mJ torna a passar el mateix que a l'altra irradiació, però sense tanta diferència.

En general, a la nostra irradiació i irradiant a les cèl·lules de ronyó humà (HEK 293) no hi ha molta diferència usar-ne una de l'altra.

Que pugui haver menys cèl·lules al control és degut a agafar menys cèl·lules alhora de repartir a les plaques.

Vaig aprofitar els experiments que vaig fer per a comparar-ho amb un problema a la pell quan s'irradia amb el sol: l'eritema, l'envermelliment de la pell. En altres paraules, vaig comparar els milijoules als quals jo irradiava les cèl·lules de ronyó humà amb els milijoules als quals sortia eritema als diferents tipus de pell (molt clara, fosca....)

Els milijoules necessaris per a produir eritema segons el tipus de pell	
Tipus de pell	mJ/cm ²
Pell molt clara(extrasensitiva)	16'8mJ/cm ²
Pell clara(sensitiva)	21 mJ/cm ²
Pell morena clara(normal)	26'25mJ/cm ²
Pell morena fosca (normal)	32'81mJ/cm ²
Pell fosca (insensitiva)	41'02mJ/cm ²
Pell molt fosca (insensitiva)	51'27mJ/cm ²

En els meus experiments irradiava a 100mJ mínim, així que tots els tipus de pell patirien un eritema en la mínima irradiació i en totes les altres.

5.CONCLUSIONS.

Hi havia moments que pensava que el tema elegit i el fet de fer-ho en un laboratori era una tasca que em quedava molt gran. Però en tot moment vaig tenir l'ajut d'especialistes en aquest món.

El Dr. Portero em va confessar que encara no havien treballat mai amb cosmètics, però era un repte que s'havia proposat fa temps. **Ens varem trobar amb molts problemes;** perquè us feu una idea, esmentaré:

- En primer lloc, el principal problema era el d'afegir les cremes en un medi líquid. Inicialment, les cremes les posàvem recobrint la placa de les cèl·lules. Més tard, varem utilitzar unes enganxines transparents, i finalment, utilitzàvem les enganxines i a més a més pesàvem la quantitat de crema que hi posàvem.
- En segon lloc, no sabíem si havíem de posar medi de cultiu, i quin era el més apropiat per irradiar-les. Un cop fet els experiments, varem veure que quan no tenien medi les cèl·lules es morien, però no per l'efecte dels raigs UV, sinó perquè els hi faltava el seu medi, el seu aliment. Quan els irradiàvem amb DMEM, varem veure que el phenol red, que portava aquest medi, les protegia dels raigs UV. Així que el millor medi per la seva irradiació era MEM.
- En tercer lloc, després de la irradiació no deixàvem incubar les cèl·lules, pensàvem que la mort seria immediata després d' irradiar-les. Al no morir-se, les deixàvem incubar per poder apreciar la mort.
- Vam haver de trobar la dosi idònia de radiació. En un principi varem començar amb el microones UV Stratalinker 1800, es va pensar que no anava bé perquè no es veia cap canvi en les cèl·lules i, aleshores, varem irradiar-les a la campana. Més tard, en un altre microones més modern que el primer, el Stratalinker 2400, que tenia l'opció d'irradiar les cèl·lules segons l'energia, no com al primer que irradiava segons el temps i no es podia saber a quants milijoules ho feia.
- Per una altra part, es va fer un western blot amb la finalitat d'observar el dany al ADN. En l'últim pas, el de posar el western al aparell per a llegir-ho, ho varem deixar massa temps i se'ns va cremar el marcador; a més a més, la proteïna que buscàvem, la gamma-H2AX, no sortia marcada.
- També varem fer una immunohistoquímica, però no ens varem recordar de fer un control a l'anticòs secundari i els resultats no ens van sortir. Ens varem pensar que devia de ser per l' inespecificitat de l'anticòs secundari.
- També se'ns van contaminar les cèl·lules.

Aquest fet ens va endarrerir els experiments però alhora ens varem permetre ajustar les condicions per a que el experiment surtis bé:

Varem irradiar-les amb enganxines transparents, amb el medi MEM, pesant la quantitat de crema a posar; seguidament, varem irradiar-les al microones UV Stratalilnker 2400, per així poder controlar el joules a la qual s'irradiava, i varem deixar que incubés després d' irradiar-les.

A partir d'aquest disseny es va poder comprovar que:

1. Les cèl·lules irradiades a més energia, en aquest cas 500mJ i sense crema tenien molta menys viabilitat en comparació amb les control no irradiades i sense crema. En canvi, quan s' irradiava a la mateixa energia posant-hi crema de 50 ó de 15 hi havia més viabilitat. *En altres paraules, les cremes amb factor de protecció solar protegeixen dels raigs UV.*
2. Si mirem la relació entre la viabilitat cel·lular amb l'energia irradiada, observem que a 200mJ, la diferència entre la crema de 15 i la de 50 no era gaire significativa .En canvi , al irradiar-les a 500mJ hi havia més diferència entre una i l'altra. *Es a dir cal utilitzar cremes amb factor de protecció més elevat a dosis altes de radiació.*
3. Cal remarcar que aquests resultats no són directament extrapolables a la vida real, ja que nosaltres treballàvem amb cèl·lules de ronyó humà i no de dermis; i en un cultiu cel·lular líquid in vitro que no es correspon exactament a l'estructura del teixit in vivo.
4. De cara a properes investigacions, hauríem de comprovar si el dany produït en el DNA que condueix a l' apoptosi o a la necrosi pot ser reparat o bloquejat per cèl·lules eucariotes que semblen haver desenvolupat mecanismes de resistència a la radiació per transferència d'alguna mutació prèvia.
5. Gràcies al projecte em vaig introduir en aquest món desconegut, durant alguns mesos. Vaig tenir contacte amb gent que treballava en aquest àmbit laboral i vaig saber que per obtenir resultats havien d'estar llargues hores al laboratori, caps de setmana inclosos.
6. Tanmateix, fer el projecte en un laboratori m'ha obligat a tenir paciència quan els experiments no sortien bé. De la tasca "que se'm quedava gran" m'ha fet responsable, tenir una constància en el treball i conèixer la metodologia d'investigació. I tot i que al començament pensava que no me'n sortiria, poc a poc , amb esforç personal i l'ajut de tot l'equip de laboratori he pogut arribar a les conclusions que us acabo de presentar.

Vaig comparar els meus experiments amb cèl·lules de ronyó in vitro amb l'eritema degut a la radiació solar, per tal de saber quants milijoules eren necessaris per produir aquest efecte en funció del tipus de pell . En conclusió, vaig veure que la irradiació mínima que patien les meves cèl·lules de ronyó (100mJ) ja era suficient per tenir eritema en tot tipus de pell, inclús les més fosques. En conseqüència irradiacions de (200, 500, 999 mJ/cm²) produïrien fortes lesions a tot tipus de pell.

6.AGRAÏMENTS.

En aquest apartat no vull deixar d'esmentar a la meva tutora Montse pel seu continu seguiment i perseverança en aquesta complicada tasca de guiar-me i de fer-m'ho més fàcil. Així com per animar-me a presenta'm al *Projecte ITINERA*.

Al Manuel per dona'm l'oportunitat de fer els experiments en un laboratori amb gent professional del tema.

A l'Anna, el Guillem i l'Omar per ser segons professors i ensenya'm des de utilitzar una pipeta (veure **Fig.28**), passar per un "camí de medi", fins a fer un Western Blot; a més de la paciència i la pèrdua del seu temps que això suposava. Finalment, pels ànims quan les coses no sortien bé.



Gràcies a tots!.

Figura 28. *Pipetes*

BIBLI-WEBGRAFIA

- JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, ACS Publications (2012). Article. *Photoprotective Potential of Strawberry*.
- EXPERIMENTAL DERMATOLOGY (2003) *Oxidative and premature skin ageing*
- *PHOTODERMATOLOGY, PHOTOIMMUNOLOGY &PHOTOMEDICINE* (2011). *UVA-activated synthesis of metalloproteinases 1,3 and 9 is prevented by a broad-spectrum sunscreen*.
- [http://www.ice.udl.cat/itinerari/Projecte IITINIERA](http://www.ice.udl.cat/itinerari/Projecte_IITINIERA), Juny 2012).
- http://www.quo.es/ciencia/consultas/como_actua_la_crema_de_proteccion_solar (juliol 2012)
- http://es.wikipedia.org/wiki/Protector_solar (juliol 2012)
- <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2009/07/01> (juliol 2012)
- <http://www.hola.com/belleza/caraycuerpo/2012071759780/proteccion-solar-claves-eleccion/> (juliol 2012)
- <http://www.vivirmejor.com/la-proteccion-solar-va-mas-alla-de-las-cremas-fotoprotectoras> (juliol 2012)
- <http://www.youtube.com/watch?v=CxLt6xmZPFo> Cremas de protección solar inspirado en coral marino (juliol 2012).
- <http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=revista%20medicina%20proteccion%20osolar>. Portectores solares (juliol 2012)
- <http://www.medicina21.com/Articulos-V1312.html> Protector solar en la infancia (juliol 2012).
- http://www.edu3.cat/Edu3tv/Fitxa?p_id=16949 Cremes solars (juliol 2012)
- <http://ca.wikipedia.org/wiki/Melanina> (setembre, 2012).
- http://www.marceljorba.com/aula_tecno/treb_recerca/Treball%20Recerca_Estructura%20i%20Presentacio%20de%20la%20Memoria.pdf (setembre 2012)
- <http://www.edu365.com/batxillerat/comfer/recerca/#intro> (setembre 2012)

- <http://www.udl.cat/udl/media/aniversariETSEA.html> Veure entrevista a Manuel Portero-Otin(desembre 2012)
- <http://www.slideshare.net/anatovirtual/diccionario-etimologico-de-terminos-medicos> (desembre 2012)
- <http://www.imn.ac.cr/educacion/UV/UVA4.html> (gener 2013)

