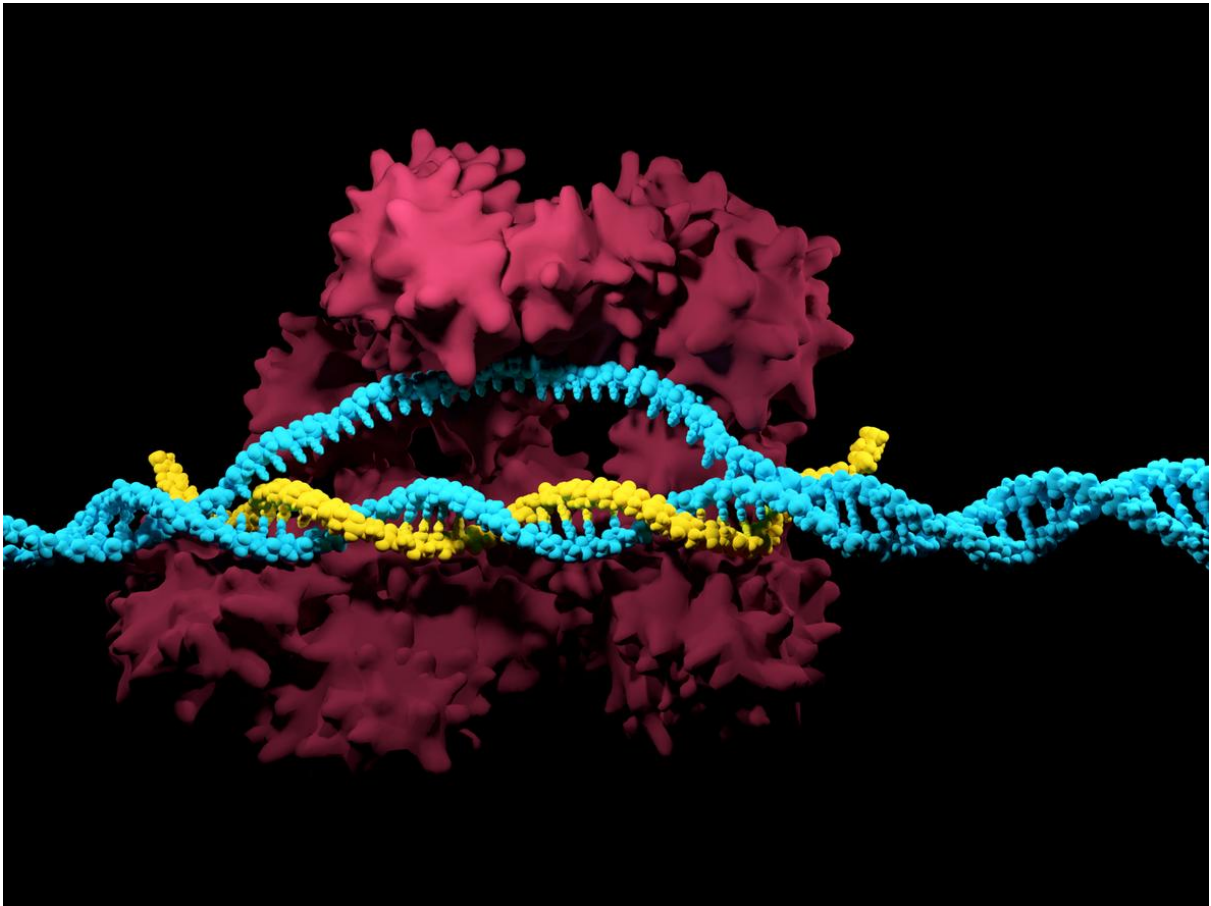


# CRISPR aplicat al càncer



D.L  
2n BATX  
Crus 2021/2022

# **ÍNDEX**

<b>1. Resum-Abstract</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducció</b>	<b>4</b>
2.1 Objectius	4
2.2 Limitacions	4
<b>3. Marc teòrica</b>	<b>5</b>
3.1. Biomolècules	5
3.2 Proteïnes	6
3.2.1 Aminoàcid	6
3.2.2 Enllaç peptídic	9
3.2.3 Polipèptids i proteïnes	9
3.3 Àcids nucleics, ADN i ARN	12
3.3.1 Nucleòtids	12
3.3.2 Estructura tridimensional de l'ADN i ARN	14
3.3.3 Cromosomes	16
3.3.4 Tipus d'ARN	17
3.3.5 Expressió de la informació genètica	18
3.3.6 Mutacions	21
3.3.7 Malalties genètiques	22
3.3.8 Informació, seqüenciació, i mutacions dels gens NCBI i OMIM	23
3.4 CRISPR/Cas-9	26
3.4.1 Que és?	26
3.4.2 Orígens i com es va descobrir	26
3.4.3 Components del sistema CRISPR/Cas-9	27
3.5 Procés de modificació genètica	28
3.6 Aplicacions que té	32
3.7 CRISPR en el Càncer	33
3.8 Que és el Càncer?	33
3.8.1 Tipus de tumors i de càncers	33
3.9 Com es forma el càncer?	34
3.9.1 Gens implicats en l'aparició de tumors	35
3.9.2 Causes del càncer:	36
3.10 Tractament del càncer	38
3.10.1 Tots els tractaments	38
3.10.2 Com pot ajudar CRISPR?	43
<b>4. Marc pràctica</b>	<b>46</b>
4.1 Explicació de la part pràctica	46
4.2 Part pràctica	48
<b>5. Conclusions</b>	<b>57</b>

<b>6. Agraïments</b>	<b>58</b>
<b>7. Memòries</b>	<b>58</b>
<b>7. Webgrafia i bibliografia</b>	<b>59</b>

## **1. Resum**

Este trabajo de investigación trata sobre el CRISPR aplicado al cáncer, por lo cual, es necesario entender varias cosas. La molécula conocida como ADN contienen la información para sintetizar proteínas, cuando el ADN es afectado por mutaciones, las proteínas salen modificadas y dejan de hacer su función, causando enfermedades, con la herramienta CRISPR, podemos utilizarla para corregir el ADN y curar las enfermedades.

## **Abstract**

This research work is about CRISPR applied in cancer, that's the reason it's necessary to understand several things. The molecule known as DNA contains the information to synthesize protein, when DNA is affected by mutations, the proteins are modified and stop making they function, causing disease, with the CRISPR technique, we can use to correct the mutations in DNA and cure disease.

## **2. Introducció**

En aquest treball de recerca s'investiga i s'estudia l'eina de modificació genètica CRISPR i com pot ser aplicada i utilitzada en una de les malalties amb més taxa de mortalitat del món, el càncer.

Les principals raons i motivacions per les quals he escollit aquest tema pel meu treball de recerca és l'interès d'estudiar i entendre el funcionament de l'eina CRISPR, saber com actua i quins beneficis es poden treure fent servir aquesta tècnica, ja que segons estudis científics és una eina que té molt potencial, perquè es pot aplicar en molts sectors de la societat, des de medicina fins agricultura, i el seu cost és molt baix.

També, una de les principals raons és el fort impacte social que té la malaltia del càncer, perquè és una de les malalties amb les quals més persones moren a l'any i al seu torn, és molt difícil de tractar. I per últim, un dels motius pel qual he escollit aquest tema és perquè personalment m'interessa molt la branca de la investigació mèdica, i perquè m'agradaria estudiar alguna carrera relacionada amb la investigació científica i poder arribar a treballar d'això.

### **2.1 Objectius**

Els objectius d'aquest treball de recerca són l'estudi de la tècnica CRISPR per poder entendre el seu funcionament. Aquesta investigació tindria la finalitat de poder dur a terme l'estudi teòric previ i necessari que es fa per poder aplicar aquesta eina amb intenció de reparar una mutació cancerígena.

Aquesta investigació teòrica es realitzarà amb la recerca d'informació sobre un càncer en específic i una mutació que provoqui aquest càncer, i posteriorment s'hagi detectat la mutació que la causa, es reconstruirà la seqüència necessària i específica perquè CRISPR/Cas-9 pugui actuar-hi.

### **2.2 Limitacions**

A l'hora de desenvolupar la part pràctica, hi ha hagut una sèrie de limitacions, ja que a causa de la falta de material professional de laboratori i de teixits cancerosos, no s'ha pogut arribar més enllà de la fase de preparació i estudi d'un càncer per aplicar CRISPR.

## **3. Marc teòrica**

### **3.1. Biomolècules**

Les biomolècules són les molècules que constitueixen als éssers vius, hi ha 4 grups on es classifiquen depenent de la seva estructura i de la seva finalitat dins de l'organisme:

-Carbohidrats: Estan constituïdes pels glúcids, molècules d'un màxim de 6 carbonis que poden agrupar-se per formar disacàrids, com la lactosa, o polisacàrids, com la cel·lulosa. La seva funció cel·lular principal és energètica.

-Lípids: Són molècules on el nombre de carbonis pot ser molt elevat, les seves estructures poden variar molt. Els lípids es classifiquen entre complexos i senzills depenent si tenen molècules d'àcids grassos en la seva estructura. La seva funció també varia molt, poden estar destinats a la reserva energètica, com és el cas de triacilglicèrid (TGA), o una funció estructural com el de fosfolípids en les membranes cel·lulars.

-Proteïnes: Són molècules que varien molt de mida i de funcionalitat, pel fet que estan formades per aminoàcids, que depenent del seu ordre i la seva disposició, donaran lloc a moltes variacions de proteïnes.

-Àcids nucleics: Són molècules que tenen estructures molt similars, amb dues funcions principals en l'organisme, l'emmagatzemament de la informació genètica, com és el cas de l'ADN o ARN, o funció energètica, com el cas de l'ATP.

En aquest tema de CRISPR aplicat al càncer, les dues biomolècules que més importància i protagonisme tenen són les proteïnes i els àcids nucleics.

## **3.2 Proteïnes**

Les proteïnes són macromolècules que assoleixen moltes funcions cel·lulars importants i són el resultat de l'expressió de la informació genètica. Aquestes macromolècules estan constituïdes per llargues o curtes cadenes d'uns blocs estructurals anomenats aminoàcids del qual hi ha de 21 tipus diferents.

Les diferents combinacions i ordre dels aminoàcids originen una variabilitat molt gran de proteïnes, aquestes combinacions d'aminoàcids són degudes a les seqüències de la informació genètica dels éssers vius.

Alguns exemples d'algunes funcions que assoleixen les proteïnes són:

-Transport de molècules, el cas més conegut és el de l'hemoglobina, que es troba en abundància en els glòbuls vermells i s'encarrega de transportar molècules d'O<sub>2</sub>.

-Tenen importància en el moviment cel·lular o en la contracció dels músculs.

-També són molècules essencials i necessàries per al creixement del cos.

-Transmetre missatges tan intracel·lulars com en el medi extracel·lular.

-Moltes d'aquestes participen en reaccions químiques del cos, com per exemple reaccions metabòliques, aquest grup de proteïnes es denominen enzims, i tenen la funció d'accelerar o d'augmentar la velocitat de les reaccions químiques.

Però per poder entendre les proteïnes hem d'entendre el que les compon, els aminoàcids.

### **3.2.1 Aminoàcid**

Els aminoàcids són molècules orgàniques. On la seva funció més important és ser el component bàsic que en combinar-se formen una proteïna (figura 1).

Hi ha de molts tipus diferents, però la seva estructura molecular és la mateixa, està constituïda per un grup carboxil (COOH), format per un àtom de carboni enllaçat amb dos d'oxigen, aquest grup també rep el nom *d'àcid*, i un grup amino (NH<sub>2</sub>) format per un àtom de nitrogen unit a dos d'hidrogen.

Aquests grups estan units a àtoms de carboni situats al centre d'aquesta estructura, el grup COOH sempre està unit al carboni 1, mentes que el grup NH<sub>2</sub> pot estar unit a altres carbonis més llunyans com el 2, 3, 4, etc. I depenent de quin carboni estigui unit el grup amino, l'aminoàcid s'anomenarà α, β, γ, etc..., aminoàcids, depenent si es troba en el carboni 2, en el 3 o en el 4 respectivament.

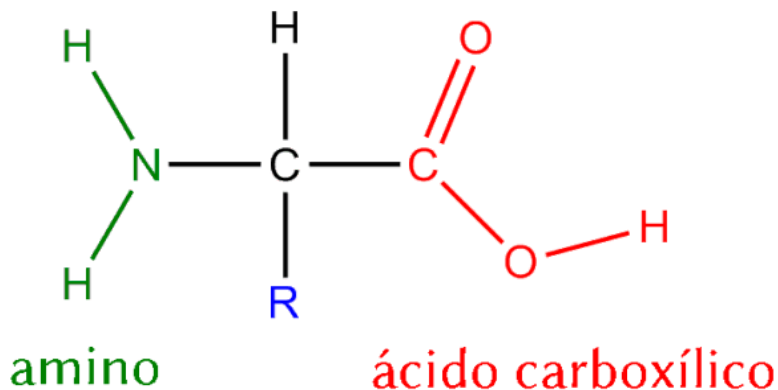


Figura 1, estructura d'un aminoàcid.

Hi ha diferents tipus d'aminoàcids, els 21 aminoàcids que formen les proteïnes s'anomenen aminoàcids proteics i tots són α-aminoàcids, però també existeixen aminoàcids que no formen part de les proteïnes.

Hi ha un grup petit d'aminoàcids que no es poden sintetitzar i que només es poden obtenir a través de la ingesta d'aquests en el nostre menjar, els que pertanyen a aquest grup es denominen *aminoàcids essencials*.

Encara que tots els aminoàcids comparteixin la mateixa estructura, les diferències en els seus radical, representat en la imatge com R, que determinen les seves propietats tant químiques com biològiques.

Aquests diferents comportaments químics i biològics en el grup R dels aminoàcids fan que es classifiquin els 21 aminoàcids proteics en 4 grups diferents (figura 2):



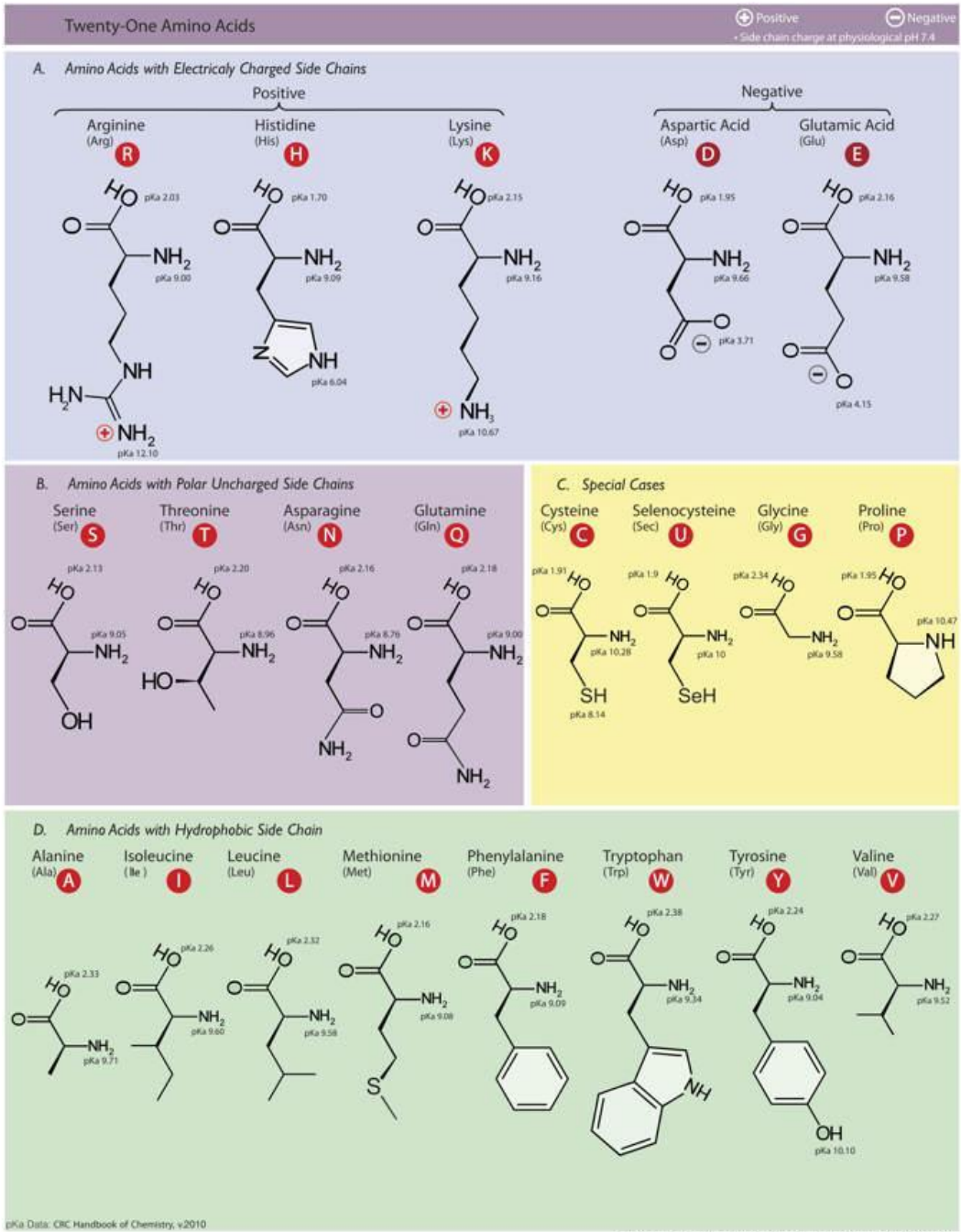
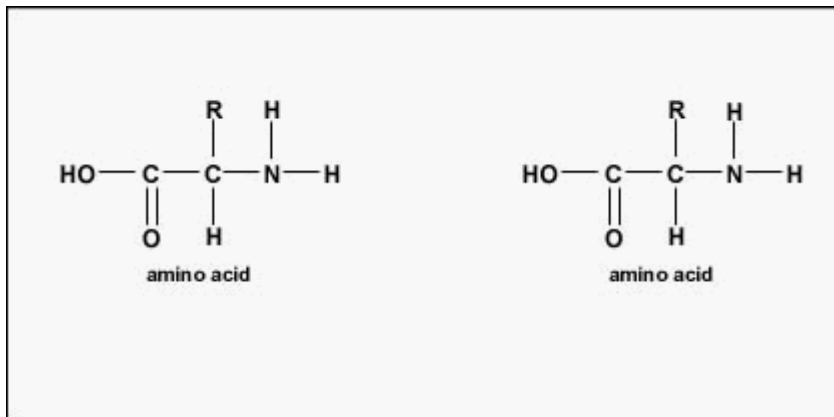


Figura 2. Els grups d'aminoàcids.

### 3.2.2 Enllaç peptídic

Aquestes molècules s'uneixen entre si per formar les proteïnes o polipèptids a través d'un enllaç anomenat **enllaç peptídic**.

Aquest tipus d'enllaç es forma entre el grup COOH d'un aminoàcid i el grup NH<sub>2</sub> d'un altre aminoàcid amb l'alliberació d'una molècula d'aigua (H<sub>2</sub>O).



*Figura 3. Formació d'un enllaç peptídic.*

Una vegada aquestes molècules s'uneixen amb aquest enllaç formant una cadena d'un mínim de 10 aminoàcids, es pot considerar un polipèptid.

### 3.2.3 Polipèptids i proteïnes

Els polipèptids són llargues cadenes d'un mínim de 10 aminoàcids i d'un màxim de 100, ja que a partir de 100 aminoàcids es pot considerar una proteïna. Aquestes proteïnes, en canvi, poden estar compostes d'una (proteïna monomèrica) o de diverses cadenes polipeptídiques (proteïna polimèrica).

Les proteïnes, després d'haver-ne sigut sintetitzades, canvien la seva configuració espacial, i la seva estructura tridimensional en funció de la combinació d'aminoàcids que la conformen, i per poder assolir la seva funció. Hi ha 4 fases en l'estructura d'una proteïna:

· **Estructura primària:** L'estructura primària és la cadena senzilla d'aminoàcids units per enllaços peptídics.

· **Estructura secundària:** En aquesta fase podem trobar 2 tipus d'estructures. L'hèlix- $\alpha$ , és la conformació dels aminoàcids en forma d'hèlix, on per cada volta hi ha 3,6 aminoàcids, dels quals, els seus radicals se situen apuntant cap a fora de l'hèlix, d'aquesta estructura se sosté a causa dels ponts d'hidrogen que es creen entre aminoàcids que es troben separats per 4 aminoàcids en la cadena polipeptídica.

I làmines- $\beta$ , les quals són estructures extenses de dues o més cadenes d'aminoàcids paral·leles d'un mateix polipèptid on es formen enllaços, més específicament ponts d'hidrogen entre els grups  $\text{NH}_2$  i els grups  $\text{COOH}$  dels aminoàcids de les cadenes paral·leles, donant-li una estructura espacial en forma de "zig-zag".

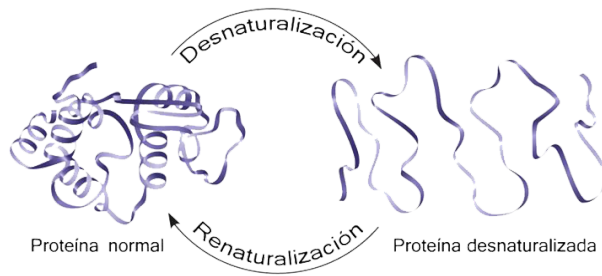
· **Estructura terciària:** Els grups R dels aminoàcids d'una mateixa cadena polipeptídica comencen a crear enllaços febles entre ells com ponts d'hidrogen o forces de Van der Waals. Aquesta disposició en l'espai li proporciona una forma determinada al polipèptid o proteïna, per tant, adquireix la seva funcionalitat.

· **Estructura quaternària:** En aquesta estructura s'estableixen enllaços dèbils entre diferents cadenes polipeptídiques on ja s'ha donat l'estructura terciària amb la finalitat de crear complexos proteics.

Com ja hem vist, la disposició espacial de les proteïnes és molt important perquè puguin dur a terme la seva funció, però, hi ha diferents factors que poden afectar a la funcionalitat i a l'estructura d'aquestes molècules:

-La temperatura: Si la temperatura del medi en el qual es troben aquestes molècules és molt baixa, les proteïnes no es poden moure amb facilitat, cosa que disminueix la seva activitat, en canvi, si la temperatura és molt elevada, els enllaços febles que s'estableixen entre els radicals dels aminoàcids de la cadena polipeptídica es trenquen, fent que la seva estructura terciària es perdi, i, per tant, la seva funcionalitat.

-El pH: El pH del medi on es trobi la proteïna també afecta directament a la seva estructura i funcionalitat, provocant la seva desnaturalització.



*Figura 4. Procés de desnaturalització i renaturalització d'un polipèptid.*

-Inhibidors: Són molècules que se situen en el centre actiu de la proteïna o l'enzim impedit que els substrats s'uneixi per poder dur a terme la reacció o el procés.

### 3.3 Àcids nucleics, ADN i ARN

Els àcids nucleics són molècules que formen diferents estructures biològiques dins de l'organisme, les estructures més importants les quals formen són l'àcid desoxiribonucleic (ADN) i l'àcid ribonucleic (ARN), aquestes macromolècules són les encarregades d'emmagatzemar i transportar la informació genètica. També es poden trobar molècules d'àcids nucleics amb funció energètica, la més abundant i comuna l'ATP. Aquestes dues macromolècules estan formades per cadenes llargues d'unes altres molècules més petites anomenades **nucleòtids**.

#### 3.3.1 Nucleòtids

Els nucleòtids són les molècules de les quals les llargues cadenes d'ADN i ARN estan formades, però també tenen altres funcions i intervencions en altres mecanismes o processos cel·lulars dependent de la seva estructura.



Figura 5. Nucleòtid.

Aquests nucleòtids, en general, estan formats per les següents components:

· **Monosacàrid**: És un glúcid, en aquest cas en una pentosa. Els àtoms de carboni que la componen estan numerats des de l'1' fins a 5' en sentit de les agulles d'un rellotge, aquesta enumeració serveix per poder donar-li sentit a les cadenes d'ADN o ARN. En l'ADN és una desoxiribosa, ja que li falta un àtom d'oxigen en el 2', en canvi, en l'ARN conté aquest àtom d'oxigen.

· **Grup fosfat:** Una molècula composta per un àtom de fòsfor i 4 d'oxigen. En el cas dels nucleòtids que componen les cadenes d'ADN o d'ARN només contenen una molècula de grup fosfat, en canvi, en nucleòtids que tenen altres funcions cel·lulars, com l'**ATP** (adenosinatrifosfat), que en comptes de tenir 1 grup fosfat en té tres i és la principal font d'energia en els processos cel·lulars. Aquesta energia és alliberada a l'hora de trencar els enllaços que uneixen als grups fosfats.

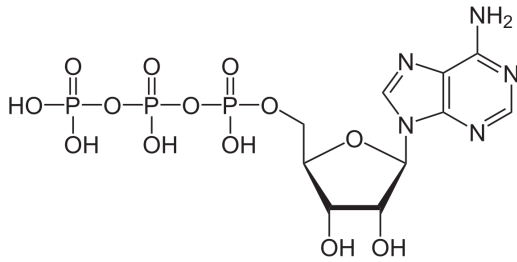


Figura 6. Molècula d'ATP.

· **Base nitrogenada:** Hi ha cinc tipus diferents, adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) i uracil (U), que són les encarregades de formar les seqüències dels gens. En l'ADN es troben l'A, T, C i G, en canvi, en l'ARN, no hi ha timina, sinó que se substitueix per l'uracil. Cada tres bases, és a dir, cada **triplet**, i depenent de l'ordre en el qual les tres bases estiguin posades, contenen informació referida o que representa un aminoàcid en concret. Aquestes es poden classificar en dues branques depenent de la molècula de la qual deriven:

- Pirimidíniques:** Són les bases derivades de la molècula anomenada pirimidina i en aquest grup es troben l'uracil, la timina i la citosina.
- Púriques:** Són les derivades de la molècula purina i pertanyen a aquest grup l'adenina i la guanina.

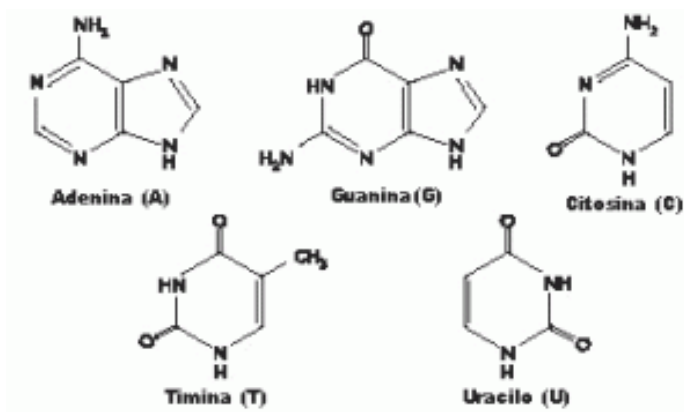


Figura 7. Bases nitrogenades

### 3.3.2 Estructura tridimensional de l'ADN i ARN

#### · Estructura primària

L'estructura en forma de cadena simple o doble de l'ADN o ARN és degut al fet que els nucleòtids s'uneixen entre si per formar llargues cadenes a través **d'enllaços fosfodièster** entre el grup alcohol (OH) dels carbonis 5' i 3' de les pentoses dels nucleòtids conseqüents.

Aquest tipus d'enllaç covalent es produeix entre el grup OH del carboni 3' a un grup fosfat, i d'aquest mateix grup fosfat, al carboni 5' del següent nucleòtid.

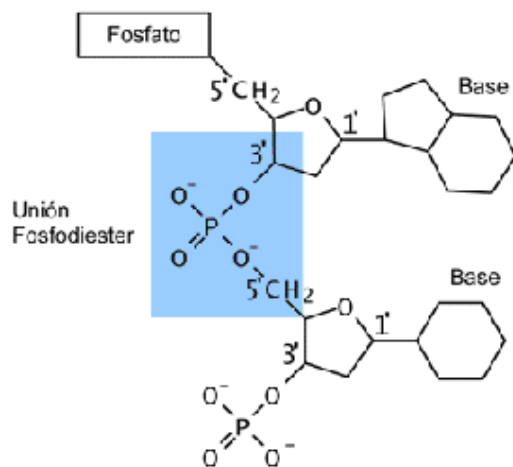


Figura 8. Enllaç fosfodièster.

#### · Estructura secundària

En els casos com en l'ADN, que en general és una molècula de doble cadena, on les cadenes són antiparal·leles, és a dir, una està en sentit 5'→3' i l'altra de 3'→5', les dues cadenes es mantenen unides a causa dels **punts d'hidrogen** que es formen entre les bases nitrogenades de cadascuna.

Les bases nitrogenades no es poden enllaçar amb qualsevol altra base, les adenines (A) sempre s'aparellen amb les timines (T) mitjançant 2 punts d'hidrogen, i la citosina (C) sempre s'aparella amb la guanina (G), mitjançant 3 punts d'hidrogen. Això forma l'estructura secundària de l'ADN, la doble hèlix.

En l'ARN, principalment, sol ser monocatenari, menys en l'ARN de transferència, que a causa del triplet anomenat anticodó s'enllaça amb els ARN missatgers quan arriben al ribosoma. Però en alguns processos cel·lulars en els quals són necessaris crear una cadena d'ARN complementària a una d'ADN, l'aparellament de bases és el següent, l'adenina (A) s'aparella amb l'uracil (U), i la citosina (C) amb la guanina (G). Amb tot això, l'estructura tridimensional de l'ADN i de l'ARN és així:

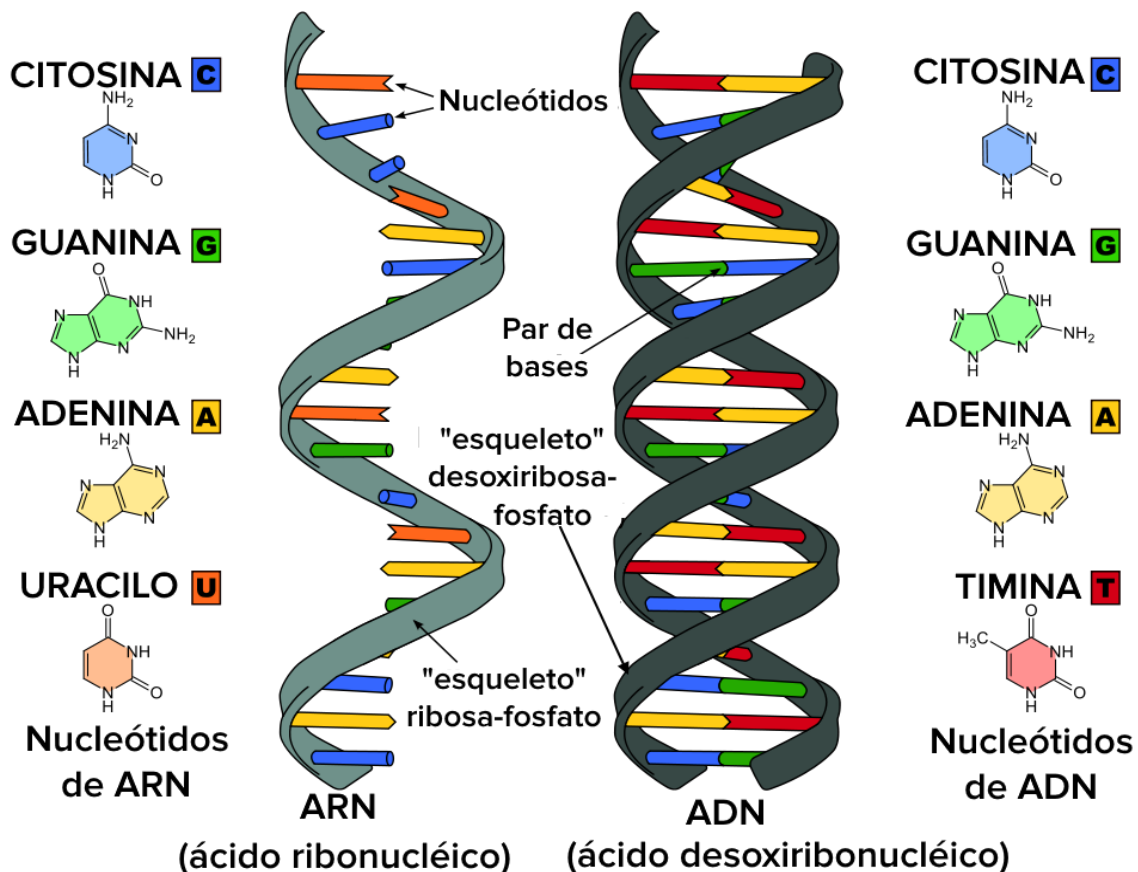


Figura 9. Estructura tridimensional de l'ADN i l'ARN.

**Estructura terciària:**

En cèl·lules eucariotes les molècules de l'ADN es classifiquen en "paquets" anomenades cromosomes, les quals són molt llargues, cosa que fa que sigui necessària una organització de la cadena d'ADN en una estructura denominada com a **nucleosoma**.



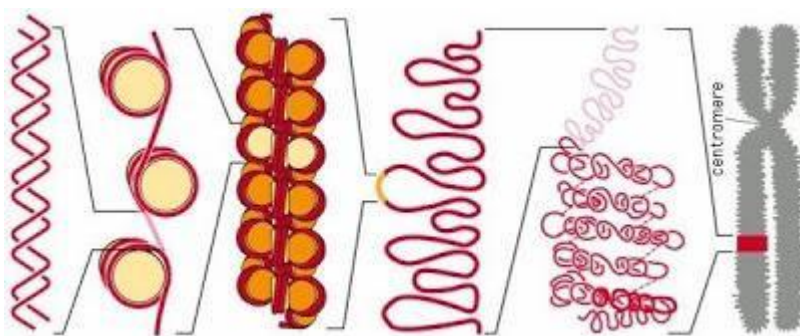
Aquestes estructures estan formades per unes proteïnes anomenades **histones**, les quals, 8 d'aquestes s'associen amb l'ADN, el qual fa 1,8 voltes per cada nucleosoma. El conjunt de nucleosomes que contenen el 100% de l'ADN s'anomena **cromatina**.

Aquesta cromatina, durant la interfase (la major part del cicle cel·lular), l'ADN es troba en un tipus de comportament molt més reduït, ja que durant les fases de mitosi i meiosi del cicle cel·lular, la cromatina es troba molt més condensada en unes estructures denominades cromosomes.

### 3.3.3 Cromosomes

La cromatina segueix una diferents nivells de condensació per poder empaquetar tota la seva estructura en els cromosomes. Primer, els nucleosomes s'agrupen formant el **solenoid**, una estructura on els nucleosomes estan col·locats en forma d'espiral, posteriorment, aquest solenoide comença a enrotllar-se creant bucles sobre si mateix de molts parells de bases de llargària, i per últim, aquesta estructura de bucles crea bucles sobre si mateixos, donant com a resultat els cromosomes.

De molts parells de bases de llargada, més tard, aquests bucles creen més bucles sobre si mateixos, i al final adopten l'estructura del cromosoma.



*Figura 10. Fases de la condensació de l'ADN.*

Les cèl·lules humanes tenen 46 cromosomes en total o 23 parells, dels quals la meitat dels 46 cromosomes venen del pare i l'altra meitat provenen de la mare, això vol dir que cada cèl·lula humana conté 2 cromosomes 1, un de la mare i l'altre del pare.

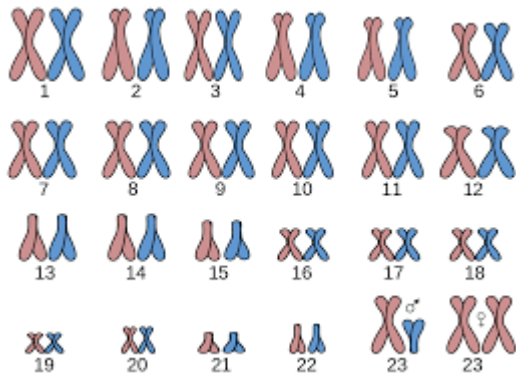


Figura 11. Tots els cromosomes d'una cèl·lula humana.

Els primers 22 parells s'anomenen autosomes, són iguals tant en homes com en dones, i contenen tota la informació que no té relació amb els caràcters sexuals, en canvi, el parell 23 són els cromosomes sexuals, hi ha el cromosoma X i el Y, els nois tenen XY i les noies XX.

**· Estructura:**

Un cromosoma està compost per dues cromàtides, una estructura composta per ADN empaquetat i proteïnes, que contenen la mateixa informació genètica, units per una estructura que es troba més o menys en el centre anomenada **centròmer**, i també divideix les cromàtides en dues parts, el braç curt anomenat **braç p**, i el llarg anomenat **braç q**, on es troben els gens. Aquests braços es divideixen en seccions que s'enumeren per poder identificar gens, per exemple, un gen que es trobi en el cromosoma 3, braç q secció 25, s'anomenarà 3q25.

**3.3.4 Tipus d'ARN**

Hi ha molts tipus d'ARN diferents amb diverses finalitats, hi ha de tres tipus que són els més importants:

**· ARN missatger:** És l'encarregat de portar la informació complementària de l'ADN en forma de triplets anomenats **codons**, és creat en la transcripció.

**· ARN ribosòmic:** Aquest ARN junt amb enzims, són els que componen les subunitats grans i petites dels ribosomes.

**· ARN de transferència:** Els 21 aminoàcids proteics tenen un ARNt específic que els transfereix al polipèptid en creixement en el procés de traducció. Té un anticodó per poder aparellar-se amb els codons de l'ARNm.

### 3.3.5 Expressió de la informació genètica

Si sabem que l'ADN i l'ARN contenen informació genètica, com s'expressa aquesta informació?

La informació genètica es troba *escrita* o representada en seqüències llargues de nucleòtids amb un ordre específic de bases, anomenades **gens**, el producte d'aquesta expressió són les proteïnes, que se sintetitzen mitjançant 2 grans processos cel·lulars anomenats transcripció i traducció.

Però per poder entendre aquests processos s'ha d'entendre el codi genètic.

#### - Codi genètic

El codi genètic és una sèrie d'instruccions escrites a partir de triplets de 3 lletres diferents, que utilitzen els ribosomes per poder llegir i *traduir* informació copiada de l'ADN en l'ARNm per poder sintetitzar les proteïnes. El codi genètic li diu als ribosomes on han de començar a llegir l'ARNm, quan ha d'acabar, i que vol dir cada triplet de bases d'ARNm.

Algunes característiques importants del codi genètic és que va per triplets, és a dir, que cada tres bases nitrogenades és la informació per un aminoàcid, així és com els ribosomes llegeixen l'ARNm.

També es diu que és degenerat, això vol dir que hi ha més triplets que aminoàcids, pel qual, hi ha diferents triplets que donen lloc al mateix aminoàcid.

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra (extrem 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } stop UAG } stop	UGU } Cys UGC } UGA } stop UGG } Trp	Tercera lletra (extrem 3')
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	

Figura 12. Codi genètic.

Amb això entès, ja es pot explicar com fa la cèl·lula per expressar la informació genètica.

## - Procés d'expressió de la informació genètica

### **-Transcripció:**

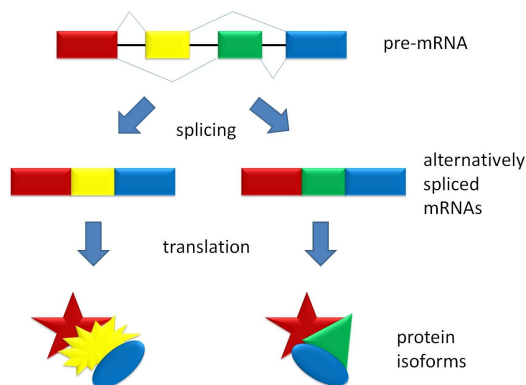
Aquest és el procés pel qual, els gens i la informació de l'ADN es copia en una cadena complementària d'ARN missatger. Hi ha tres etapes diferents:

1-Iniciació: Un enzim anomenat helicasa separa les dues cadenes d'ADN, trencant els ponts d'hidrogen que hi ha entre les bases, posteriorment, un enzim anomenat ARN polimerasa s'uneix a una de les dues cadenes d'ADN, anomenada **cadena motlle**, i més concretament a una seqüència de nucleòtids anomenada promotor que es troba a l'inici del gen.

2-Elongació: En aquesta etapa l'ARN polimerasa va creant una cadena d'ARN complementària a la cadena d'ADN a la que s'ha unit, en sentit 3'-->5', i la cadena d'ARN es crea en sentit 5'--->3'. Aquesta cadena creixent d'ARN es crea a través de la unió de ribonucleòtids mitjançant enllaços fosfodièster, complementaris a la cadena d'ADN, els quals queden units a aquesta mateixa per ponts d'hidrogen.

3-Terminació: Aquesta és l'última etapa de la transcripció, és quan l'ARN polimerasa arriba a una seqüència específica i la síntesi de l'ARNm termina, posteriorment aquesta cadena se separa de l'ADN.

En els gens eucariotes, hi han unes seccions dins dels gens anomenats **introns**, que després d'un procés anomenat **splycing** són eliminats deixant només les seccions d'informació codificant, anomenades **exons**, tots els exons junts formen el CDS, la *codifying section*.



*Figura 13. Procés de splycing*

### **-Traducció:**

En aquest procés els ribosomes llegeixen i expressen la informació que transporta l'ARNm en proteïnes. Aquest procés transcorre en els ribosomes. Està compost per tres etapes:

1-Iniciació: En aquesta etapa és quan s'uneixen les dues subunitats que formen els ribosomes (subunitat petita, i subunitat gran), també s'uneix l'ARNm i aminoacil-ARNt (un ARN de transferència carregat amb el primer aminoàcid).

Els ribosomes tenen tres llocs, A per on entra l'aminoacil-ARNt, P on es posa el polipèptid-ARNt, i E on sortirà l'ARNt. En començar aquesta etapa, s'uneix un complex d'iniciació format per un aminoacil-ARNt carregat amb metionina al lloc P de la subunitat gran del ribosoma, i també s'uneix l'ARNm a la subunitat petita del ribosoma, aparellant el seu codó AUG amb l'anticodó UAC de l'aminoacil-ARNt.

2-Elongació: Un nou aminoacil-ARNt carregat amb l'aminoàcid corresponent al codó que es troba en l'ARNm, s'uneix al lloc A del ribosoma gràcies a l'energia que procedeix d'una molècula de GTP. Posteriorment, l'aminoàcid que es troba unit a l'ARNt del lloc P del ribosoma s'uneix a l'aminoàcid del lloc A, a través d'un enllaç èster, entre el grup COOH de l'aminoàcid del lloc P i el grup NH<sub>2</sub> del que es troba lloc A, fent que l'ARNt del lloc A es trobi carregat amb un dipèptid, i el del lloc P buit.

Per últim, el ribosoma desplaça l'ARNm al codó següent, i l'ARNt que es troba en el lloc P, passa al lloc E, i l'aminoacil-ARNt del lloc A passa al lloc P, on posteriorment, entrarà al lloc A un altre aminoacil-ARNt carregat amb un altre aminoàcid i es repetirà aquest procés.

3-Terminació: Aquesta etapa passa en el lloc A del ribosoma quan hi arriba el codó de terminació de l'ARNm, fent que s'uneix el factor d'alliberament, que traca l'enllaç entre la cadena polipeptídica i l'últim ARNt i separa les subunitats del ribosoma i l'ARNm.

### 3.3.6 Mutacions

Una vegada entrada la importància que tenen els processos que expressen la informació genètica podem parlar de les mutacions.

Les mutacions són canvis en l'estructura i en les seqüències dels gens que poden alterar la informació que es contenen, provocant que les proteïnes o polipèptids que estaven codificats en els gens afectats, hagin sigut modificats, acurtats, eliminats, allargats, etc. Fent que no puguin complir la seva finalitat cel·lular.

Hi ha molts tipus de mutacions que poden afectar de diferents maneres a la informació genètica, es classifiquen segons a la quantitat de gens que afecten:

· **Mutacions puntuals:** Són les mutacions que afecten només a un gen, hi ha de diferents tipus:

a) Canvi de sentit: Provoca que una base nitrogenada es canvia, per tant, es canvia l'aminoàcid que era codificat per aquell triplet.

b) Sense sentit: Aquesta mutació afecta eliminant triplets o seccions del gen fent que la proteïna resultant li faltin aminoàcids.

c) Canvi de pauta de lectura: Aquesta és deguda a l'eliminació o l'addició d'un o dos nucleòtids, fet que desplaça la seqüència o pauta de lectura del gen, i fa que surti una proteïna totalment diferent.

· **Mutacions cromosòmiques:** Aquestes afecten segments sencers dels cromosomes, que inclouen diferents gens:

-Duplicació d'un segment del cromosoma.

-Es perd o s'elimina un segment del cromosoma.

-Un segment del cromosoma es posa a la inversa dins del mateix cromosoma.

-Un segment de cromosoma s'insereix en un altre cromosoma.

-Dos fragments de cromosomes diferents canvien llocs.

### 3.3.7 Malalties genètiques

Aquestes mutacions modifiquen en menor o major part les seqüències de nucleòtids i els gens, per tant, la informació que està escrita en aquestes seqüències danyades, ja no és la correcta, llavors, a l'hora d'expressar aquesta informació modificada, surten productes erronis, en aquest cas, proteïnes o polipèptids fallits. Aquestes molècules com que no són les que haurien de ser, no poden dur a terme les seves finalitats i funcions dins de la cèl·lula, i això pot provocar o derivar en **malalties genètiques**, que són aquelles malalties que són degudes a mutacions o errors en les seqüències o gens de l'ADN.

Aquest tipus de malalties són les que es causen per culpa de les alteracions en els nostres gens. Aquest tipus de malalties poden ser hereditàries, és a dir, que el gen afectat ha sigut heretat dels pares als fills, o poder sorgir al llarg de la vida.

Hi ha moltes malalties genètiques perquè hi ha un incomptable nombre de mutacions que poden sorgir en els milers de gens humans.

Algunes de les malalties d'origen genètic més conegudes són:

- Síndrome de Down.
- Distròfia muscular de Duchenne.
- Anèmia falciforme.
- Càncers.

### 3.3.8 Informació, seqüenciació, i mutacions dels gens NCBI i OMIM

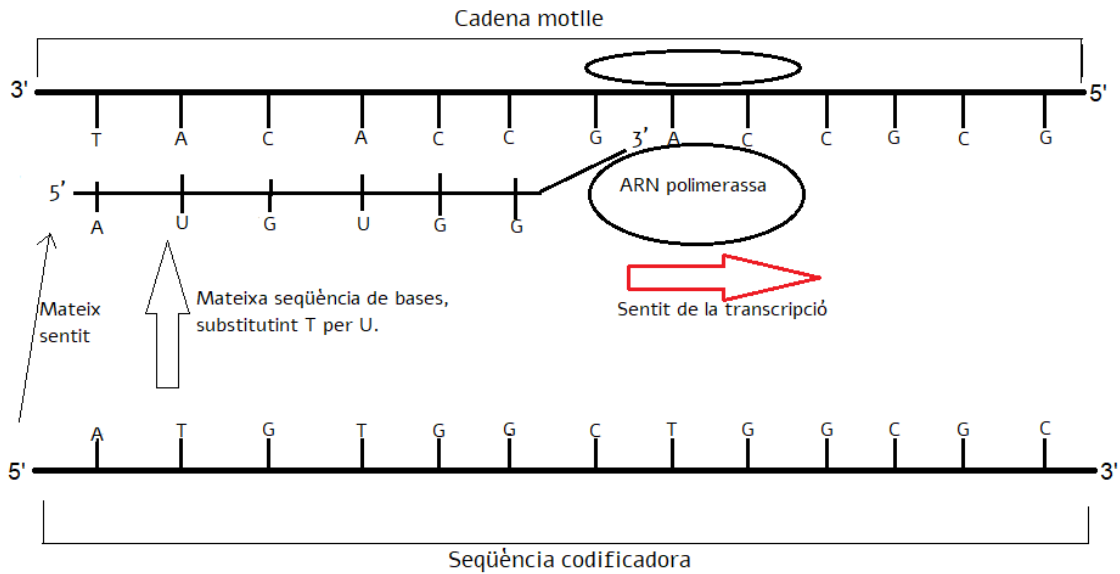
Per poder accedir a tota mena d'informació i a les seqüències dels gens per poder estudiar tant als gens, com les mutacions que poden patir, i les malalties que poden causar, existeixen diferents pàgines web d'investigació i d'emmagatzemament de dades científica que ens permeten accedir a tota la informació coneguda sobre aquests temes.

#### · NCBI:

*Nacional center of biotechnology information* (NCBI), és un lloc web on es pugen recerques i informació científica sobre gens o molècules genètiques, com per exemple: les proteïnes o polipèptids que sintetitzen determinants gens, les espècies que ho posseeixen, les seqüències específiques de diferents gens (és a dir, la seva cadena **codificadora**), i dins d'això, informació com la seqüència d'aminoàcids de la proteïna, el CDS, la seqüència d'ARNm, etc.

La seqüència codificadora d'un gen té la mateixa orientació i seqüència de bases que la de l'ARN missatger que se sintetitzarà de la cadena motlle. Com la cadena codificadora és la cadena d'ADN complementària a la cadena motlle, te les bases nitrogenades complementàries, per tant, si se sintetitza un ARNm complementari a una cadena motlle, aquest ARNm tindrà la seqüència de bases complementària a la cadena motlle, i, en conseqüència, la mateixa seqüència que la cadena codificadora, amb l'única diferència que se substitueixen les T per U.





Per poder buscar un gen en NCBI es requereixen diversos passos, el primer és seleccionar la secció de **GENE** en la petita finestra que es troba en la part superior esquerra de la pàgina web, això ens permet filtrar tota la informació que no hagi de veure amb seqüenciació de gens, posteriorment, gràcies al fet que cada gen té un acrònim associat que pot estar constituït per lletres i números, podem utilitzar en la barra de recerca de la pàgina per poder trobar tota la informació necessària d'aquest gen.

A l'hora de buscar-lo ens surt una pantalla on podem aconseguir molta informació, hi ha de més general com per exemple, les espècies que el posseeixen, el cromosoma i la secció on es troba, etc. Però també hi ha informació més específica com la seva seqüència de bases dependent de l'espècie, a la qual es pot accedir primer triant l'espècie de la qual es vol estudiar el gen, i posteriorment clicant a l'enllaç denominat com a **GenBank**, i en aquest enllaç es troba tota la informació mencionada abans (CDS, seqüències de bases del gen i de l'ARNm, també els aminoàcids de la proteïna, etc.). La seqüència de bases del gen està numerada en files, les quals es divideixen en 6 grups, on cada grup està compost per 10 nucleòtids, és a dir, que en cada fila hi ha 60 bases, això està dissenyat per poder enumerar qualsevol dels nucleòtids que conformen el gen. El CDS està representada en intervals que indiquen quins nucleòtids són els que pertanyen als exons dels gens.

## · OMIM:

*Online mendelian inheritance in Man* (OMIM) és un lloc web on es recopila i es puja informació sobre característiques de les malalties humanes que tenen origen genètic. Aquest lloc web ens permet filtrar tota la informació que volem buscar gràcies a les possibilitats que ens dona l'opció per poder buscar una malaltia determinada, entre altres coses, ens permet seleccionar les característiques d'aquesta malaltia, el cromosoma en el qual es troba, etc.

Però també podem buscar el nom o la ID de la malaltia en la barra de recerca de la pàgina web per anar més de pressa, encara que no sigui tan específic.

Una vegada trobada la malaltia que es vol estudiar, entrem en l'enllaç d'aquesta malaltia i OMIM ens aporta molta informació sobre aquesta malaltia, dades de tota mena, des de bioquímiques, clíniques, mèdiques, i de tota mena, però el més important es troba en una petita taula al principi de la pàgina on es troba el gen implicat (i la seva ID), el cromosoma i la secció on es troba aquest gen, el tipus d'al·lel que és aquest gen, si cliquem en l'ID del gen, entrem en la pàgina de OMIM d'aquest gen, on hi ha informació sobre aquest gen, i on trobem les variacions al·lèliques, les quals són les diferents mutacions que s'han trobat que poden sorgir en aquest gen i les malalties que poden causar aquestes mutacions, per tant, també apareixen les mutacions que causen la malaltia indicada.

En aquestes mutacions ens indiquen la posició en la cadena d'aminoàcids de la proteïna resultant que és afectada, per exemple, si la proteïna original té una alanina en la posició 23, però a causa de la mutació, la seqüència d'ADN canvia a un codó de terminació, pel qual, es representa de la següent manera: **ALA23TER**.

I gràcies a aquesta informació o la seqüència aportada per NCBI, podem utilitzar ambdós recursos per estudiar una malaltia causada per una mutació i aplicar CRISPR en la seqüència mutada.

## **3.4 CRISPR/Cas-9**

### **3.4.1 Que és?**

CRISPR o també coneguda com a **repeticions palindròmiques curtes agrupades**, és una tècnica de defensa bacteriana en contra de patògens externs que gràcies a estudis i investigacions, s'ha descobert que les molècules que formen aquest sistema, que són, l'ARN guia (gARN) i la proteïna Cas-9 (*CRISPR Associated protein*), es puguin utilitzar per modificar o reparar el genoma de qualsevol cèl·lula.

Aquestes dues molècules en conjunt, són capaços de modificar/reparar, seqüències, seccions de l'ADN o gens específics que hagin sigut afectats per alguna mutació, aquestes seccions són escollides per l'investigador gràcies a la complementarietat entre l'ARN guia i la secció de la cadena d'ADN, i tornar-los a les seqüències originals, és a dir, les que no estaven danyades.

### **3.4.2 Orígens i com es va descobrir**

CRISPR són un grup de seqüències del genoma bacterià, aquestes seqüències contenen fragments del genoma de diferents virus que serveixen perquè si el bacteri torna a ser atacada per un virus amb un genoma molt similar o idèntic, el bacteri es pugui defensar. Aquests bacteris contenen petits fragments de repeticions curtes de bases, i entre cada repetició, es troba un fragment anomenat **ADN espaiador**, que són els fragments que el bacteri es guarda en el seu genoma després de l'atac d'un virus.

Quan un virus ataca a un bacteri s'ha de fer amb el control de la seva maquinària molecular i cel·lular per poder replicar-se, però els bacteris i microorganismes que contenen les seqüències de CRISPR posseeixen un complex de defensa compost per enzims anomenats Cas.

Això fa que quan hi entra material genètic d'algun virus, interaccioni amb el complex Cas i aquest mateix fa dues coses, primer, degrada el material genètic del virus perquè no es pugui replicar, i alhora agafa un fragment del material genètic víric, el modifica i ho col·loca dins de les seqüències CRISPR, així, el bacteri conté una petita part de la seqüència vírica en el seu genoma, i això li serveix perquè si el virus el torna a atacar, es crea un ARN complementari gràcies a aquesta seqüència espaciadora, i l'ADN víric invasor es degrada.

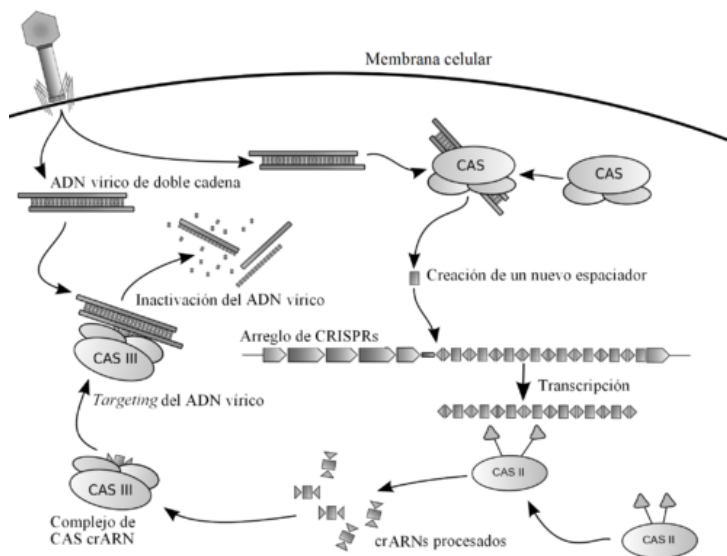


Figura 14. Procés de defensa bacteriana.

Després d'anys d'investigació i d'observació sobre aquest mètode, l'any 2012 un grup d'investigadors dirigits per *Emmanuelle Charpentier* i *Jennifer Doudna* es va publicar un article de la revista *Science* on es mostrava que era possible transformar CRISPR en una eina de modificació genètica, i com fer-ho.

### 3.4.3 Components del sistema CRISPR/Cas-9

Com ja hem comentat abans, aquest mecanisme/sistema de modificació genètica està compost per dues molècules, l'ARN guia, i la proteïna Cas-9. Cadascuna d'aquestes molècules té característiques importants per a la seva funció:

· **ARN guia:** La funció d'aquesta molècula és la d'acoblar-se a la proteïna Cas-9 i identificar-ne el gen diana (gen o seqüència que es vol modificar) i acoblar-se a ell. L'estructura d'aquesta cadena simple d'ARN formada per aproximadament 100 nucleòtids, es pot "dividir" en dues zones: La primera zona és la part de la cadena que s'uneix a l'enzim Cas-9, la seqüència de la qual és idèntica en tots els casos en el qual s'utilitza aquesta tècnica, i una altra zona composta per 20 nucleòtids la qual és l'encarregada de detectar i acoblar-se a la seqüència que es vol modificar.

· **Cas-9:** Aquesta proteïna/ enzim és l'encarregada de tallar les cadenes d'ADN en les operacions on intervé, està composta per un total de 1368 aminoàcids, dividit en dues parts, la primera que és la que s'acobla a l'ARN guia i l'altra és la que interactua amb l'ADN, tallant aquella secció específica.

### **3.5 Procés de modificació genètica**

Gràcies a la investigació durant anys s'ha aconseguit que aquest mecanisme de defensa bacteriana pugui ser usat per la modificació o correcció de seqüències o gens de l'ADN. El procés pel qual es pot utilitzar aquest complex de molècules per editar el genoma és el següent:

Primer s'estudia la malaltia, el gen, i la mutació que causa aquesta malaltia, i, per tant, determinar la base que canvia o el conjunt de nucleòtid que es veuen afectats, a partir d'aquí estudiar com seria la seqüència del gen sa per saber-hi com hem de canviar la mutació i com ha de quedar el gen després d'aplicar CRISPR. Una vegada estudiat tot això, ja es pot aplicar la tècnica, per poder començar amb l'aplicació s'ha de sintetitzar en un laboratori l'ARN guia que dirigirà la proteïna Cas-9 fins al gen mutat, posteriorment, junt amb la proteïna Cas-9 en un kit, generalment una injecció, posteriorment s'injecta en el teixit o el grup de cèl·lules on es troba la mutació, una vegada el kit CRISPR es troba dins de la cèl·lula, la proteïna Cas-9 és guiada al gen mutat gràcies a l'ARN guia (ja que és la seqüència complementaria al gen mutat), i una vegada l'ARN guia s'ha unit al gen mutat, aquesta unió és detectada per la proteïna Cas-9 i talla la cadena d'ADN, fent que la seqüència mutada del gen ja no estigui dins de la cadena.

A partir d'aquí, gràcies al fet que la mutació en la majoria dels casos només afecta una de les dues cadenes que conformen l'ADN, permet a la cèl·lula tenir una espècie de còpia de seguretat per poder reconstruir el gen original, el gen sa, la qual és la cadena complementària que en mantenir la seqüència complementària del gen sa, la cèl·lula l'utilitzarà per reconstruir el gen sa.

Posteriorment, s'activa el mecanisme de reparació de l'ADN que tenen totes les cèl·lules anomenat com HDR (*Homology Directed Repair*) quan es detecta el tall en la cadena d'ADN generat per l'enzim Cas-9, on la cèl·lula si disposa d'una seqüència del gen sa extra, aprofita per reparar la doble cadena.

Per exemple, amb la malaltia de l'anèmia sideroblàstica de tipus 1:

Primer hem d'investigar aquesta malaltia trobar en quin cromosoma, secció i gen es troba la mutació que causa aquesta malaltia, per poder trobar això fem ús de la font d'OMIM, en el cas de l'anèmia sideroblàstica de tipus 1, el gen mutat és el *ALAS2*, que es troba en el cromosoma X secció *p11.21*, i una de les mutacions al·lèliques que causa aquesta malaltia és *PHE165LEU*, això vol dir, que en la proteïna que s'expressa en el gen sa, en la posició 165 hi hauria una *fenilalanina*, però que degut a la mutació, la proteïna que s'expressa del gen mutat, en la seva posició 165 hi ha una *leucina*.

Sabent això, és necessari conèixer la seqüència d'aquest gen per poder aplicar CRISPR, per poder obtenir tota mena d'informació sobre la seqüència de l'ADN, com el CDS, com la cadena de polipèptids, utilitzem la font NCBI. Una vegada dins de NCBI, busquem el gen que causa aquesta malaltia, l'*ALAS2*, una vegada l'hem buscat, seleccionem l'espècie de la qual es vol investigar i tractar aquesta malaltia, en aquest exemple l'ésser humà (*Homo sapiens*), seleccionem l'espècie i després anem a l'apartat de *Genbank* on trobarem tota mena d'informació sobre aquest gen, entre altres coses, el que farem a servir, la seqüència de la cadena codificadora i el CDS. Per poder trobar el nucleòtid o la sèrie de nucleòtids que han canviat provocant que el gen muti s'utilitza el CDS, que ens proporciona en forma d'interval, els exons del gen, ja destacant els introns, en el cas d'aquesta malaltia, els intervals del CDS són els següents:

4978..5158, 6138..6260, 9704..9926, 10474..10658, 13313..13492, 15236..15400, 15963..16231, 17330..17492, 21635..21798

Una vegada tenim tots els intervals, s'han de buscar en la seqüència de bases del gen, la qual cosa quedaria d'aquesta manera:

Atg gtg act gca gcc atg ctg cta cag tgc tgc cca gtg ctt gcc cgg  
ggc ccc aca agc ctc cta ggc aag gtg gtt aag act cac cag ttc ctg  
ttt ggt att gga cgc tgt ccc atc ctg gct acc caa gga cca aac tgt  
tct caa atc cac ctt aag gca aca aag gct gga gga gat tct cca tct  
tgg gcg aag ggc cac tgt ccc ttc atg ctg tcg gaa ctc cag gat ggg  
aag agc aag att gtg cag aag gca gcc cca gaa gtc cag gaa gat gtg  
aag gct ttc aag aca gga aac tat gtc ttc agt tat gac cag ttt ttc  
agg gac aag atc atg gag aag aaa cag gat cac acc tac cgt gtg ttc  
aag act gtg aac cgc tgg gct gat gca tat ccc ttt gcc caa cat ttc  
tct gag gca tct gtg gcc tca aag gat gtg tcc gtc tgg tgt agt aat  
gat tac ctg ggc atg agc cga cac cct cag gtc ttg caa gcc aca ca...  
(encara hi hauria més seqüència, però el triplet mutat ja es  
troba en aquest grup, llavors no fa falta continuant afegint  
triplets).

Gràcies a la informació que ens proporciona OMIM sobre la mutació que causa aquesta malaltia (PHE165LEU) i sabent com funciona el codi genètic, és a dir, cada triplet de bases codifica per un aminoàcid, simplement falta contar triplets fins a arribar al triplet núm. 165 per trobar el triplet que mutarà, en aquest cas és el triplet TTC, aquest triplet és de la cadena codificadora, és a dir, és el de la cadena complementària de la qual ha patit la mutació, per tant, realment, la cadena que ha patit la mutació té una seqüència de AAG. Amb l'ajuda del codi genètic, podem interpretar i tractar d'intuir quina base nitrogenada serà la que canviarà provocant la mutació, el qual es fa de la següent manera: sabent que la secció codificant té la mateixa seqüència de bases que l'ARN missatger, però canviant les T per U, el triplet que canvia en l'ARNm és un UUC que en el codi genètic codifica per a la fenilalanina, però, sabent que aquesta mutació causa que aquest triplet passi de codificar per la fenilalanina a la leucina, s'ha de mirar en el codi genètic quins triplets són els que codifiquen per la leucina, els quals són els següents: UUA i UUG. Això vol dir, que la base nitrogenada que canvia, causant la mutació en el gen, és UUC (en l'ARN missatger), que passat a la cadena motlle és AAG, i que aquesta guanina canvia a una timina o a una citosina, en aquest cas perquè sigui més pràctic, escollim que la mutació hagi canviat la guanina a una timina, per la qual cosa, la cadena mutada ara té un triplet AAT, en comptes de tenir un AAG, que seria el triplet sa. Una vegada localitzat el nucleòtid exacte que canvia ja es pot aplicar CRISPR.

El primer pas per poder aplicar CRISPR és sintetitzar l'ARN guia que s'encarregarà de dirigir a la proteïna Cas-9 fins a la seqüència on es trobi el nucleòtid que causi la mutació. En aquest cas, i sabent que l'ARN guia està compost per dues parts, de les quals, una s'encarregava d'unir-se a la proteïna Cas-9, la seqüència de la qual és sempre la mateixa, en sentit 3' 5' és:

```
UUUUCGUGGCUGAGCCAGCGUGAAAAAGUUCAACUAUUGCCUGAUCGGAAUAA  
AAUUGAACGUAAAAGAUCGAGAUUUUG
```

(ja que en algunes zones hi ha complementarietat de bases, es creen pont d'hidrogen donant-li una estructura tridimensional més plegada).

En l'ADN es troba una petita seqüència de tres bases denominada PAM, la qual utilitzarà l'ARN guia per trobar la seqüència de l'ADN que es vol modificar, aquesta petita seqüència està formada per "NGG", sent N qualsevol bases (referint-se a NGG que es troba en la cadena codificant, no en la cadena motlle o mutada).

I just després de la secció de l'ARN guia que és sempre la mateixa, es troba la secció de l'ARN guia que s'encarregarà de reconèixer gràcies a la seva complementarietat de bases i d'unir-se formant ponts d'hidrogen, formada per un total de 23 bases nitrogenades que varien i són diferents depenent de la seqüència de bases de l'ADN diana que es vulgui modificar, i on el nucleòtid mutat es troba just en el mig d'aquesta seqüència, en el cas de l'anèmia sideroblàstica de tipus 1 seria de la següent manera: GCC CAA CAU UU A UCU GAG GCA UC (de 5' 3').

Per tant, ajuntant totes aquestes seccions en un mateix sentit (de 5' 3') quedaria un ARN guia amb la següent seqüència:

```
5' GCCCAACAUUU A UCUGAGGCAUC  
GUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG  
AAAAGUGCGACCGAGUCGGUGCUUUU 3'
```

Sent les **verdes**, les bases de la seqüència de nucleòtids específica i complementaria a la seqüència diana. En **vermell**, la base complementaria a la base mutada de la seqüència de l'ADN, i en **blaves**, la secció de l'ARN guia que és igual en tots els casos.

Una vegada es coneix la seqüència de l'ARN guia i s'ha sintetitzat a laboratori, només queda crear el Kit CRISPR afegint-li la proteïna Cas-9, i una vegada tot el Kit ha sigut

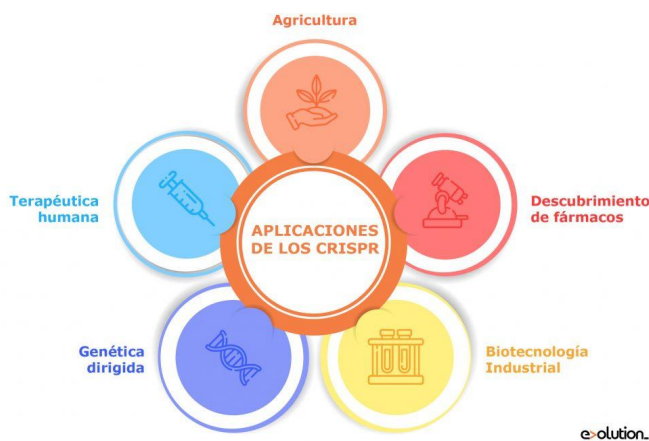


creat, ja pot funcionar plenament i ja pot induir-se en l'individu amb el fi de modificar el seu material genètic per curar, en aquest cas, la malaltia de l'anèmia sideroblàstica de tipus 1.

### **3.6 Aplicacions que té**

Aquesta nova tècnica de modificació genètica no només pot ser aplicada amb fins mèdics o d'investigació mèdica i científica, sinó que també es pot fer servir en diferents sectors com l'agricultura, ja que es pot utilitzar CRISPR per dotar a les plantes de característiques que les facin més aptes al medi ambient o a diferents característiques del seu entorn, com per exemple aportant-li a la planta una major resistència tant a les temperatures altes com a les baixes, o canviant algun gen que faci que siguin més perjudicials per als seus depredadors naturals. També es pot aplicar aquesta tècnica sobre el sector de la ramaderia, ja que com s'ha vist en les plantes, també es poden dotar de diferents característiques als animals perquè siguin més aptes al seu entorn.

Un altre sector on es pot aplicar CRISPR és en la biotecnologia industrial.



*Figura 15. Els diferents sectors on es pot aplicar CRISPR*

### **3.7 CRISPR en el Càncer**

Com ja s'està experimentant, una de les branques en les quals es pot aplicar CRISPR és la medicina, en la qual principalment s'utilitzaria per reparar aquests gens que estiguin mutats i per conseqüència causin malalties d'arrels genètiques.

Aquest treball de recerca està orientat en l'aplicació d'aquesta tècnica per tractar de curar les mutacions que deriven en càncer.

### **3.8 Que és el Càncer?**

El càncer es considera com un conjunt de malalties en les quals un nombre de cèl·lules anormals, mutades a causa d'una sèrie de mutacions en uns gens específics, on són afectades múltiples activitats cel·lulars, com la reparació de l'ADN, la mort cel·lular, etc., es divideixen sense cap mena de control, formant una massa o aglomeració de cèl·lules denominada com a tumor, la qual pot tenir la capacitat d'escampar-se per diverses parts de cos, infectant i destruint diferents teixits, quan aquesta malaltia arriba a aquest punt ja es considera un càncer.

Les cèl·lules canceroses tenen les següents característiques principals:

- Capacitat alta de proliferació.
- Inhibició de la mort cel·lular programada (apoptosis).
- Immortalitat replicativa.
- Metàstasis.
- inestabilitat genètica (que comporta a l'adquisició de mutacions).

#### **3.8.1 Tipus de tumors i de càncers**

Hi ha dos tipus de tumors diferents, els denominats tumors benignes, que són els que se situen en un lloc i en un teixit determinat, sense arribar a escampar-se i infectar diversos teixits en diferents parts del cos, cosa que no provoca un càncer, i en general, aquest tipus de tumors es poden extreure mitjançant cirurgies. Normalment, aquests tipus de tumors no solen tornar a aparèixer.

En canvi, els coneguts com a tumors malignes són els que comencen en una zona del cos determinada, en un teixit específic, però posteriorment, mitjançant un procés

denominat com a metàstasi s'escampen a través dels tubs sanguinis i limfàtics infectant i creant altres tumors sòlids en els teixits propers o, amb menys possibilitats, en zones més allunyades en el cos. Aquests tipus de tumors, són els que creen un càncer que, en contres dels tumors benignes, el problema no desapareix amb cirurgia, ja que encara que es pot extreure els tumors sòlids que hagin sigut creats, degut a la metàstasi, és possible que el càncer torni a aparèixer.

Segons el teixit que sigui afectat pel tumor, els càncers es poden classificar de la següent manera:

· **Carcinomes:** Són tots els tipus de càncers que s'originen en cèl·lules epitelials (tots els teixits i diferents parts de la pell.)

· **Sarcomes:** Són els tipus de càncers que apareixen en els teixits conjuntius, musculars, ossi i cartilaginós.

· **Leucèmics:** Són els que apareixen en les cèl·lules hematopoètiques.

· **Neuroblastomes i glioblastomes:** Són els càncers que s'originen en els teixits nerviosos.

### **3.9 Com es forma el càncer?**

Les cèl·lules tumorals (les que componen un tumor), són clons de cèl·lules, el que vol dir que es desenvolupen a partir d'una única cèl·lula que sofreix les mutacions exactes perquè comenci a proliferar descontroladament.

Generalment, aquesta cèl·lula no acumula totes les mutacions o alteracions que donen lloc a un càncer al principi, sinó que les va acumulant d'una manera progressiva, cosa que fa que el desenvolupament d'un càncer es pugui dividir en moltes etapes diferents on les cèl·lules van mutant, i, per tant, adquirint les alteracions on augmenta la divisió cel·lular, la proliferació, i posteriorment la metàstasi.

La primera etapa de formació d'un tumor és deguda a la mutació que provoca una proliferació anormal en la cèl·lula, cosa que fa que aquesta cèl·lula comenci a dividir-se creant molts clons, les següents etapes es produiran quan les cèl·lules vagin acumulant més mutacions, fet que és molt possible a causa del fet que les cèl·lules que es divideixen d'una manera ràpida i continua tenen una inestabilitat genètica major a la resta, ja que l'ADN està implicat en moltes etapes de la divisió cel·lular, on pateix canvis d'estructura i d'empaquetament, cosa que el fa molt susceptible a adquirir noves mutacions. Si alguna d'aquestes mutacions li aporta a la cèl·lula alguna característica selectiva per sobre de la resta, les cèl·lules que surtin d'aquesta acabaran dominant la població en un procés denominat com selecció clonal, molt semblant a la selecció natural en el procés evolutiu.

Posteriorment i a causa de la divisió descontrolada de les cèl·lules tumorals, poden acabar arribant a algun vas sanguini o limfàtic, formant un nou tumor en una altra part del cos.

### **3.9.1 Gens implicats en l'aparició de tumors**

Les mutacions que principalment contribueixen a l'aparició d'un tumor i posteriorment un possible càncer, apareixen principalment en tres gens específics, que són els encarregats de l'afavoriment del creixement i la divisió cel·lular, i de la inhibició d'aquesta, i la reparació de l'ADN, anomenats respectivament com protooncogens, gens supressors de tumors i gen de reparació de l'ADN. Explicat amb una analogia vindria sent com els acceleradors d'un cotxe (protooncogens) i els frens (gens supressors de tumors), i una caixa d'eines (gen de reparació de l'ADN).

Però no totes les cèl·lules canceroses tenen només aquestes dues mutacions, sinó que també hi ha més mutacions en altres gens que contribueixen a l'aparició del càncer.

### **· Protooncogens:**

Són els gens que s'encarreguen d'estimular la divisió cel·lular, que a causa de mutacions, es poden acabar transformant en uns gens denominats oncògens, poden activar-se en moments inadequats o fer que hi hagi més activitat de la normal, fent que la cèl·lula es divideixi molt més o fent que sobrevisqui quan no hi hauria.

### **· Gens supressors de tumors:**

Aquests gens funcionen com a frens de la proliferació cel·lular, llavors si s'inactiven aquests gens per culpa d'alguna mutació, la divisió cel·lular es descontrolaria, provocant la formació d'un tumor. Les mutacions que afecten aquest gen són recessives, és a dir, que perquè la inhibició que generen els gens supressors de tumors deixi de funcionar, han de mutar les dues còpies dels gens que té cada individu, una en el cromosoma del pare, i l'altra en el de la mare.

### **· Gen de reparació de l'ADN**

Aquests gens, com el seu propi nom indica, són els que contenen la informació que en expressar-se, se sintetitzen proteïnes i enzims que són els encarregats de reparar les seqüències dels gens. Les cèl·lules que pateixen mutacions en aquests gens, com no poden expressar la informació per reparar altres gens, solen començar a acumular més mutacions en altres gens i canvis en l'estructura dels cromosomes, com per exemple fragments de cromosomes que es repeteixen, seccions que faltes; o també canvis en els patrons de la metilació de l'ADN, o en l'empaquetament d'aquest.

## **3.9.2 Causes del càncer:**

Com ja hem vist, tot el procés d'aparició i de desenvolupament d'un càncer és molt complex i requereix molts passos seqüencials perquè es doni a terme, en canvi, hi ha molts factors que poden afavorir i influir en l'aparició d'aquests, que són els següents:

· **Les característiques genètiques de l'individu:** Encara que el càncer no és una malaltia hereditària, hi ha una sèrie de mutacions principalment en els gens mencionats amb anterioritat (gens supressors de tumors i gen de reparació de l'ADN) que sí que es poden passar de generació en generació i que incrementen les possibilitats que un individu acabi desenvolupant un càncer. Estudis afirmen que entre el 5% i el 10% de tumors malignes tenen un component hereditari.

· **Les condicions del medi ambient:** Aquestes causes tenen a veure amb l'estil de vida de cada persona i amb l'exposició a factors de risc de l'ambient, és a dir, si un individu té obesitat, menja una dieta rica en greixos, no fa exercici, està la majoria del temps sense moure's, fuma tabac, el qual conté més de 4.000 substàncies químiques, de les quals 250 són nocives, i 50 cancerígenes, la qual cosa comporta a un major risc de patir càncers de pulmó, de tota mena de teixits situats en la cavitat oral i de tot el tracte respiratori, també si s'exposa molt a la radiació ultraviolada del sol, o a la radiació en general, tindrà moltes més possibilitats de patir un futur càncer que un individu que no fumi, faci exercici, que mengi una dieta variada, i que no s'exposi a cap mena de radiació perjudicial.

· **Infecions d'alguns virus:** Hi han estudis que demostren que un aproximat del 15% dels càncers humans són causats degut als virus, ja que a l'hora d'infectar a les cèl·lules, són capaços de produir alteracions en el control de la divisió cel·lular, de manera que augmenta dràsticament la proliferació d'aquestes. Els virus associats als càncers humans són els següents: El papil·lomavirus (relacionat amb el càncer del coll de l'úter), virus de l'hepatitis B (associat al càncer de fetge), l'anomenat com a Epstein-Barr (associat al limfoma de Burkitt), i per últim el citomegalovirus (associat al sarcoma de Kaposi).

### **3.10 Tractament del càncer**

Hi ha molts tipus diferents de tractaments contra el càncer, que depenent del tipus i de l'estat avançat que es trobi, l'individu rebrà un tractament o un altre.

En alguns casos, algunes persones només necessiten un tractament, com per exemple la quirúrgica, però en molts altres casos, s'utilitzen combinacions de tractaments.

Els tipus de tractaments en contra del càncer són els següents:

#### **3.10.1 Tots els tractaments**

· **Cirurgia:** En aquest tractament el cirurgià extirpa el càncer del cos de l'individu, i normalment, també una fracció dels teixits propers al càncer per evitar el risc que torni a aparèixer el càncer en un futur. Principalment, s'efectua amb bisturís, encara que hi ha variacions en aquest tractament on no es fa servir bisturí, com per exemple la cirurgia làser, on es fa ús un làser que proporciona molta precisió a l'hora d'extirpar el tumor, una altra variant d'aquest tractament és la hipertèrmia, la qual és una tècnica on s'aplica altes temperatures en zones determinades del cos per destruir les cèl·lules canceroses, i per últim, la teràpia fotodinàmica, la qual fa servir fàrmacs que reaccionen amb un tipus determinat de llum, i quan el tumor s'exposa a aquesta llum, els fàrmacs s'activen, matant a les cèl·lules canceroses properes.

Aquest tractament i totes les seves variants es fa servir més i té molta més eficàcia en tumors sòlids, que es troben en un punt o en una regió específica (tumors benignes), en canvi, la cirurgia és molt poc efectiva en càncers que s'han escampat per tot el cos com la leucèmia, o en tumors malignes, ja que encara que hi hagi tumors que es puguin extreure amb aquest tractament, si hi ha hagut metàstasi, hi ha molta probabilitat que posteriorment.

· **Quimioteràpia:** Aquesta tècnica tracta de la ingesta de fàrmacs específics per eliminar les cèl·lules canceroses, els quals poden ser administrats de moltes maneres diferents, que poden ser, de manera oral, en forma d'injecció o a través de via intravenosa.

La funció d'aquesta tècnica és la d'aturar o alentir la divisió i proliferació de les cèl·lules canceroses.

Aquest tractament és un dels més freqüents i del que més gent rep, ja que és un dels que es poden aplicar en molts càncers diferents, encara que s'hagi provocat la metastasi, i també és un dels mètodes més útils a l'hora de combatre aquesta malaltia. Moltes vegades, aquest tractament és l'únic que reben algunes persones, però els altres casos, es pot acabar combinant amb altres per poder assegurar més la desaparició del càncer.

Un dels majors desavantatges d'aquesta teràpia són els efectes secundaris que té, aquesta tècnica no només para el desenvolupament de les cèl·lules canceroses, sinó que també alenteix els cicles cel·lulars de les cèl·lules sanes que es desenvolupen amb rapidesa, com per exemple les cèl·lules que fan créixer el cabell, o les de l'intestí. Aquests danys poden causar efectes secundaris com nàusees, vòmits, caiguda del cabell, malestar general, falta de força, etc. Aquests efectes secundaris solen desaparèixer una vegada ha acabat la quimioteràpia.

· **Radioteràpia:** Aquesta tècnica tracta d'utilitzar dosis radioactives, que poden ser partícules, pastilles, radiografies o llavors radioactives, per erradicar i eliminar les cèl·lules canceroses, gràcies al factor que la radiació pot perjudicar més a les cèl·lules que es divideixen i proliferen més ràpidament, com són les canceroses.

Aquestes dosis de radiació s'encarreguen de danyar l'ADN de les cèl·lules canceroses, fet que fa que deixin de dividir-se, i que eventualment morin.

Hi ha dos tipus de radioteràpia, l'externa i la interna, però per saber quina de les dues és necessària en cada individu, primer s'ha d'estudiar les característiques del tumor o del càncer.

-Radioteràpia externa: En aquest tipus de radioteràpia, una màquina indueix radiació, en forma de raigs X a una zona determinada del cos, on es trobi el tumor que es vol eliminar, el problema amb aquest tipus de radioteràpia és que actua de manera local, és a dir, que serveix per a tumors que es troben en un lloc o en una zona exacta del cos, per tant, no és gens efectiva contra càncers com la leucèmia o tumors en metastasi.



-Radioteràpia interna: Aquest tipus tracta d'induir la font de radiació dins del cos, sobre o a prop del tumor. Aquesta font pot ser sòlida, denominada braquiteràpia, consisteix a col·locar una llavor, una pastilla o una càpsula que irradia radiació, i posa a prop del tumor, o pot ser líquida, on s'anomena teràpia sintètica, en aquesta tècnica, s'injecta la substància radioactiva en la sang i es dirigeix on es troba el tumor.

Una de les complicacions més grans que pot arribar a tenir aquesta teràpia és que a causa de l'ús de radiació com a mètode per eliminar el càncer, cèl·lules sanes que es trobin al voltant del tumor, també poden acabar rebent radiació, cosa que incrementa les probabilitats que sorgeixi un altre tumor o càncer en aquestes zones.

- Immunoteràpia: Aquest tipus de tractament depèn del sistema immunitari, on s'utilitzen substàncies sintetitzades a laboratori per poder ajudar i reforçar el nostre sistema a combatre contra el càncer. Dins del sistema immunitari hi ha unes cèl·lules denominades limfòcits infiltrants de tumors (TIL), les persones en les quals es detecten aquestes cèl·lules solen anar millor en la lluita contra el càncer que les que no. Hi ha molts tipus diferents d'immunoteràpia. Però hi ha molts casos en els que les cèl·lules canceroses, a causa de mutacions, poden evitar ser destruïdes pel sistema immunitari.

Hi ha diversos tipus d'immunoteràpies:

-Inhibidors de punts de control: Dins del sistema immunitari hi ha uns components denominats punts de control, que en estar actius debiliten les respostes immunitàries del cos, aquest tractament, mitjançant fàrmacs, inhibeixen aquests punts de control, fent que enforteix el sistema immunitari.

-Teràpia de transferència de cèl·lules T: En aquesta tècnica es fan servir unes cèl·lules naturals del sistema immunitari denominades limfòcits T, que s'encarreguen d'atacar a les cèl·lules tumorals, s'agafen aquestes cèl·lules del tumor de l'individu, i es modifiquen a laboratori, implementant modificacions genètiques, i mitjançant colònies de cèl·lules, es creen grups nombrosos de limfòcits T que ataquen millor a les cèl·lules canceroses.

-Anticossos monoclonals: En aquesta teràpia se sintetitzen unes proteïnes específiques que s'unirien a zones o molècules específiques de les cèl·lules canceroses, marcant-les i fent les més visibles al sistema immunitari.

-Vacunes de tractament: Aquestes vacunes simplement agregen substàncies moleculars que ajuden al sistema immunitari a combatre el càncer.

-Immunomoduladors: Són substàncies que s'encarreguen d'intensificar la resposta immunitària en la lluita contra el càncer, enfortint en alguns casos i depenent de la substància a parts molt específiques del sistema immunitari o a tot el conjunt del sistema.

Aquest tipus de teràpia i totes les seves variants són molt utilitzades i efectives en molts tipus de càncers diferents, tant en tumors benignes, com en càncers on no hi ha hagut molta metàstasi o en càncers que s'han escampat molt pel cos. Aquesta teràpia no se sol aplicar juntament amb altres tècniques com la cirurgia o la quimioteràpia. A causa de l'enfortiment i optimització del sistema immunitari per a la lluita contra el càncer, moltes vegades les cèl·lules d'aquest sistema comencen a atacar i eliminar algunes cèl·lules de teixits sans, causant efectes secundaris.

**- Teràpies hormonals:** Aquesta teràpia s'empra principalment en càncers específics, com per exemple el càncer de mama o el càncer de pròstata, ja que aquests tipus de càncers s'alimenten de les hormones produïdes pel cos. Aquesta tècnica fa servir fàrmacs que detenen o bloquegen la producció d'hormones naturals en el nostre cos, cosa que fa que aquests càncers no es puguin alimentar frenant el seu creixement i la seva proliferació. Hi ha casos en el que aquesta teràpia es pot aplicar juntament amb altres perquè la lluita sigui més efectiva, per exemple, es pot reduir la grandària del càncer o el tumor mitjançant cirurgia o radioteràpia, i posteriorment aplicar les teràpies hormonals.

**- Teràpies dirigides:** Aquest conjunt de teràpies es concentren en les teràpies i les intervencions de precisió, actuen principalment sobre els factors o proteïnes de creixement i de divisió que tenen les cèl·lules canceroses, sense danyar els teixits sans.

En aquests tipus de teràpies s'utilitzen principalment medicaments o substàncies micromoleculares que, gràcies a la seva mida, són capaços d'entrar en les cèl·lules canceroses i que actuen sobre l'objectiu, que en aquest cas són els factors de creixement i proliferació dels tumors, des de dins de les cèl·lules, eliminant-los, o corregint-los, fent que no es puguin propagar més, i que sigui molt més fàcil d'eliminar. Aquestes teràpies es fan servir en molts tipus de càncers diferents, però primer, s'haurà de fer un estudi sobre les característiques del càncer de l'individu per veure si té els requisits pels quals es puguin implementar aquests medicaments.

Com ja s'ha comentat, aquest tractament actua sobre les proteïnes que doten a les cèl·lules canceroses d'una alta divisió cel·lular i un creixement accelerat, i els medicaments utilitzats en aquesta teràpia poden tenir diferents finalitats:

-Pot ajudar al sistema immunitari a lluitar contra les cèl·lules canceroses, ja que si es formen les cèl·lules canceroses és perquè hi ha mutat, i s'han pogut amagar del sistema immunitari, per tant, els medicaments marcarien aquestes cèl·lules canceroses d'alguna manera perquè siguin més fàcils de detectar.

-Poden provocar la mort cel·lular sobre les cèl·lules canceroses, pel fet que una de les mutacions que apareix en les cèl·lules canceroses és en el gen on està escrita la informació per l'apoptosi (mort cel·lular programada), en conseqüència, a l'estar mutat no es pot expressar la informació i no es pot dur a terme

-Poden intervenir en les proteïnes de la superfície cel·lular encarregades d'enviar senyals a la cèl·lula dient quan s'han de dividir, en cèl·lules canceroses aquestes proteïnes estan mutades, cosa que fa que envien senyals quan no toca, els medicaments actuarien sobre aquestes proteïnes, impedit que enviïn aquest senyal.

-Com ja s'ha comentat en la teràpia hormonal, es pot fer que els medicaments inhibeixin la producció d'hormones perquè els càncers que s'alimenten d'aquestes no tinguin aliments.

Encara hi ha més maneres en les quals poden ajudar les teràpies dirigides. Aquestes teràpies poden aplicar-se juntament amb altres per poder optimitzar i fer més efectiva la lluita contra el càncer, ja que en alguns casos, aquestes per si soles tenen alguns desavantatges en forma d'efectes secundaris, entre els més comuns es troben problemes en la coagulació de la sang, diarrea, fatiga, pressió arterial elevada, problemes del fetge, etc.

### **3.10.2 Com pot ajudar CRISPR?**

Una vegada explicats el funcionament i classificats tots els tipus de tractament i, en quin grup es pot classificar i com pot ajudar a lluitar contra el càncer l'eina molecular CRISPR?

Estudis científics han demostrat mitjançant molta teoria i molts experiments, que hi ha diverses maneres diferents en les quals es pot aplicar CRISPR per ajudar al nostre cos a lluitar contra el càncer.

El científic Carl June i el seu grup d'investigadors de la universitat de Pennsilvània, van fer un experiment amb tres pacients que patien de càncer, més concretament d'un mieloma i un sarcoma amb metàstasi on van extreure limfòcits T dels pacients de l'experiment, i posteriorment, aplicant la tecnologia CRISPR van modificar tres gens en aquestes cèl·lules, més concretament els gens PD1, TRAC, i TRBC, que si s'activaven, eren capaços d'impedir que els limfòcits T detectaren i ataquessin a les cèl·lules canceroses, i posteriorment s'introdueixen en els limfòcits T un vector víric que en expressar la informació que contenien se sintetitzaven unes proteïnes que ajudava als limfòcits a reconèixer les cèl·lules canceroses. Els resultats d'aquest experiment van demostrar que aquests nous limfòcits, anomenats NYCE, romanien en la sang dels individus molt més temps que les cèl·lules sense modificar, i també es va demostrar que no hi havia cap reacció negativa dels individus o del seu cos. Aquesta tècnica es podria classificar dins de les teràpies d'immunologia, ja es modifica una de les cèl·lules que pertanyen a aquest sistema del cos humà, perquè lluita contra el càncer d'una manera molt més efectiva.

Però CRISPR no només es pot aplicar d'aquesta manera per combatre al càncer, també hi ha estudis científics on aplicant la tècnica CRISPR/Cas-9 directament en els tumors o en les cèl·lules canceroses, amb l'objectiu de trencar o reparar els gens que li proporcionen les seves característiques de proliferació o de divisió elevada. Aquest mètode té alguns inconvenients més en comparació amb el mètode dels limfòcits T modificats, ja que en casos com els tumors sòlids, no hi ha molta complicació a l'hora de fer arribar el complex CRISPR fins a les cèl·lules diana, i modificar o eliminar els gens mutats (també depenent d'on es trobi el tumor), així i tot, en càncers amb metastasi és més complicat, pel fet que per transportar tot el complex fins a les cèl·lules canceroses que circulen pels vasos sanguinis i limfàtics i que posteriorment poden donar lloc a un altre tumor, és complicat, tot i que, aquesta tècnica pot arribar a ser molt més efectiva que la de limfòcits T modificats.

Dan Peer i el seu equip d'investigació de la Universitat de Tel-Aviv, en col·laboració amb la universitat de Nova York i Harvard podrien haver-hi trobat una solució a aquest problema de transport, les denominades nanopartícules carregades.

Aquestes nanopartícules posseeixen una càrrega elèctrica positiva que porten en el seu interior tot el kit CRISPR/Cas-9.

Aquest grup d'investigació va fer un experiment provant aquesta nova manera de transport del kit CRISPR en un gen en concret, un que codificava per una proteïna present, i molt important en el procés de mitosi, anomenada PLK1, l'objectiu de l'experiment era eliminar el gen que codificava per aquesta proteïna utilitzant la tècnica CRISPR/Cas-9 i les nanopartícules carregades de manera que aquesta proteïna no podria ser sintetitzada i, per tant, pararia el cicle cel·lular i posteriorment la mort cel·lular en les cèl·lules canceroses que perdessin aquest gen.

Aquest experiment es va fer en dos models d'animals que posseïen dues neoplàsies diferents, però a la vegada molt agressius, un d'ells tenia glioblastoma cerebral, i l'altre càncer d'ovaris metastàtic.

En el primer grup d'individus, el del glioblastoma cerebral, es va injectar directament tot el kit CRISPR/Cas-9 juntament amb les nanopartícules carregades en el tumor, i dos dies després, es veia que en un 68% de les cèl·lules que componien aquell tumor, havien patit una modificació en el gen que codifica per a PLK1.

Això va provocar que el cicle cel·lular en més de la meitat de les cèl·lules canceroses i, per tant, que es detingués considerablement el creixement del tumor.

En canvi, en el segon grup d'animals, els que tenien càncer d'ovari metastàtic, pel fet que no només es trobaven les cèl·lules en un punt específic, sinó que a causa de la metastasi alguns grups de cèl·lules canceroses per altres zones del cos, s'hauria de fer arribar el kit CRISPR/Cas-9 i les nanopartícules carregades fins a aquestes cèl·lules sense que entressin en cèl·lules sanes, els investigadors van recobrir tot el kit en anticossos que eren capaços de reconèixer una sèrie de proteïnes que es trobaven en la cara externa de les membranes cel·lulars de les cèl·lules tumorals.

Uns deu dies després de l'experiment van donar uns sorprenents resultats, un 82% de les cèl·lules van rebre la modificació genètica, cosa que va inhibir el seu cicle cel·lular i, per tant, van detenir la seva proliferació i escampament, i van augmentar en un 80% la capacitat de supervivència dels animals als quals se li va fer l'experiment.

Després de l'experiment no es va detectar cap mena d'efecte secundari causat per nanopartícules carregades. Aquest tipus de tècnica es pot classificar dins de les teràpies dirigides, ja que actua directament sobre els gens que codifiquen les proteïnes que li proporcionen a les cèl·lules canceroses les seves característiques d'alta proliferació i d'una divisió elevada, i també com que depenent del tipus de càncer i de les seves característiques, aquesta tècnica es pot aplicar amb algunes variacions, per exemple, si el càncer que es vol erradicar és un càncer pulmonar on hi ha hagut metastasi, com que no és el mateix teixit que el d'ovaris com en l'experiment, és molt probable, que els anticossos que s'utilitzin per poder fer que el kit CRISPR/Cas-9 entri només en les cèl·lules canceroses que es volen eliminar, siguin diferents dels anticossos aplicats en l'experiment prèviament mencionat.

## 4. Marc pràctica

### 4.1 Explicació de la part pràctica

La part pràctica d'aquest treball de recerca consisteix a aplicar teòricament, és a dir, a paper, la tècnica de CRISPR/Cas-9 en una mutació d'un gen específic la qual derivi en un càncer.

Mitjançant la informació que proporciona el lloc web d'OMIM, escolliré un càncer determinat, posteriorment aniré a l'entrada web d'aquest càncer per poder observar a quin gen està lligat, i seguidament entraré a la informació d'aquest gen en OMIM, el següent pas serà mirar totes les mutacions d'aquest gen que poden acabar derivant en un càncer, i escollir-ne una, fixar-nos en quin aminoàcid canvia a causa de la mutació i en quina posició es troba aquest aminoàcid dins de la cadena polipeptídica, exemple **SER24ARG**. Una vegada s'ha seleccionat un càncer i una mutació que el pot causar, amb la informació que proveeix NCBI, s'ha de buscar el gen que causa el càncer que es vol estudiar, i una vegada es troba, s'entra al lloc web on està la seva seqüència de nucleòtids, entre altres coses, també ens proporcionen el CDS (*Codifying section*), és a dir, la cadena d'ARN missatger, formada només per exons, que quedarà després de tots els processos d'expressió de la informació genètica i de la maduració de l'ARN missatger. Amb tota aquesta informació s'ha de reconstruir la seqüència d'aquest ARN missatger madur, ja que per poder trobar la mutació és necessari. Una vegada reconstruït l'ARN missatger s'ha de separar la seqüència en triplets, és a dir en grups de tres lletres, per poder detectar més fàcilment en quin triplet en específic es troba la mutació. Una vegada ja està separat en triplets, s'aplica els coneixements sobre el codi genètic i la informació que s'ha tret d'OMIM, és a dir, sabent que el codi genètic funciona de manera que cada tres bases és un aminoàcid, i observem en la informació de la mutació ens diu en quina posició es troba l'aminoàcid que ha mutat, s'ha d'anar contant triplets fins a arribar a la posició indicada, seguint l'exemple anterior, contar fins al triplet núm. 24, ja que l'aminoàcid que canvia és el núm. 24. Un cop trobat el triplet que muta, estudiem la seva seqüència i la comparem amb la del codi genètic per veure si, en aquest cas el triplet núm. 24 codifica per a serina, per exemple el AGC, i a partir d'aquí, busquem en el codi genètic tots els triplets que codifiquin per l'aminoàcid al qual canvia a causa de la mutació, en aquest

cas l'arginina, i són els següents: AGA, AGG. El següent pas serà escollir un d'aquests, ja que per culpa de la falta de material i d'informació, no se sap clarament quin és. I gràcies a comparar el triplet sa del triplet mutat, es pot saber quin és el nucleòtid exacte que canvia, en aquest cas canvia la C del triplet sa a una A o una G. I per últim, només falta recrear la seqüència de l'ARN guia que anirà juntament amb l'enzim Cas-9, la qual serà complementària a la secció del gen que es vulgui modificar, és a dir, on es trobi la mutació, i aquesta mutació anirà en el centre d'aquest ARN guia.



## 4.2 Part pràctica

En aquesta part pràctica s'estudiarà el càncer de còlon de tipus 2.

Gràcies a la informació que ens aporta OMIM sabem que aquest càncer està lligat al gen MLH1, el qual es troba en el cromosoma 3, braç p, secció 22.2.

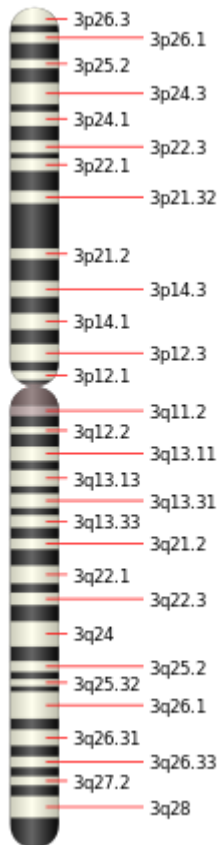


Figura 16. Imatge del cromosoma 3 humà.

Una de les mutacions al·lèliques que la causen és la següent: **SER44PHE**, el que vol dir que dins de la cadena polipeptídica que està codificada dins d'aquest gen, l'aminoàcid que es troba en la posició 44, que en el gen sa és una serina, a causa de la mutació, ha canviat, i ara aquest triplet mutat codifica per a la fenilalanina.

Una vegada sabem això, necessitem saber la seqüència del gen, que gràcies a NCBI podem obtenir això i més coses necessàries com la CDS.

Una vegada ja hem entrat a NCBI, seleccionem en la finestra de dalt a l'esquerra la secció de gene, i en la barra de cerca busquem el gen MLH1. Un cop estem en l'entrada d'aquest gen, seleccionem l'espècie d'ésser viu en el qual es vol estudiar la malaltia, en aquest cas l'ésser humà (*Homo sapiens*).

Després, dins de la pantalla del gen MLH1 de l'èsser humà, entrem en l'apartat denominat com *genbank*.

The screenshot displays the NCBI Gene page for the human MLH1 gene. At the top, a table lists two versions: 'current' (GRCh38.p13) and 'previous assembly' (GRCh37.p13). Below this is a genomic map of Chromosome 3 showing the MLH1 gene and surrounding features like EPMDRIP1, RPL29P1, LRRFP2, and RNU6-1391P. The main section, 'Genomic regions, transcripts, and products', shows the genomic sequence for NC\_000003.12. A navigation bar includes 'Go to nucleotide' with options for 'Graphics', 'FAST', and 'GenBank' (highlighted in a blue circle). The main content area shows the gene structure with exons and introns, and a list of transcripts including NP\_060300.1 and XP\_024309592.1.

Figura 17. Caràtula de la pàgina de NCBI del gen MLH1.

Dins d'aquest apartat trobarem la seqüència de la cadena codificadora del gen sa, la qual es complementaria al gen i antiparalela, fet que fa molt més fàcil la reconstrucció de l'ARN missatger ja se sintetitza en el mateix sentit que la cadena codificadora, de 3' 5', i que només s'han de substituir les T per U, composta per més de 57000 bases, la CDS (hi ha més d'una CDS ja que aquest gen s'expressa en més d'un teixit, però en ser teixits diferents, aquest gen es pot expressar de manera lleugerament diferent), l'ARN missatger, etc. Però només necessitarem la seqüència i la CDS.

Observem la CDS, la qual ens proporciona els intervals de la seqüència del gen on es troben els exons, per tant, gràcies a això es pot reconstruir l'ARN missatger ja amb els introns eliminats. En aquest cas la CDS diu que els exons de l'ARN missatger es troben en aquests intervals:

62..177,3133..3223,7469..7567,10915..10988,13505..13577,15328..  
15419,18334..18376,18525..18613,20946..21058,24020..24113,26824  
..26977,32151..32521,35298..35446,46700..46808,48782..48845,540  
33..54197,55031..55123,55418..55531,57000..57167

**Amb aquests intervals podem reconstruir la seqüència de la cadena codificadora, que és la següent:**

.62...177:atgtcgttc gtggcagggg ttattcggcg gctggacgag acagtgggtga  
accgcatcgc ggcgggggaa gttatccagc ggccagctaa tgctatcaaa  
gagatgattg agaactg

.3133...3223:tttagatg caaaatccac aagtattcaa gtgattgtta aagagggagg  
cctgaagttg attcagatcc aagacaatgg caccgggatc agg

.7469...7567: aa agaagatctg gatattgtat gtgaaaggtt cactactagt  
aaactgcagt cctttgagga ttagccagt atttctacct atggctttcg aggtgag

.10925...10988: gcataa gccatgtggc tcatgttact attacaacga aacagctga  
tggaaagtgt gcatacag

.13505...13577: agcaag ttactcagat ggaaaactga aagcccctcc taaacctgt  
gctggcaatc aagggaccca gatcacg

.15328...15419: gtg gaggacctt tttacaacat agccacgagg agaaaagctt  
taaaaaatcc aagtgaagaa tatgggaaaa ttttggaagt tgttggcag

.18334...18376: gtattca gtacacaatg caggcattag tttctcagtt aaaaaa

.18525...18613: caagga gagacagtag ctgatgttag gacactaccc aatgcctcaa  
ccgtggacaa tattcgctcc atctttggaa atgctgtag tcg

.20946...21058: agaac tgatagaaat tggatgtgag gataaaaccc tagccttcaa  
aatgaatggt

tacatatcca atgcaaacta ctcagtgaag aagtgcactt tcttactctt catcaacc

.24028...24113: a tcgtctggta gaatcaactt ccttgagaaa agccatagaa  
acagtgtatg cagcctattht gcccaaaaac acacacccat tcctgtacct cag

.26824...26977: tttagaa atcagtcctc agaatgtgga tgtaaatgtg cacccacaa  
agcatgaagt tcacttcctg cacgaggaga gcatcctgga gcgggtgcag  
cagcacatcg agagcaagct cctgggctcc aattcctcca ggatgtactt cacccag

.32151...32521: actttgctac caggacttgc tggcccctct ggggagatgg  
ttaaatccac aacaagtctg acctcgtctt ctacttctgg aagtagtgat  
aaggtctatg cccaccagat ggttcgtaca gattcccggg aacagaagct  
tgatgcattt ctgcagcctc tgagcaaacc cctgtccagt cagccccagg  
ccattgtcac agaggataag acagatattt ctagtggcag ggctaggcag  
caagatgagg agatgcttga actcccagcc cctgctgaag tggctgcaa  
aatcagagc ttggaggggg atacaacaaa ggggacttca gaaatgtcag  
agaagagagg acctacttcc agcaacccca g

.35298...35446: aaa gagacatcgg gaagattctg atgtggaaat ggtggaagat  
gattcccga aaggaaatgac tgcagcttgt accccccgga gaaggatcat  
taacctcact agtgthttga gtctccagga agaaattaat gagcaggac atgagg

.46700...46808: t tctccgggag atgttgcata accactcctt cgtgggctgt  
gtgaatcctc agtgggcctt ggcacagcat caaccaagt tataccttct  
caacaccacc aagcttag

.48782...48845: tgaagaact gttctaccag atactcattt atgattttgc  
caattttggg gttctcaggt tatcg

.54033...54197: gagccagc accgctcttt gaccttgcca tgcttgcctt agatagtcca  
gagagtggct ggacagagga agatggctcc aagaaggac ttgctgaata  
cattgttgag tttctgaaga agaaggctga gatgcttgca gactatttct  
ctttggaat tgatgag

.55031...55123:gaagggaaacc tgattggatt accccttctg attgacaact  
atgtgcccc  
tttggaggga ctgcctatct tcattcttcg actagccact gag

.55418...55531:gtg aattgggacg aagaaaagga atgttttgaa agcctcagta  
aagaatgcg tatgttctat tccatccgga agcagtacat atctgaggag  
tcgaccctct caggccagca g

.57000...57167: a gtgaagtgcc tggctccatt ccaaactcct ggaagtggac  
tgtggaacac attgtctata aagccttgcg ctcacacatt ctgcctccta  
aacatttcac agaagatgga aatatcctgc  
agcttgctaa cctgcctgat ctatacaaag tctttgagag gtgttaa

Una vegada ja s'han extret els exons de la cadena codificadora del gen, es reconstrueix l'ARN missatger separant els exons en triplets i substituint les timines per uracils, una vegada ja està separat en triplets, busquem el triplet núm. 44, ja que és el que haurà mutat, canviant l'aminoàcid que es troba és aquesta posició, i tornant inservible a la proteïna:

aug ucg uuc gug gca ggg guu auu cgg cgg cug gac gag aca gug gug  
aac cgc auc gcg gcg ggg gaa guu auc cag cgg cca gcu aa u gcu auc  
aaa gag aug auu gag aac ugu uua gau gca aaa **ucc** aca agu auu caa  
gug auu guu aaa gag gga ggc cug aag uug auu cag auc caa gac aa u  
ggc acc ggg auc agg aaa gaa gau cug gau auu gua ugu gaa agg uuc  
acu acu agu aaa cug cag ucc uuu gag gau uua gcc agu auu ucu acc  
uau ggc uuu cga ggu gag gca uaa gcc aug ugg cuc aug uua cua uua  
caa cga aaa cag cug aug gaa agu gug cau aca gag caa guu acu cag  
aug gaa aac uga aag ccc cuc cua aac cau gug cug gca auc aag gga  
ccc aga uca cgg ugg agg acc uuu uuu aca aca uag cca cga gga gaa  
aag cuu uaa aaa auc caa gug aag aa u aug gga aaa uuu ugg aag uug  
uug gca ggu auu cag uac aca aug cag gca uua guu ucu cag uua aaa  
aac aag gag aga cag uag cug aug uua gga cac uac cca aug ccu caa  
ccg ugg aca aua uuc gcu cca ucu uug gaa aug cug uua guc gag aac  
uga uag aaa uug gau gug agg aua aaa ccc uag ccu uca aaa uga aug  
guu aca uau cca aug caa acu acu cag uga aga agu gca ucu ucu uac

ucu uca uca acc auc guc ugg uag aau caa cuu ccu uga gaa aag cca  
uag aaa cag ugu aug cag ccu auu ugc cca aaa aca cac acc cau ucc  
ugu acc uca guu uag aaa uca guc ccc aga aug ugg aug uua aug ugc  
acc cca caa agc aug aag uuc acu ucc ugc acg agg aga gca ucc ugg  
agc ggg ugc agc agc aca ucg aga gca agc ucc ugg gcu cca auu ccu  
cca gga ugu acu uca ccc aga cuu ugc uac cag gac uug cug gcc ccu  
cug ggg aga ugg uua aau cca caa caa guc uga ccu cgu cuu cua cuu  
cug gaa gua gug ata agg ucu aug ccc acc aga ugg uuc gua cag auu  
ccc ggg aac aga agc uug aug cau uuc ugc agc cuc uga gca aac ccc  
ugu cca guc agc ccc agg cca uug uca cag agg aua aga cag aua uuu  
cua gug gca ggg cua ggc agc aag aug agg aga ugc uug aac ucc cag  
ccc cug cug aag ugg cug cca aaa auc aga gcu ugg agg ggg aua caa  
caa agg gga cuu cag aaa ugu cag aga aga gag gac cua cuu cca gca  
acc cca gaa aga gac auc ggg aag auu cug aug ugg aaa ugg ugg aag  
aug auu ccc gaa agg aaa uga cug cag cuu gua ccc ccc gga gaa gga  
uca uua acc uca cta gug uuu uga guc ucc agg aag aaa uua aug agc  
agg gac aug agg uuc ucc ggg aga ugu ugc aua acc acu ccu ucg ugg  
gcu gug uga auc ctc agu ggg ccu ugg cac agc auc aaa cca agu uau  
acc uuc uca aca cca cca agc uua gug aag aac ugu ucu acc aga uac  
uca uuu aug auu uug cca auu uug gug uuc uca ggu uau cgg agc cag  
cac cgc ucu uug acc uug cca ugc uug cct uag aua guc cag aga gug  
gcu gga cag agg aag aug guc cca aag aag gac uug cug aau aca uug  
uug agu uuc uga aga aga agg cug aga ugc uug cag acu auu ucu cuu  
ugg aaa uug aug agg aag gga acc uga uug gau uac ccc uuc uga uug  
aca acu aug ugc ccc cuu ugg agg gac ugc cua ucu uca uuc uuc gac  
uag cca cug agg uga auu ggg acg aag aaa agg aau guu uug aaa gcc  
uca gua aag aau gcg cua ugu ucu auu cca ucc gga agc agu aca uau  
cug agg agu cga ccc ucu cag gcc agc aga gug aag ugc cug gcu cca  
uuc caa acu ccu gga agu gga cug ugg aac aca uug ucu aua aag ccu  
ugc gcu cac aca uuc ugc cuc cua aac auu uca cag aag aug gaa aua  
ucc ugc agc uug cua acc ugc cug auc uau aca aag ucu uug aga ggu  
guu aa

Ja reconstruïda la cadena de l'ARN missatger, podem buscar el triplet que mutarà, gràcies al fet que el codi genètic funciona de manera que cada triplet codifica per a un aminoàcid, hem de contar triplets fins a arribar al que codifiqui per a l'aminoàcid que canviï perquè això voldrà dir que aquest triplet serà el que muti. Com ja ens ha aportat OMIM, la mutació és SER44PHE, per tant, el triplet que canvia és el núm.44, que és UCC, però aquest triplet pertany a l'ARN missatger, en realitat el triplet que ha mutat és el de la cadena motlle de l'ADN, la que s'ha transcrit, que és AGG.

Sabent que el triplet de la cadena d'ARN missatger que canvia és UUC el qual codifica per a la serina, així i tot, a causa de la mutació aquest triplet passa a codificar al fenil alanina, per tant, s'ha de mirar en el codi genètic els triplets d'ARN missatger que codifiquin per a la fenilalanina per poder trobar quina és la base nitrogenada que canvia. En aquest cas els triplets que codifiquen per a la fenilalanina són UUC i UUU. Això vol dir que la base del triplet d'ARNm sa que canvia és UCC, la segona base de triplet, una citosina canvia a un uracil, en canvi, en la cadena motlle del gen el triplet sa era un AGG, però degut a la mutació ha canviat a AAG.

Amb tot això, és possible reconstruir la seqüència del gen mutat i, per tant, poder aplicar CRISPR.

El primer pas per aplicar CRISPR és la creació de la seqüència de l'ARN guia que dirigirà a l'enzim Cas-9 a la secció diana del gen perquè talli.

L'ARN guia del kit CRISPR té dues parts, una que sempre és la mateixa: 5' 3'

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG  
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

I la part específica de l'ARN guia que depèn de la seqüència del gen que es vulgui modificar, formada per 23 nucleòtids complementaris a la cadena motlle del gen, amb la base que muta en el centre d'aquesta cadena de 23 bases. En aquest cas quedaria de la següent manera.

(5' 3') AGAUGCAAAAUUCACAAGUAUUC

Per tant, la cadena completa de l'ARN guia queda de la següent manera:

5' AGAUGCAAAAUUCACAAGUAUUC  
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG  
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3'

Una vegada ja s'ha teoritzat la seqüència de l'ARN guia que posteriorment s'unirà a l'enzim Cas-9 per poder dirigir-la al gen que es vol modificar el següent pas és crear el kit CRISPR, el qual està compost pels següents components:

-L' ARN missatger que codifica per a l'enzim Cas-9, el qual serà traduït per un ribosoma d'una cèl·lula cancerosa un cop es trobi dins d'aquesta.

-L' ARN guia, que serà l'encarregat de dirigir l'enzim Cas-9 fins al gen MLH1 perquè faci el tall i inhibir el gen.

-Les nanopartícules carregades que serviran per poder transportar tot el Kit complet a les zones on estigui el càncer.

-Una sèrie d'anticossos específics que siguin capaços de reconèixer alguna de les proteïnes que es localitzin en la membrana cel·lular de les cèl·lules canceroses perquè el kit CRISPR no entri en cèl·lules de teixits sans.

Per últim, quedaria injectar el Kit CRISPR a l'individu amb aquest càncer, on a través de vies intravenoses es dirigiria a les cèl·lules canceroses i a partir d'aquí començaria el procés de reparació o eliminació del gen.

El kit CRISPR/Cas-9 arriba a una cèl·lula cancerosa gràcies a la detecció dels anticossos a les proteïnes específiques d'aquestes cèl·lules, i al transport de les nanopartícules carregades. Un cop dins de la cèl·lula, l'ARN missatger que codifica l'enzim Cas-9 és llegit per un ribosoma sintetitzant-lo, i posteriorment aquest enzim s'unirà a l'ARN guia, que el transportarà fins al gen MLH1, on gràcies a la complementarietat de bases de l'ARN guia amb el gen s'uniran permetent que l'enzim Cas-9 faci el tall just en els extrems de la unió entre l'ARN guia i el gen, deixant un espai de 23 bases on el nucleòtid mutat ja no es troba dins de la cadena d'ADN, per tant, no pot ser transcrit ni traduït, i, en conseqüència, ja no pot expressar la informació errònia.



A partir d'aquest punt comença la fase de reparació de l'ADN, on si la cèl·lula cancerosa encara manté algun sistema de reparació de l'ADN, acabarà reparant el gen amb la seqüència sana gràcies al fet que la cadena complementaria del gen que ha sigut tallat pot fer-se servir com una còpia de seguretat per restaurar el gen, o pel contrari, si la cèl·lula no conserva cap sistema de reparació, el gen queda silenciada, la cadena tallada, i, per tant, ja no pot continuar expressant aquest gen.

Tot aquest procés és el necessari per reparar o eliminar una mutació que posseeix una cèl·lula cancerosa, però generalment, perquè el càncer es dugui a terme, la cèl·lula ha de patir més mutacions en més gens, per la qual cosa, és necessari repetir aquest procés amb els gens mutats del càncer que s'estigui estudiant.

## **5. Conclusions**

D'acord amb els objectius del treball de recerca i gràcies a l'estudi de la tècnica CRISPR, s'ha pogut dur a terme correctament la seqüenciació de l'ARN guia que utilitzarà l'enzim Cas-9 amb la finalitat que el complex CRISPR/Cas-9 sigui capaç i eficaç a l'hora d'eliminar o suprimir la mutació del gen MLH1, la qual causa càncer.

I també s'ha pogut completar una de les finalitats d'aquest treball de recerca el qual era aprendre el sobre la tècnica CRISPR i el seu funcionament.

## **6. Agraïments**

Especials agraïments a:

- El meu actual tutor del treball de recerca.
- Mentor de la universitat del programa de mentoria.
- A l'antiga tutora del treball de recerca.

## **7. Memòries**

Durant tot el temps que he estat planificant amb els tutors que he tingut al llarg d'aquest temps.

El dia 6 d'abril de 2021 vaig tenir una reunió amb la tutora per parlar sobre les idees del treball que tenia en aquell moment.

El dia 24 d'abril de 2021 vaig tenir una trobada amb la tutora per tractar de consolidar el tema definitiu del treball de recerca.

El dia 28 de maig de 2021 vaig quedar amb la tutora per parlar i tractar de definir la part pràctica que tindria el treball.

El dia 21 de juny de 2021 vam quedar amb el mentor del programa de mentoria de la UAB per parlar sobre com fer la part pràctica.

El dia 17 de setembre de 2021 vaig tenir una reunió amb el nou i actual tutor del treball de recerca per presentar-nos i parlar del treball i del que havia progressat.

El dia 21 de desembre de 2021 vaig tenir una trobada amb el tutor del treball per veure el progrés del treball i per organitzar el que quedava de temari.

El dia 8 de gener de 2022 vaig fer la part pràctica.

El dia 11 de gener de 2022 vaig tenir una reunió amb el tutor del TR per poder veure quines parts s'haurien de modificar del treball.

El dia 21 de gener vaig tenir l'última reunió amb el tutor avanç de l'entrega oficial del treball.

## **8. Webgrafia i bibliografia**

1.

Proteïnes. ¿Què són les proteïnes? | CuidatePlus. CuidatePlus. Publicat el 12 d'abril de 2015. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://cuidateplus.marca.com/alimentacion/diccionario/proteinas.html>

2.

aminoàcid | enciclopèdia.cat. Enciclopedia.cat. Publicat el 2019. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://www.enciclopedia.cat/ec-gec-0219975.xml>

3.

de C. Làmina beta. Wikipedia.org. Publicat l'11 de gener de 2002. Accedit el 22 de juliol de 2021.

[https://es.wikipedia.org/wiki/L%C3%A1mina\\_beta](https://es.wikipedia.org/wiki/L%C3%A1mina_beta)

4.

de C. Estructura quaternària de les proteïnes. Wikipedia.org. Publicat l'11 de gener de 2002. Accedit el 22 de juliol de 2021.

[https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura\\_cuaternaria\\_de\\_las\\_prote%C3%ADnas#:~:text=La%20estructura%20cuaternaria%20de%20las,recibe%20el%20nombre%20de%20pro%20t%C3%B3mero.](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_cuaternaria_de_las_prote%C3%ADnas#:~:text=La%20estructura%20cuaternaria%20de%20las,recibe%20el%20nombre%20de%20pro%20t%C3%B3mero.)

5.

de C. molécula orgánica con un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (-COOH ) unidos a un carbono central. Wikipedia.org. Publicat el 10 de gener de 2002. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://es.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>

6.

Péptidos. El enlace peptídico. Ehu.eus. Publicat el 2022. Accedit el 8 de gener de 2022. <http://www.ehu.eus/biomoleculas/peptidos/pep2.htm>

7.

¿Qué es el ADN?: MedlinePlus Genetics. Medlineplus.gov. Publicat al 2021. Accedit el 23 de juliol de 2021.

<https://medlineplus.gov/spanish/genetica/entender/basica/adn/>

8.

Cromosoma | NHGRI. Genome.gov. Publicat el 2022. Accedit el 24 de juliol de 2021.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cromosoma>

9.

¿Qué es el código genético? - El Blog de Genotipia. Genotipia. Publicat el 14 d'octubre de 2021. Accedit el 27 de juliol de 2021.

<https://genotipia.com/codigo-genetico/>

10.

Khan Academy. Khanacademy.org. Publicat al 2022. Accedit el 31 de juliol de 2021.

<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/overview-of-transcription>

11.

de C. proceso biológico. Wikipedia.org. Publicat el 30 de maig de 2004. Accedit el 31

de juliol de 2021. [https://es.wikipedia.org/wiki/Transcripci%C3%B3n\\_gen%C3%A9tica](https://es.wikipedia.org/wiki/Transcripci%C3%B3n_gen%C3%A9tica)

12.

de C. Creación de proteínas usando información proveniente de ácidos nucleicos.

Wikipedia.org. Publicat desembre de 2006. Accedit el 2 d'agost de 2021.

[https://es.wikipedia.org/wiki/Traducci%C3%B3n\\_\(gen%C3%A9tica\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Traducci%C3%B3n_(gen%C3%A9tica))

13.

News-Medical. Tipos de ARN: mRNA, rRNA y tRNA. News-Medical.net. Publicat el 12 de novembre de 2018. Accedit el 27 de juliol de 2021.

[https://www.news-medical.net/life-sciences/-Types-of-RNA-mRNA-rRNA-and-tRNA-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/-Types-of-RNA-mRNA-rRNA-and-tRNA-(Spanish).aspx)

14.

Què és una mutació i quins tipus de mutació existeixen? - Genetica.cat. Genetica.cat. Publicat el 2019. Accedit el 26 d'agost de 2021.

<https://genetica.cat/pregunta/que-es-una-mutacio-i-quins-tipus-de-mutacio-existeixen/>

15.

Morán A. ¿Qué es la tecnología CRISPR/Cas9 y cómo nos cambiará la vida? Dciencia | Blog de ciencia para todos. Publicat el 9 de març de 2015 . Accedit el 4 de setembre de 2021. <https://www.dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/>

16.

El editor genético CRISPR explicado para principiantes. Agencia SINC. Publicat el 2017. Accedit el 4 de setembre de 2021.

<https://www.agenciasinc.es/Reportajes/El-editor-genetico-CRISPR-explicado-para-principiantes#:~:text=%C2%BFC%C3%B3mo%20funciona%3F,sus%20%27letras%27%20a%20voluntad>

17.

OMIM Entry - \* 301300 - DELTA-AMINOLEVULINATE SYNTHASE 2; ALAS2. Omim.org. Publicat el 2013. Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.omim.org/entry/301300>

18.

Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly - Nucleotide - NCBI. Nih.gov. Publicat el 2022. Accedit el 26 de desembre de 2021.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000023.11?report=genbank&from=55009055&to=55030977&strand=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000023.11?report=genbank&from=55009055&to=55030977&strand=true)

19.

¿Qué es el cáncer? Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 5 de maig de 2021.

Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#tipos-de-genes-que-causan-cncer>

20.

Cáncer - Síntomas y causas - Mayo Clinic. Mayoclinic.org. Publicat el 2019. Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syn-20370588>

21.

Tipos de tratamiento. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 2021. Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>

22.

Cirugía para el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 29 d'abril de 2015.

Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia>

23.

Radioterapia para el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 8 de gener de 2019. Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>

24.

Quimioterapia para tratar el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 29 d'abril de 2015. Accedit el 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>

25.

Inmunoterapia para el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 24 de setembre de 2019. Accedit 26 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia>

26.

Terapia dirigida para el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 28 de novembre del 2018. Accedit 31 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida>

27.

Terapia hormonal para el cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Publicat el 29 d'abril de 2015. Accedit el 31 de desembre de 2021.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-hormonal>

28.

Tratamientos para el cáncer: MedlinePlus enciclopedia médica. Medlineplus.gov. Publicat 2019. Accedit 31 de desembre de 2021.

<https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000901.htm>

29.

Nuño Domínguez. La edición genética muestra su primer éxito en pacientes de cáncer. El País. Publicat el 6 de febrer de 2020. Accedit 3 de gener de 2022.

[https://elpais.com/elpais/2020/02/06/ciencia/1581011479\\_669672.html](https://elpais.com/elpais/2020/02/06/ciencia/1581011479_669672.html)



30.

Tratar el cáncer con CRISPR-Cas9. Investigación y Ciencia. Publicat el 2020. Accedit el 5 de gener de 2022.

<https://www.investigacionyciencia.es/noticias/tratar-el-cncer-con-crispr-cas9-19259>

31.

Salabert E. El sistema CRISPR-Cas9, eficaz para tratar cánceres metastásicos.

Webconsultas.com. Publicat el 20 de novembre de 2020. Accedit el 5 de gener de

2022. <https://www.webconsultas.com/noticias/salud-al-dia/cancer/el-sistema-crispr-cas9-eficaz-para-tratar-canceres-metastasicos>

32.

OMIM Entry - # 609310 - COLORECTAL CANCER, HEREDITARY NONPOLYPOSI, TYPE 2; HNPCC2. Omim.org. Publicat el 2013. Accedit el 8 de gener de 2022.

<https://www.omim.org/entry/609310?search=cancer&highlight=%28cancer%7Cancers%29>

33.

OMIM Entry - # 609310 - COLORECTAL CANCER, HEREDITARY NONPOLYPOSI, TYPE 2; HNPCC2. Omim.org. Publicat el 2013. Accedit el 8 de gener de 2022.

<https://www.omim.org/entry/609310?search=cancer&highlight=%28cancer%7Cancers%29>

34.

MLH1 - Gene - NCBI. Nih.gov. Publicat el 2022. Accedit el 8 de gener de 2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=MLH1>

35.

Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly - Nucleotide - NCBI. Nih.gov. Publicat el 2022. Accedit el 8 de gener de 2022.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC\\_000003.12?report=genbank&from=36993487&to=37050846](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000003.12?report=genbank&from=36993487&to=37050846)

36.

Vicens Vives llibre de Biologia de 1r de Batxillerat.

37.

Mentor de la Universitat "Estudi i manipulació ADN". Biologia molecular, Abril de 2021.

38.

**Imatge de la portada.** Raquel. El cortapega genético podría aumentar el riesgo de cáncer. MuyInteresante.es. Publicat el 13 de juny de 2018. Accedit el 19 de gener de 2022.

<https://www.muyinteresante.es/ciencia/articulo/el-cortapega-genetico-podria-aumentar-el-riesgo-de-cancer-661528896009>

39.

**Figura 1.** Aminoàcids - Cardiacos.net. Cardiacos.net. Publicat el 5 d'octubre de 2017. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://cardiacos.net/aminoacidos/>

40.

**Figura 2.** <https://www.facebook.com/BioScripts>. Clasificación de los aminoácidos. Hidden Nature. Publicat el 11 d'octubre de 2017. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://www.hidden-nature.com/clasificacion-de-los-aminoacidos/>

41.

**Figura 3.** Péptidos. El enlace peptídico. Ehu.eus. Publicat el 2022. Accedit el 22 de juliol de 2021. <http://www.ehu.eus/biomoleculas/peptidos/pep2.htm>

42.

**Figura 4.** Proteïnes per a gossos | Proteïnes en alimentació per a gossos. Knatur. Publicat el 2016. Accedit el 22 de juliol de 2021.

<https://www.knatur.com/ca/blog/importancia-proteines/>

43.

**Figura 5.** El enlace fosfodiéster y los nucleótidos. Github.io. Publicat el 2018. Accedit el 23 de juliol de 2021.

[https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica\\_estructural/node5.html](https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica_estructural/node5.html)

44.

**Figura 6.** El enlace fosfodiéster y los nucleótidos. Github.io. Publicat el 2018. Accedit el 23 de juliol de 2021.

[https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica\\_estructural/node5.html](https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica_estructural/node5.html)

45.

**Figura 7.** <https://www.facebook.com/mariairanzobio>. Base nitrogenada | Blog de Biotecnología by María Iranzo. María Iranzo Biotecnología. Publicat el 5 de setembre de 2016. Accedit el 18 de gener de 2022.

<https://www.mariairanzobiotec.com/glosario/base-nitrogenada/>

46.

**Figura 8.** Enlace fosfodiéster | La Guía de Química. Laguia2000.com. Publicat el 31 d'agost de 2010. Accedit el 23 de juliol de 2021.

<https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/enlace-fosfodiester>

47.

**Figura 9.** de C. Hipótesis del mundo de ARN. Wikipedia.org. Publicat l'11 de decembre de 2006. Accedit el 23 de juliol de 2021.

[https://es.wikipedia.org/wiki/Hip%C3%B3tesis\\_del\\_mundo\\_de\\_ARN](https://es.wikipedia.org/wiki/Hip%C3%B3tesis_del_mundo_de_ARN)

48.

**Figura 10.** Enrollamiento del ADN: Una vuelta más, una vuelta menos. Blogspot.com. Publicat el 2013. Accedit el 24 de juliol de 2021.

[http://bioscientias.blogspot.com/2011/02/enrollamiento-del-adn-una-vuelta-mas.html#.Yeh-w\\_70mUI](http://bioscientias.blogspot.com/2011/02/enrollamiento-del-adn-una-vuelta-mas.html#.Yeh-w_70mUI)

49.

**Figura 11.** de C. patró cromosómic de una especie. Wikipedia.org. Publicat el 24 de juliol de 2003. Accedit en 24 de juliol de 2021.

<https://es.wikipedia.org/wiki/Cariotipo>

50.

**Figura 12.** Codi genètic. BIOPILI, apunts de biologia. Publicat el 2022. Accedit el 27 de juliol de 2021. <http://biopili.weebly.com/codi-genegravetic.html>

51.

**Figura 13.** to C. Empalmament alternatiu. Wikipedia.org. Publicat el 17 de novembre de 2011. Accedit el 20 de gener de 2022.

[https://ca.wikipedia.org/wiki/Empalmament\\_alternatiu](https://ca.wikipedia.org/wiki/Empalmament_alternatiu)

52.

**Figura 14.** de C. CRISPR. Wikipedia.org. Publicat el 2 de març de 2015. Accedit el 4 de setembre de 2021. <https://es.wikipedia.org/wiki/CRISPR>

53.

**Figura 15.** El cáncer y la tecnología ganadora del premio Nobel: CRISPR - Evolution Europe. Evolution Europe. Publicat el 7 de juny de 2021. Accedit el 26 de desembre de 2021. <https://evolutioneurope.eu/blog-es/cancer-premio-nobel-crispr/>

54.

**Figura 16.** de C. Cromosoma 3 (humano). Wikipedia.org. Publicat el 4 de març de 2007. Accedit el 8 de gener de 2022.

[https://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma\\_3\\_\(humano\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma_3_(humano))

55.

**Figura 17.** MLH1 mutL homolog 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Nih.gov. Publicat al 2022. Accedit el 8 de gener de 2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4292>