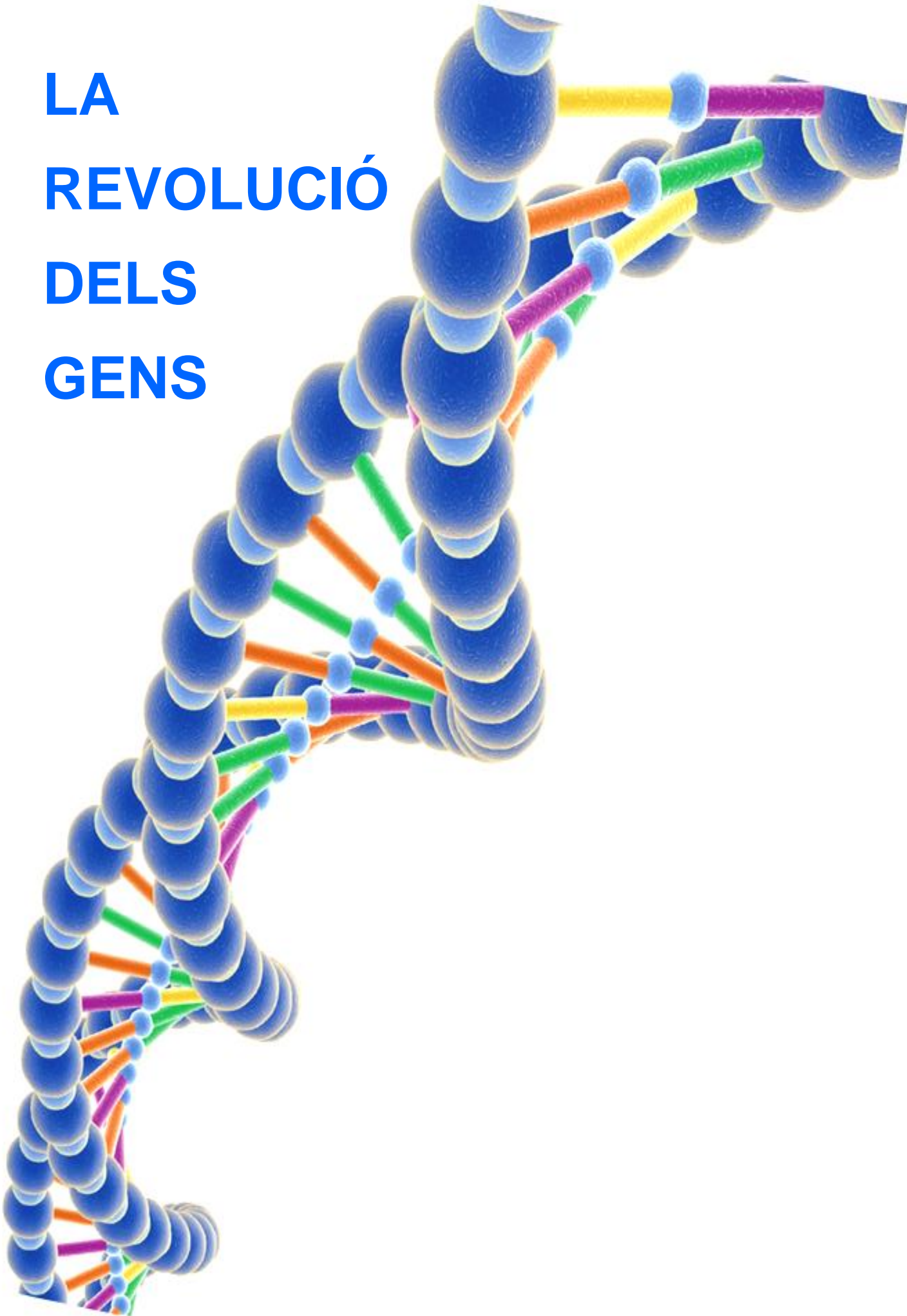


**LA
REVOLUCIÓ
DELS
GENS**



La revolució dels gens.

ÍNDIX:

1. Introducció: Motivació per a realitzar aquest Treball de Recerca	2
2. Objectius	2
3. Hipòtesis	4
4. Història de l'enginyeria genètica	4
5. Què és l'enginyeria genètica i com duu a terme la seva tasca?	7
6. Tècniques utilitzades en l'enginyeria genètica	17
7. Aplicacions de l'enginyeria genètica en la nostra societat:	26
• En l'agricultura:	
• En animals de granja:	
• En l'estudi de malalties:	
• En la producció de productes biològics:	
• En l'assaig de seguretat de vacunes i productes químics	
• Per a la donació d'òrgans:	
8. Teràpia gènica	31
9. Projecte Genoma Humà	33
10. Arxiu del Genoma-Fenoma Europeu	48
11. Clonació terapèutica	55
12. Articles publicats relacionats amb l'enginyeria genètica	58
13. IRB de Lleida, servei de transgènics	67
14. Part pràctica	75
• Programa “bojos per la bioquímica”	
• Pràctica “bojos per la bioquímica” :GMO plants, a friend or a foe?	
• Pràctica Universitat de Barcelona: Modificació genètica de bacteris <i>E. Coli</i> (<i>Escherichia Coli</i>) en introduir-los-hi un plasmidi pGlo”	
15. Conclusió final, verificació de la hipòtesi	104
16. Opinió personal	105
17. Webgrafia	106
18. Agraïments	110

1. INTRODUCCIÓ.

Motivació per a realitzar aquest treball de recerca:

Des de ben petita, he sentit un interès cap a la investigació, els descobriments i la millora d'aquests ja sigui a gran o a petita escala en la nostra societat.

Vaig pensar que podia ser molt interessant saber que ens pot aportar l'enginyeria genètica i que ens ha aportat ja i de quina manera ha influït en nosaltres positiva o negativament.

Vull dirigir el meu treball en la participació de l'enginyeria genètica en experiments importants, que veiem molt llunyans però també en el que ens queda més a prop, com molts dels aliments que consumim diàriament o com molts dels medicaments que avui ens ajuden a superar una malaltia que han estat obtinguts gràcies a l'enginyeria genètica.

Vull ajudar a donar a conèixer una feina que està molt present en tot el que ens envolta, i per alguna raó que desconec, no s'ha donat prou a conèixer.

2. OBJECTIUS

Els objectius personals que tinc envers aquest treball han estat establerts a partir del projecte de la fundació La Pedrera, "Bojos per la Bioquímica", en el qual tinc el plaer de participar i on he après una part de la biologia que pràcticament desconeixia.

Fent aquest treball, vull aconseguir poder veure com es treballa en laboratoris, en aquest cas, en l'àmbit de l'enginyeria genètica; i a part, poder valorar si això és el que m'agrada per dedicar-m'hi en un futur.

Els objectius envers l'enginyeria genètica es basen en poder conèixer com avança la investigació en aquest camp, què és el que falta per descobrir o aconseguir i especialment, quins dels productes que m'envolten o consumeixo estan obtinguts per enginyeria genètica, i com han estat produïts; també poder

saber si realment són útils per a nosaltres i poder descobrir els possibles impactes dels transgènics, que els consumidors desconeixem.

A part dels productes d'alimentació, poder saber la quantitat de medicaments, que avui ens ajuden en qualsevol malaltia i han estat obtinguts també per enginyeria genètica; com el cas més conegut de la insulina; produïda per bacteris i útil per als humans.

L'enginyeria genètica està també present en projectes dedicats a la cura del càncer o altres malalties; en aquest treball espero descobrir en quins d'aquests és una clara solució per resoldre tots els problemes que sorgeixen a l'hora de finalitzar un projecte amb èxit.

Vull dedicar un apartat del meu treball en reconèixer aquells centres d'investigació que milloren dia rere dia els seus descobriments utilitzant la modificació dels gens i conèixer així també els avenços més importants que ja s'han fet; és a dir, allò que més ens ha canviat i per tant, ajudat, el qual ha estat obtingut per enginyeria genètica.

Així també, poder saber en quins projectes relacionats s'estan treballant actualment i què es pretén aconseguir amb aquests.

D'aquesta manera, poder donar l'opció a qui es llegeixi aquest treball, de posicionar-s'hi a favor o en contra. Ja que, d'alguna manera; el poder de controlar els gens d'una altra persona o ésser viu, està molt criticat pels principis ètics que això comporta.

Fent aquest treball tindrè l'oportunitat de realitzar una modificació en els gens d'un bacteri, en concret, introduiré el gen GFP (gen de la fluorescència) en un bacteri i observar-ne els resultats.

A part, podré parlar amb diverses persones que treballen en el camp de l'enginyeria genètica i així saber quins projectes realitzen, amb quines finalitats, la facilitat de realitzar aquests projectes havent-hi una oposició ètica... en resum, poder veure d'una manera més real què fa l'enginyeria genètica en la ciència d'avui dia.

En acabar el projecte, m'agradaria poder posicionar-me en algun dels dos bàndols i poder raonar el perquè a qualsevol persona que hi senti interès.

3. HIPÒTESIS:

“ L’enginyeria genètica és el futur en la investigació científica de la nostra societat”

4. HISTÒRIA DE L’ENGINYERIA GENÈTICA:

1000 aC: Els babilonis celebren amb rituals religiosos la pol·linització de les palmeres.

323 aC: Aristòtil especula sobre la naturalesa de la reproducció i l’herència.

1676: Es confirma la reproducció sexual en les plantes.

1677: Es contempla l’esperma animal a través del microscopi.

1838: Es descobreix que tots els organismes vius estan composts per cèl·lules.

1859: Darwin fa pública la seva teoria sobre l’evolució de les espècies.

1866: Mendel publica “*Experiments sobre la hibridació de plantes*”.

1871: S’aïlla el DNA en el nucli d’una cèl·lula.

1925: Es descobreix que l’activitat del gen està relacionada amb la seva posició en el cromosoma

1927: Es descobreix que els rajos X causen mutacions genètiques.

1943: El DNA és identificat com la molècula genètica.

1940-1950: Es descobreix que cada gen codifica una única proteïna.

1950: S’aconsegueix congelar amb èxit semen de toro a -79°C per al seu transport i inseminació de vaques.

1952: Thomas King i Robert Briggs clonen granotes a partir de cèl·lules indiferenciades.

1953: Es proposa la estructura de doble hèlix del DNA.

1956: Són identificats 23 parells de cromosomes en les cèl·lules dels humans.

1966: Es desxifra el codi genètic complet del DNA.

1972: Es crea la primera molècula de DNA recombinant en el laboratori.

1973: Tenen lloc els primers experiments d'enginyeria genètica en els que els gens d'una espècia s'introdueixen en organismes d'una altra espècia i funcionen correctament.

1973: Stanley Cohen i Herbert Boyer elaboren la tècnica de clonació de gens.

1976: Es funda en els EEUU *Genetech*, la primera empresa de enginyeria genètica.

1977: Mitjançant tècniques d'enginyeria genètica es fabrica amb èxit una hormona humana en una bactèria.

1978: Es clona el gen de la insulina humana.

1978: Neix *Baby Louise*, el primer bebé concebut mitjançant fecundació in vitro.

1980: El Tribunal Suprem dels Estats Units, dictamina que es poden patentar els microbis obtinguts mitjançant enginyeria genètica.

1982: Es crea el primer ratolí transgènic (*el superratolí*), inserint un gen de la hormona de creixement de la rata en òvuls de rata fecundats. Científics de la Universitat de Seattle, San Diego i Califòrnia, obtenen un ratolí transgènic portador del gen de la hormona del creixement de la rata.

1982: Es produeix insulina utilitzant tècniques de DNA recombinant.

1983: S'inventa la tècnica de la PCR, que permet replicar gens específics amb molta rapidesa.

1983: Creació de la primera planta transgènica de *Tobacco*.

1984: Creació de les primeres plantes transgèniques.

1984: Primer naixement d'un nadó a partir d'un embrió congelat.

- 1985:** El laboratori de Ralph Brinster obté porcs transgènics que produeixen l'hormona humana del creixement.
- 1985:** S'utilitza per primera vegada la *empremta genètica* en una investigació judicial.
- 1986:** S'autoritzen les proves clíniques de la vacuna contra l'Hepatitis B obtinguda mitjançant enginyeria genètica.
- 1987:** *PPL Therapeutic* aconsegueix una ovella transgènica que produeix en la llet la proteïna humana *alfa-1antitripsina*.
- 1988:** Primera patent d'un organisme produït mitjançant enginyeria genètica.
- 1990:** Primer tractament amb èxit mitjançant teràpia gènica de nens amb trastorns immunològics (nens bombolla). S'inicien nombrosos protocols experimentals de teràpia gènica per a intentar curar malalties canceroses i metabòliques.
- 1990:** S'inicia el Projecte Genoma Humà.
- 1991:** Steve Rosenberg realitza la primera teràpia gènica en pacients amb melanoma maligne.
- 1994:** Es comercialitza a Califòrnia el primer aliment transgènic (un tomàquet) i s'autoritza a Holanda la producció del primer bou modificat genèticament.
- 1995:** Ian Wilmut i Keith Campbell obtenen a *Megan* i *Morag*, dos corders engendrats per transferència nuclear de cèl·lules embrionàries.
- 1996:** Per primera vegada es completa la seqüència del genoma d'un organisme eucariòtic, el llevat de la cervesa "*Saccharomyces cerevisiae*".
- 1996:** Primer trasplant heteròleg d'un cor de porc humanitzat a un babuí.
- 1997:** Clonació del primer mamífer, una ovella anomenada *Dolly*.
- 2001:** Gran Bretanya permet la clonació d'embrions humans menors de 14 dies.
- 2001:** Es coneix de forma precisa la seqüència completa del genoma humà.

5. QUÈ ÉS L'ENGINYERIA GENÈTICA I COM DUU A TERME LA SEVA TASCA?

“Conjunt de tècniques biològiques emprades per a la manipulació i modificació del material genètic dels éssers vius. L'aïllament de fragments de DNA i la seva introducció a l'interior d'altres cèl·lules constitueixen l'essència de l'enginyeria genètica, que possibilita la transferència de característiques biològiques d'un organisme a un altre, la creació de gens artificials, la producció de determinades substàncies com la insulina o vacunes, etc.” Enciclopèdia Salvat Català.

L'enginyeria genètica per tant, ens permet modificar el genoma, és a dir, el conjunt haploide dels gens d'un organisme. Ja sigui per addició, per eliminació o per alteració d'aquests gens.

L'objectiu és, per tant, aconseguir que l'organisme escollit acabi produint una proteïna, la qual no estava codificada inicialment en el seu genoma però sí que ho està en aquest genoma modificat.

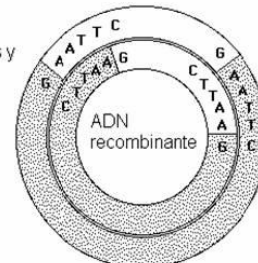
Tot el procés que finalitza amb la modificació dels gens i obtenció d'un **DNA recombinat**, és a dir, un DNA que conté una part pròpia i una altra d'un donant, introduïda artificialment; comença amb els **enzims de restricció**, encarregats de reconèixer una seqüència característica de nucleòtids dins d'una molècula de DNA i tallar el DNA en aquest punt en concret, anomenat lloc o

diana de restricció, o en un lloc no molt llunyà a aquest, depenent de l'enzim. Els llocs de restricció tenen entre 4 i 12 parells de bases, amb les quals són reconeguts, capaços de reconèixer seqüències palindròmiques (aquelles que llegeixen en direccions oposades el mateix orde de nucleòtids) de DNA i

Inserción de un fragmento de ADN en un plásmido



los extremos se unen por complementariedad de bases y se sellan con ligasa



tallar els enllaços fosfodièster del material genètic en un punt específic. Aquest segment obtingut és anomenat, **DNA passatger** i forma part del DNA estrany que s'introduirà al DNA receptor, a la cèl·lula.

Un cop les cèl·lules han rebut el gen introduït, aquest es reproduïx i es copia, com la resta d'ADN de la cèl·lula i així es produeix una clonació.

Formes d'introducció de gens en cèl·lules:

Mecanismes biològics:

- Per plasmidis:

Els plasmidis són una construcció de gens **extra cromosòmica**, que pot ser lineal o circular. Tot i que s'han descrit principalment en bacteris; alguns pocs s'han trobat en llevats. **No són essencials** per a la vida del microorganisme, però en determinades circumstàncies poden aportar l'informació genètica necessària per a sintetitzar alguna proteïna d'interès, per exemple un antibiòtic

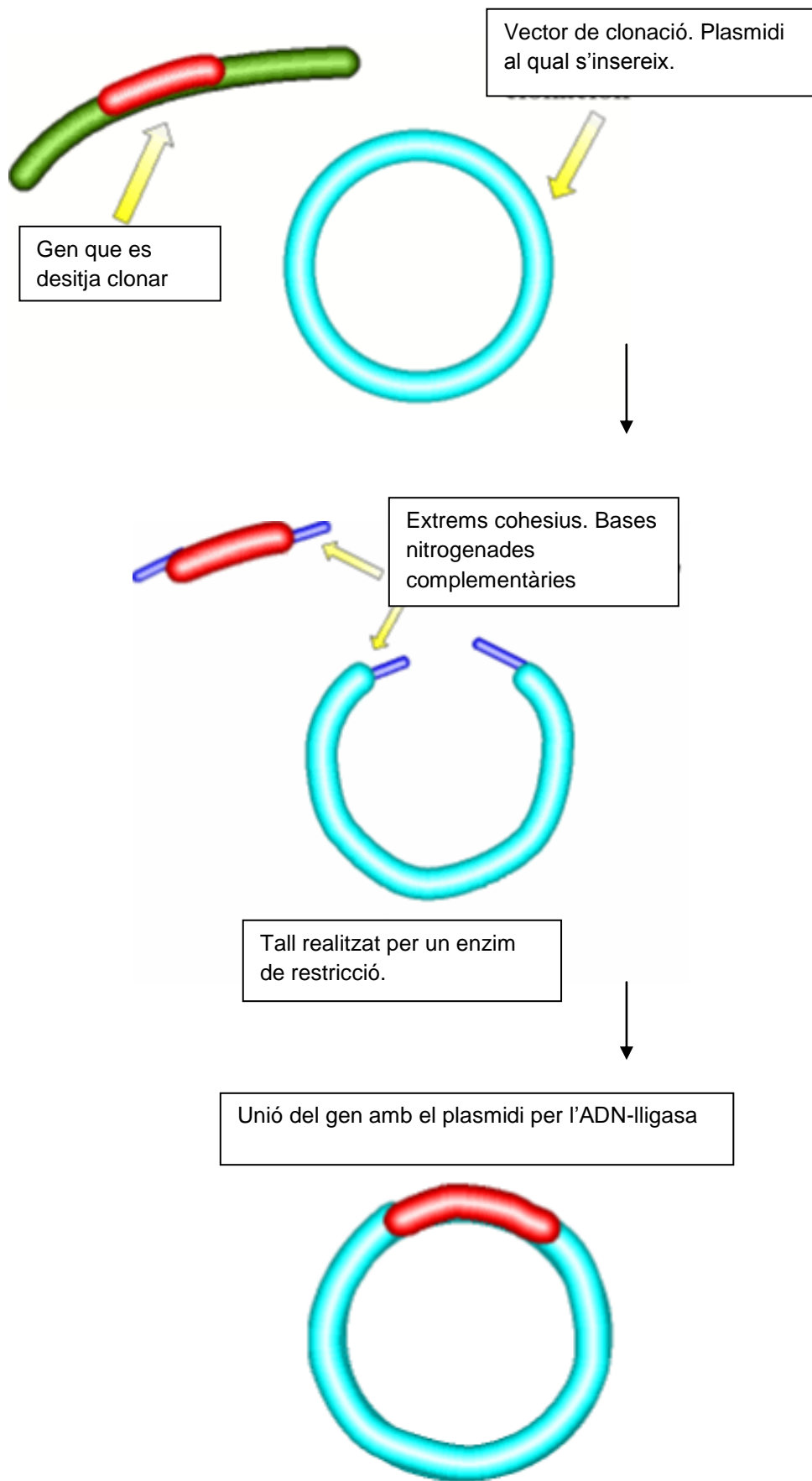


Un plasmidi bacterià, és un petit fragment de DNA en forma circular, conté els seus propis mini cromosomes els quals es dupliquen autònomament.

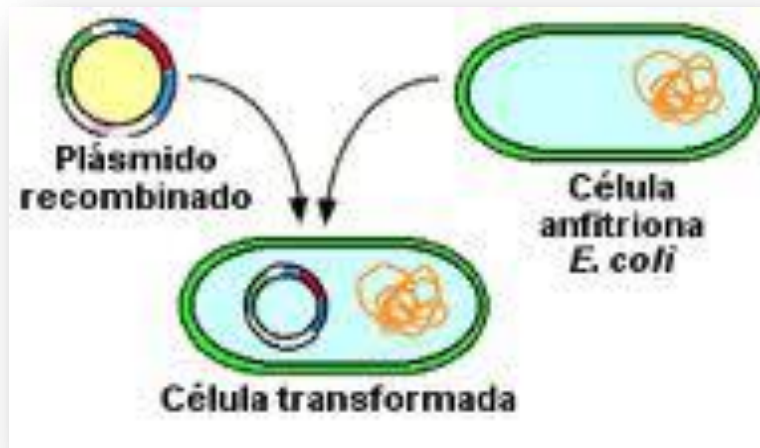
El procés comença amb la ruptura de la paret cel·lular del bacteri, per tant, aconseguim tenir el plasmidi lliure i així podem introduir-hi el DNA passatger. Un cop modificat el plasmidi pot penetrar en altres bacteris, convertint-los en organismes modificats genèticament.

Aquest pas, s'anomena **transformació**, i és facilitat per la permeabilització de les membranes del bacteri al qual se li introduirà el plasmidi modificat.

Representació del procés d'obtenció d'un DNA recombinat:



Un cop s'ha introduït el gen en el plasmidi, es duu a terme **la transformació**. És a dir, **el plasmidi s'introdueix en un bacteri**.



Sovint s'utilitza el bacteri *E. coli* (*Escherichia coli*) degut a la seva senzillesa.

Per poder realitzar aquest procés és necessari que el fragment de DNA que codifiqui per a un gen provingui d'una cèl·lula procariota o bé, si prové d'una cèl·lula eucariota; ha de ser el RNA ja madur, així, ser tant sols els exons¹ d'aquesta. Si el procés és realitzés amb DNA o amb un RNA sense haver madurat, aquest contindria també els introns² i en ser introduït en el bacteri, no realitzaria la maduració corresponent en les cèl·lules eucariotes i per tant no s'eliminarien els introns i no s'arribaria a codificar cap gen.

Per dur a terme la transformació en una cèl·lula procariota, s'utilitza el RNA missatger del fragment que es desitgi procedent de la cèl·lula eucariota, per tant, del fragment que codifiqui per al gen desitjat, i aquest ja ha madurat havent eliminat així els seus introns. S'utilitza després la transcriptasa inversa per poder transformar aquest fragment de RNA missatger (madur) en DNA una altra vegada. I aquest procés finalitza amb la introducció del DNA per mitjà d'un vector (retrovirus, explicat més endavant o plasmidi), en la cèl·lula procariota.

Exons¹: Porció transcrita i traduïda dels gens.

Introns²: Porció dels gens, transcrita però no traduïda a proteïnes.

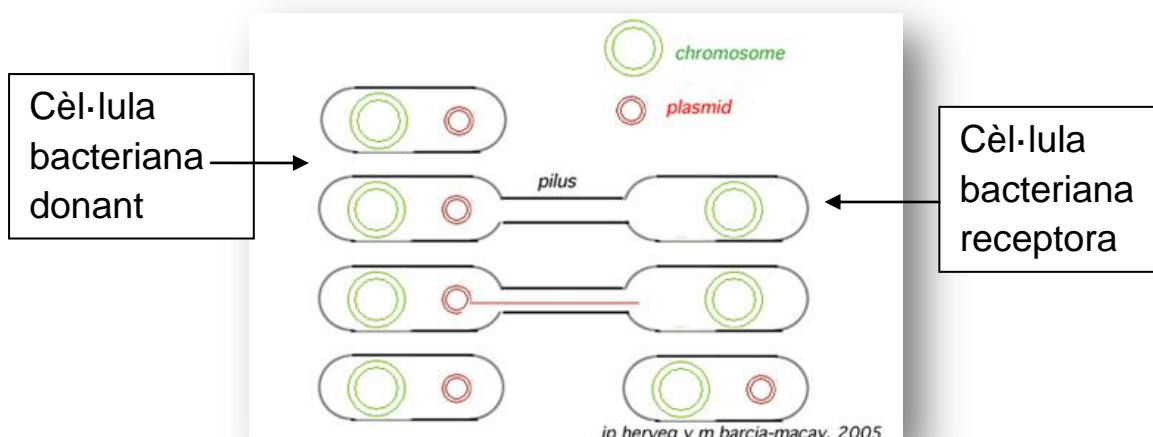
L'altra solució per a poder eliminar els introns del DNA és utilitzar un **plasmidi de llevats**, ja que al ser cèl·lules eucariotes; en **el seu procés d'obtenció de proteïnes hi apareix la maduració del RNA**. És per això que són tan útils aquests tipus de plasmidis. D'aquesta manera s'evita la intervenció de manera artificial de la transcriptasa inversa. Tan sols s'ha d'introduir el fragment de DNA (amb introns i exons) i en el plasmidi ja s'hi realitzarà correctament tot el procés fins a arribar a l'obtenció de la proteïna desitjada codificada per aquest DNA introduït.

Un altre mètode utilitzat per a la modificació del material genètic d'un bacteri és **la conjugació**. Procés on **es transfereix aquest material genètic**, en forma de plasmidi o de genoma bacterià, **entre bacteris**.

Hi apareix una cèl·lula donadora, la qual aporta el material genètic, i una de receptora, la que el rep.

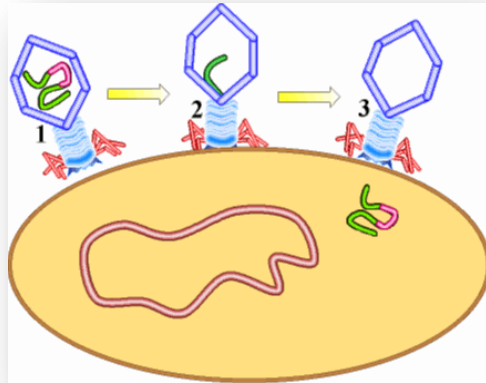
Aquesta modificació sols és possible si el bacteri donant conté un cas concret de plasmidis, els "fertility- (F) plasmids", és a dir, els plasmidis que codifiquen per a la formació del pilus sexual, microtúbul que s'estén des de la superfície de la cèl·lula bacteriana.

Una vegada el fragment de DNA del bacteri donant està dins la cèl·lula receptora, és possible la recombinació; on el DNA del donant s'alinea amb el de la receptora i per encreuament s'intercanvien gens, passant a formar part del genoma de la cèl·lula bacteriana.



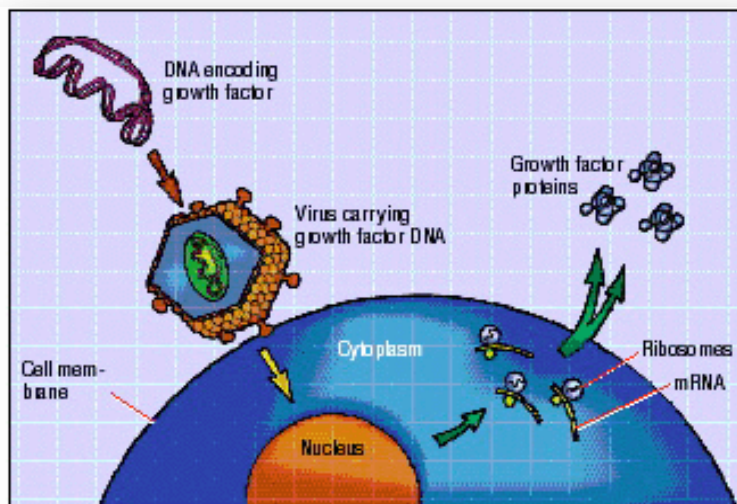
- Per virus:

La modificació genètica d'un organisme pot realitzar-se també utilitzant el virus com a vector, especialment útil per a la introducció en aquelles cèl·lules amb receptors en la membrana cel·lular.



S'introdueix el DNA en el genoma viral, i així aconseguir també que el virus no es repliqui, i per tant que no sigui patogènic. Els virus utilitzats s'anomenen **recombinants** i **defectuosos**, ja que els manca alguna funció necessària per a poder realitzar el seu propi cicle replicador.

En primer lloc s'introdueix el DNA en el virus, en aquest cas un fragment que codifica per a la fabricació de l'hormona del creixement. El virus traspasa la membrana cel·lular i introdueix el DNA en el nucli de la cèl·lula, per tant, aquest formarà part del DNA propi de la cèl·lula i es transcriurà i es traduirà correctament, d'aquesta manera es produirà l'hormona desitjada.



Retroviridae és una família de virus embolcallats que es repliquen en una cèl·lula hoste a través del procés de transcripció inversa. Un retrovirus és un virus de ARN monocatenari, que emmagatzema el seu àcid nucleic amb la forma d'un genoma de RNA missatge i es dirigeix a una cèl·lula hoste com un paràsit obligat.

En la majoria dels virus, el DNA es transcriu en RNA i després aquest RNA es tradueix en proteïna. No obstant, la funció dels retrovirus és diferent; el seu RNA es transcriu de forma inversa en DNA, que està integrat en el genoma de la cèl·lula hoste i després se sotmet als processos habituals de transcripció i traducció per a expressar els gens transportats per el virus.

Una vegada dins del citoplasma de la cèl·lula hoste, el virus utilitza la seva pròpia transcriptasa inversa per a produir DNA a partir del RNA del seu genoma; al revés que la pauta habitual, per tant *retro* (cap endarrere).

Aquest nou DNA s'integra en la cèl·lula hoste a partir d'una enzima anomenada integrasa. Així la cèl·lula hoste tracta al DNA viral com a una part del seu genoma propi, en fa la traducció i la transcripció alhora que la dels gens propis de la cèl·lula i així també produeix les proteïnes que el genoma viral indicaven.

La informació continguda en un gen retroviral, s'utilitza per generar la proteïna corresponent a través de la seqüència:

RNA -> DNA -> RNA -> pèptid³

Això és el procés fonamental identificat per Francis Crick (un gen-un pèptid), en que la seqüència és:

DNA -> RNA -> pèptid

Pèptid³: Proteïna que està sintetitzada per un o més polipèptids en cadena, per exemple la hemoglobina es un pèptid de quatre cadenes.

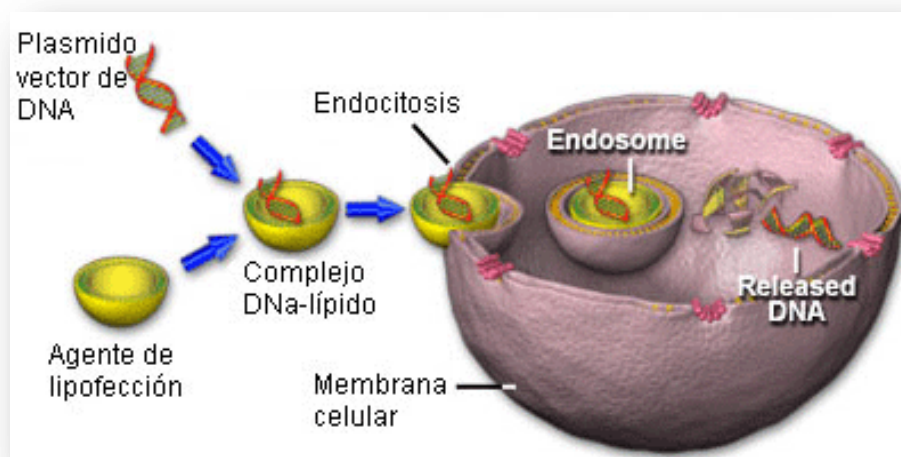
El procés realitzat per el retrovirus a partir de la transcriptasa inversa, posseeix una **importància extraordinària en la manipulació genètica** ja que facilita el procés i augmenta les possibilitats d'èxit al realitzar-ho de manera natural per la cèl·lula.

El retrovirus és el virus més utilitzat per dur a terme la introducció d'un gen en altres cèl·lules a partir de virus. No obstant, no és l'únic emprat; s'utilitza entre d'altres el virus HSV (Herplex Simple Virus) però el retrovirus **és el més eficaç**, amb una eficiència pròxima al 100%.

Aquests retrovirus recombinats són utilitzats com una via bastant segura per a la transferència genètica des de la dècada dels 80; anteriorment com a protocols de teràpia gènica i cada vegada més com a vector..

- Per liposomes:

El procés mitjançant el qual s'introdueix DNA en una cèl·lula a través de liposomes (petites vesícules fosfolipídiques), s'anomena lipofecció i consisteix en la unió d'aquests liposomes en la membrana cel·lular i seguidament la introducció del seu contingut en la cèl·lula, és a dir, el DNA introduït anteriorment.



Mecanismes no biològics:

- Electroporació:

Consisteix en la provocació d'un augment de la conductivitat elèctrica i la permeabilitat de la membrana plasmàtica cel·lular, aplicant-hi un camp elèctric de manera externa.

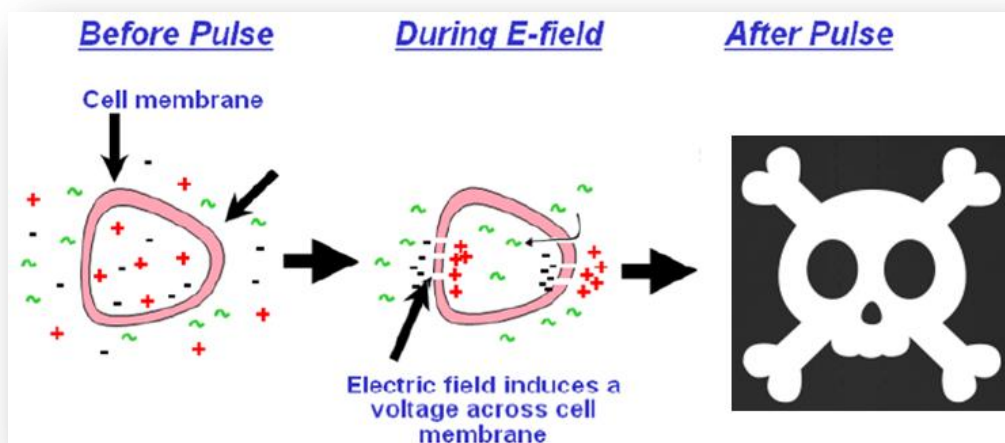
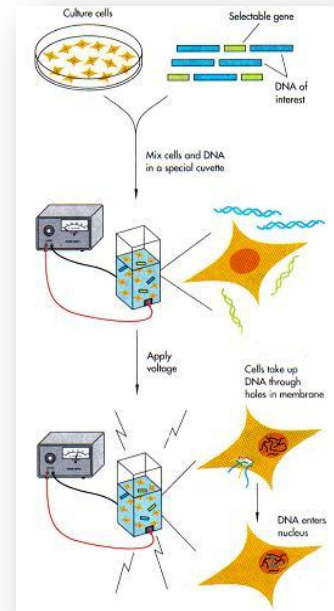
Quan el voltatge travessa la membrana plasmàtica, hi forma porus; els quals es tancaran passats un temps, i pels quals entrarà el DNA que vol introduir-se a la cèl·lula.

Aquest procés ha de ser ràpid per no causar una mort de les cèl·lules exposades a l'alt voltatge.

L'electroporació és usada gràcies a la seva eficàcia i també s'utilitza en el tractament de tumors en els centres de salut més selectes del món.

Els experts, asseguren que amb l'electroporació en aquest cas, irreversible, l'energia no tèrmica, és usada per crear innumerables i permanents nanoporus en la membrana cel·lular amb la finalitat d'impedir l'homeòstasi³ i així iniciar la mort de la cèl·lula per apoptosi⁴.

A part, aquesta energia produïda, no crema i per tant, permet conservar els teixits i les estructures no cel·lulars del voltant de les estructures tumorals.



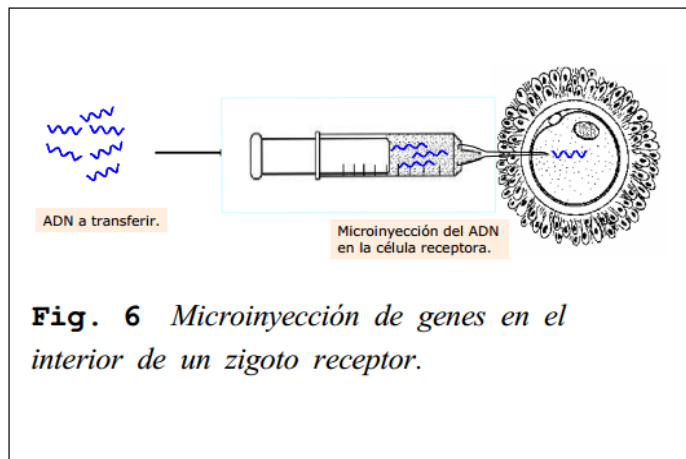
Homeòstasi⁴: Tendència al manteniment de l'equilibri i de l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics.

Apoptosi⁵: Mecanisme de mort cel·lular programada genèticament que permet l'eliminació de cèl·lules envellides, malmeses o sobreres.

- Microinjecció:

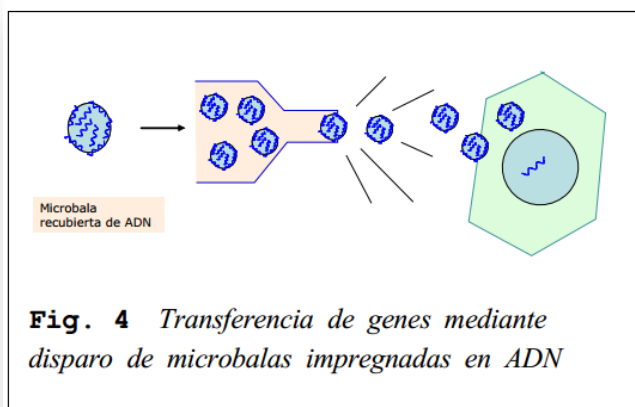
En el procés de microinjecció s'utilitzen agulles per inserir substàncies en un nivell microscòpic dins d'una cèl·lula viva.

L'agulla, d'aproximadament 10 micròmetres, la qual pot contenir fins a 15 microlitres de DNA; penetra la membrana cel·lular i fins i tot la membrana nuclear per a introduir en la cèl·lula el seu contingut.



- Microprojecció o tret de microbales:

La microprojecció consisteix en la introducció de DNA en una cèl·lula a partir d'una micropistola; encarregada de disparar microbales d'acer, impregnades de DNA, aquesta tècnica és utilitzada principalment en cèl·lules eucariotes, ja que la modificació és més complexa de realitzar amb èxit que en els bacteris.



- Un buffer, és a dir, una solució reguladora que conté concentracions relativament elevades d'un àcid dèbil i la seva base conjugada, sals hidrolíticament actives que tenen la propietat de **mantenir estable el pH d'una dissolució** davant l'addició de quantitats relativament petites d'àcids o bases fortes. És molt important, ja que amb un lleuger canvi en la concentració d'hidrògens de la cèl·lula pot produir-se una aturada en l'activitat dels enzims.
- El fragment de DNA que es vol amplificar.
- Els quatre tipus de desoxiribonucleòtids, lliures.
- Els oligonucleòtids de cadena senzilla, primers.
- Una DNA-polimerasa termostable, ja que ha d'actuar a altes temperatures (uns 75°C) i alhora ha de mantenir la seva estructura estable a temperatures de 95°C.

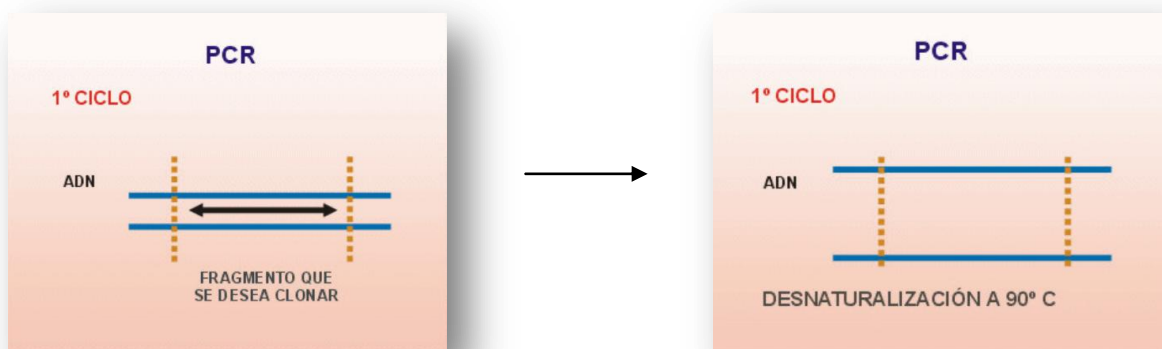
L'amplificació dura unes dues hores i es un procés cíclic que consta d'uns 20 a 40 cicles. Cadascun dura entre un minut i mig i cinc minuts. Tot el procés es realitza en un termociclador.



Cada cicle pot dividir-se en tres etapes:

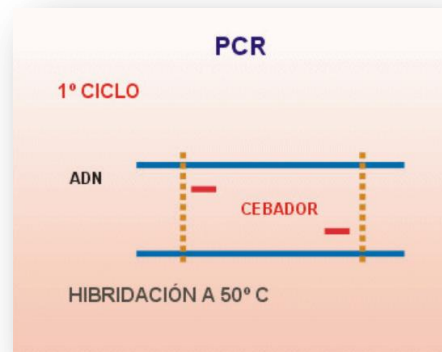
Desnaturalització:

El procés consisteix en **separar les dues cadenes de DNA**, per això és necessària una temperatura molt elevada, d'uns 90°C, per poder així trencar els ponts d'hidrogen que uneixen les dues cadenes, formant molècules de cadena simple.



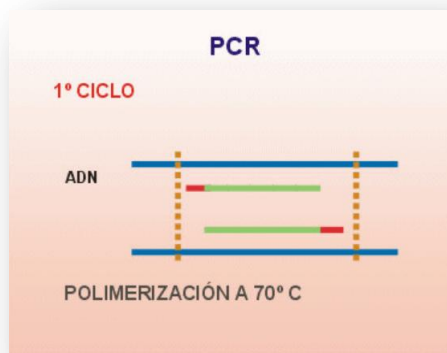
Hibridació:

El resultat de la desnaturalització es refreda bruscament entre uns 37 i 65°C, aconseguint així la **unió dels primers amb les cadenes de DNA**, els quals seran utilitzats com a punt de partida en la síntesi d'una nova cadena de DNA.



Replicació, elongació o polimerització :

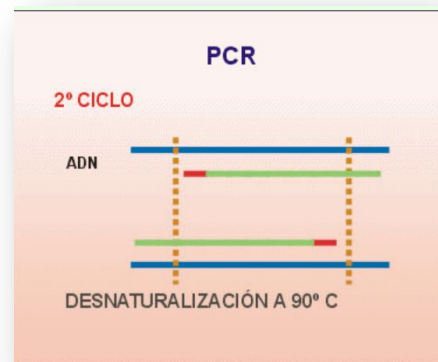
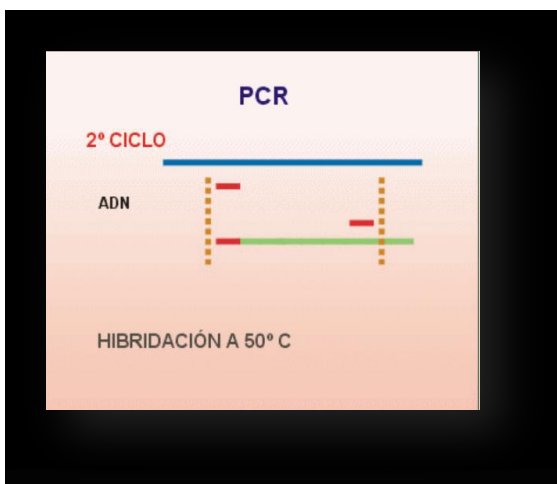
És l'última fase de cada cicle hi té lloc l'amplificació del DNA. Dura tan sols entre un i tres segons i es realitza a una temperatura d'uns 70°C.

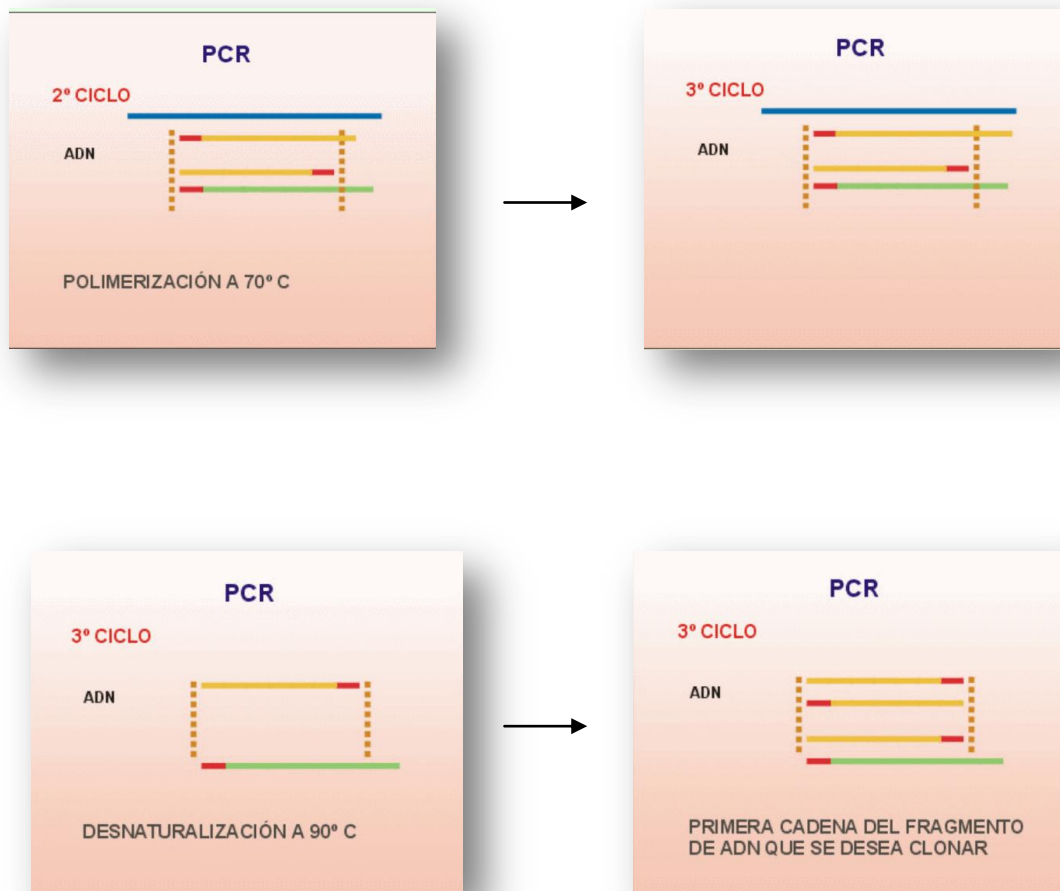


En aquesta fase hi participa la DNA-polimerasa termostable, que comença a sintetitzar una nova cadena de DNA a partir dels primers i en direcció 5' -> 3'.

Una vegada s'ha llegit tota la cadena, comença un altre cicle.

La resta de cicles segueixen el mateix mètode que el primer, fins arribar al 3er on s'obté la primera cadena del fragment que realment es vol clonar



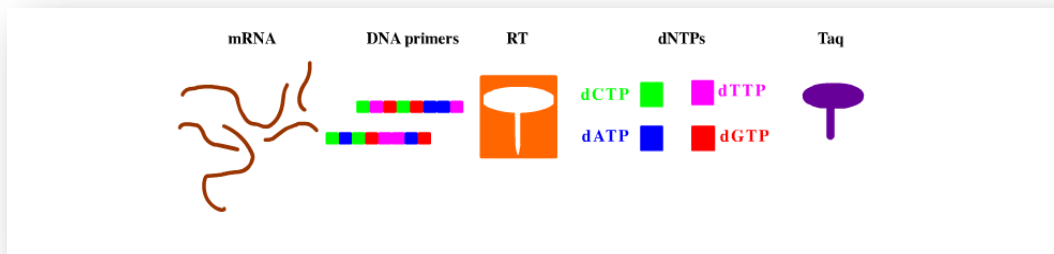


Aquí hem obtingut la primera cadena del fragment que volem clonar, i ara, a partir d'aquestes s'aniran realitzant més cicles per augmentar el nombre de fragments del DNA, fins arribar a uns 20-30.

El procés de la reacció en cadena de la polimerasa, pot realitzar-se també a partir d'un fragment de RNA enlloc d'un de DNA, en aquest cas hi intervé la transcriptasa inversa i el procés és:

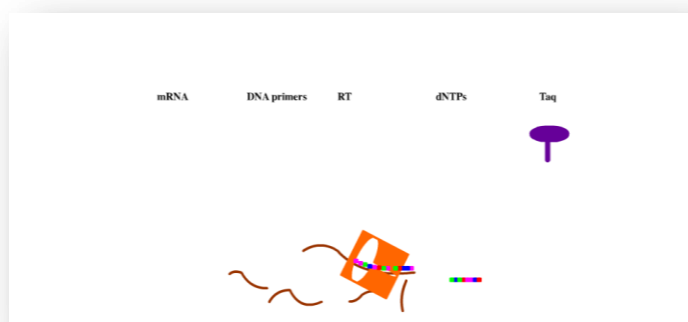
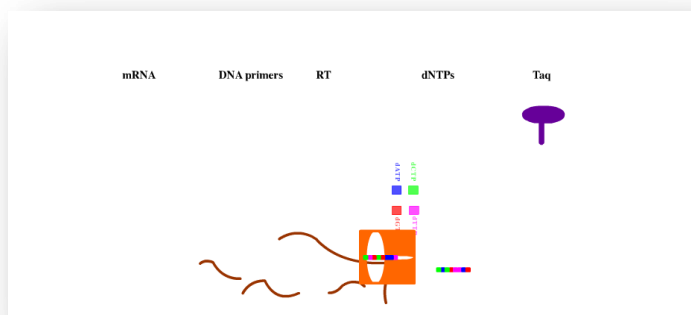
- ❖ Retrotranscripció a partir del RNA
- ❖ Amplificació a partir de la primera cadena de DNA
- ❖ PCR estàndard

Per realitzar-se el procés de la RT-PCR; és també necessària la introducció en un microtub de PCR de:

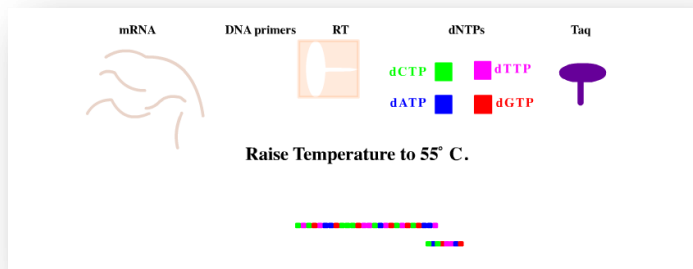


- Un buffer, per mantenir estable el pH d'una dissolució davant l'addició de quantitats relativament petites d'àcids o bases fortes.
- Els quatre tipus de desoxiribonucleòtids, lliures.
- Els oligonucleòtids de cadena senzilla, primers
- La transcriptasa inversa
- DNA polimerasa termostable
- Els fragments de RNA que és volen amplificar

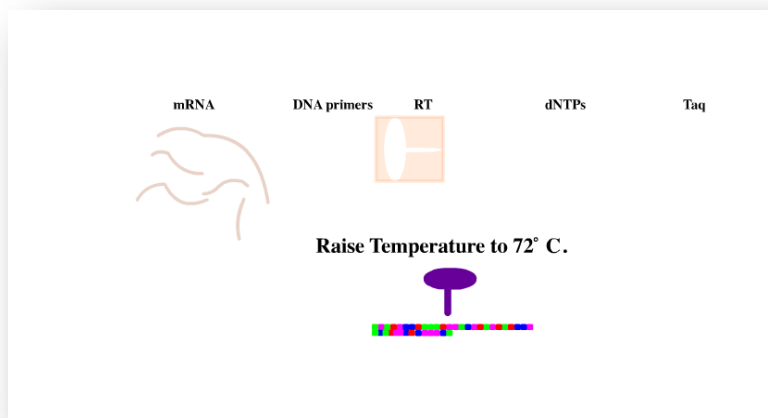
Una vegada està preparada la dissolució, s'incuba a uns 37°C per a que pugui actuar la transcriptasa inversa, la qual sintetitzarà una cadena de DNA a partir del fragment de RNA ja existent.



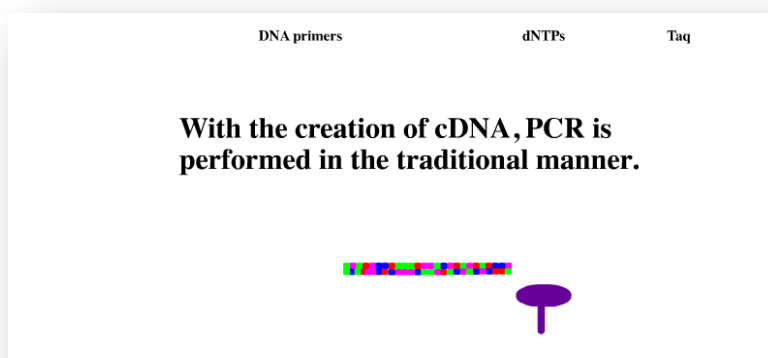
S'augmenta la temperatura a 55°C per a que comenci el procés estàndard de la PCR, on s'uneixen els primers amb les cadenes de DNA, els quals seran utilitzats com a punt de partida en la síntesi d'una nova cadena de DNA.

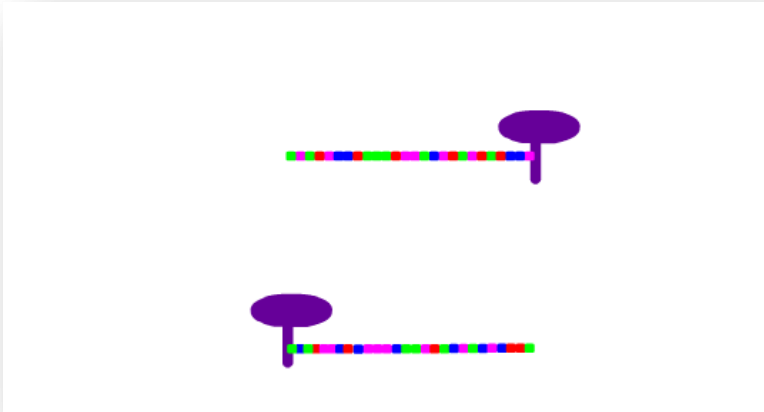


S'augmenta la temperatura fins als 72°C, moment en el que actua la DNA polimerasa termostable.



En arribar a aquest pas, la RT-PCR, segueix com una PCR estàndard.





Es repeteixen els cicles de la PCR fins que s'aconsegueix un nombre elevat de còpies del fragment desitjat.

Tècnica de la PCR en l'enginyeria genètica:

La tècnica de la PCR és fonamental en l'enginyeria genètica ja que; una petita mostra, on hi ha un fragment petit de DNA, no seria suficient per a realitzar estudis genètics com ho son les proves de paternitat o la detecció d'un aliment transgènic perquè la quantitat de DNA present en les cèl·lules és tan petita (de l'ordre de picograms) que es necessitaria una gran quantitat de material cel·lular per aconseguir una quantitat apreciable de DNA.

Tècnica d'electroforesi:

L'electroforesi en gel és un mètode que s'utilitza per a separar macromolècules en funció de la mida, la càrrega elèctrica i altres propietats físiques. El terme electroforesis descriu la manipulació de les partícules carregades sota la influència d'un camp elèctric. "Electro" es refereix a l'electricitat i "foresi" del grec *phoros*, significa transportar. Així doncs, l'electroforesi en gel és una tècnica consistent en aplicar corrent elèctrica a les molècules per a que travessin una placa de gel.

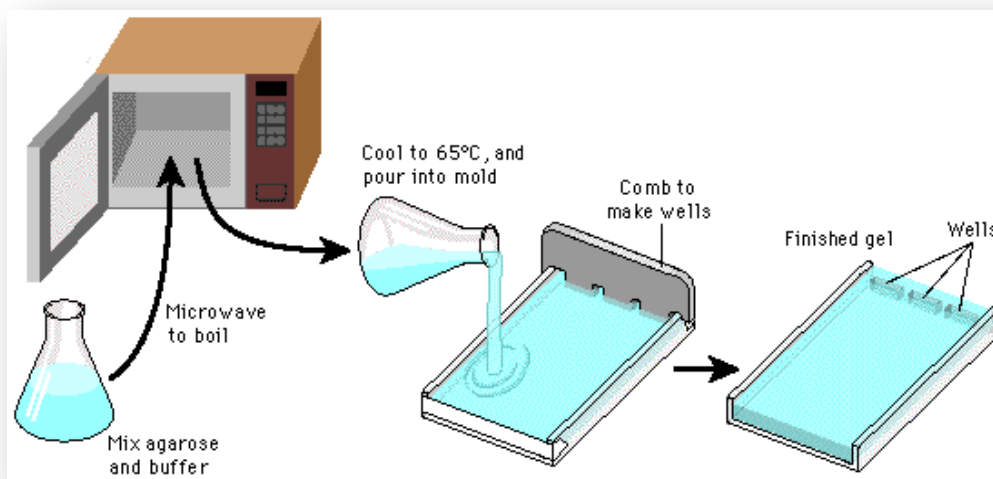
La força motriu de l'electroforesi és la tensió elèctrica aplicada als elèctrodes en ambdós extrems del gel. Les propietats d'una molècula determinen la velocitat amb la que un camp elèctric pot desplaçar-la a través d'un medi gelatinós.

Moltes macromolècules biològiques importants (per exemple, els aminoàcids, els pèptids, les proteïnes, els nucleòtids i els àcids nucleics) posseeixen grups

ionitzables i, a un pH determinat, existeixen en solució com espècies carregades elèctricament, siguin cations (+) o anions (-). Segons la naturalesa de la càrrega neta, les partícules carregades migraran cap al càtode o cap al ànode. Així, per exemple quan s'aplica un camp elèctric a un gel amb pH neutre, els grups fosfat del DNA carregats negativament el faran migrar cap al ànode.

Vàries hores després, quan s'hagi finalitzat la migració del DNA, podem extreure el gel d'agarosa on ha tingut lloc el procés d'electroforesi, i gràcies a l'ajuda de la llum ultraviolada podrem visualitzar el moviment que ha realitzat el DNA.

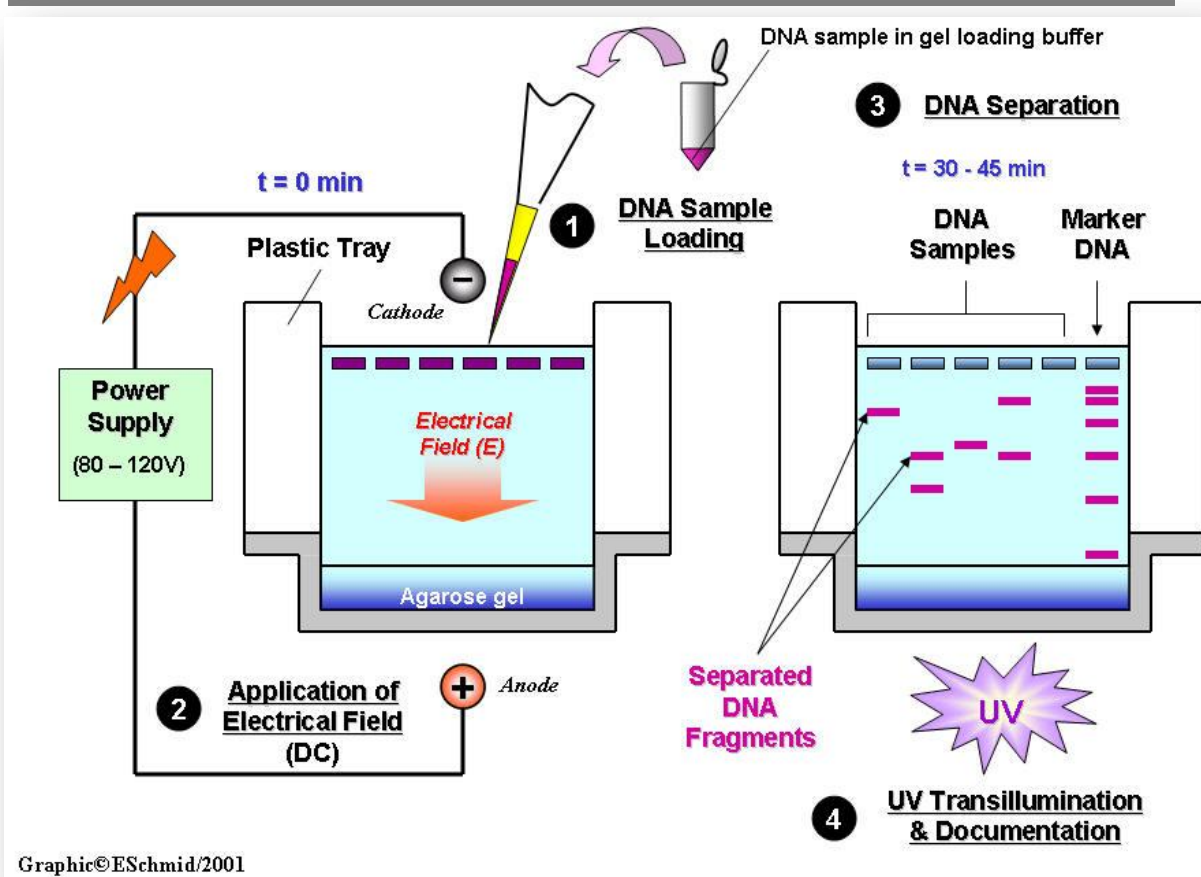
Preparació del gel d'agarosa:



Electroforesi :

En el primer carril de l'electroforesi s'hi introdueix el **Marker DNA**, que és un marcador de mida i pes molecular, també conegut com a proteïna d'escala. És un conjunt d'estàndards que s'utilitzen per a **identificar la mida aproximada d'una molècula** de córrer en gel durant l'electroforesi, utilitzant el principi de que el pes molecular es inversament proporcional a la taxa de migració a través del gel.

En els següents, s'hi introdueixen les solucions a estudiar.



Tècnica de l'electroforesi en l'enginyeria genètica:

L'electroforesi es la tècnica utilitzada per a poder saber per a quines proteïnes codifica un fragment de DNA.

En l'enginyeria genètica serveix com a comprovació, de si la modificació genètica ha estat realitzada amb èxit. És a dir, una vegada l'organisme ha estat modificat, el seu DNA recombinat codificarà per a unes proteïnes, almenys una de les quals és la que nosaltres desitgem; sols ens cal saber el pes molecular d'aquesta, i realitzar una electroforesi amb el material genètic de l'organisme modificat. I així, podrem saber si hi ha alguna proteïna expressada amb el pes molecular que nosaltres coneixem, si la resposta és afirmativa, es tractarà de la nostra proteïna i per tant, aquesta haurà estat sintetitzada a partir del DNA recombinat i això voldrà dir que la manipulació genètica s'ha realitzat amb èxit.

7. APLICACIONS DE L'ENGINYERIA GENÈTICA

Els organismes transgènics han passat a ocupar una posició central en la biotecnologia moderna, perquè permeten fer modificacions molt específiques del genoma (que val la pena analitzar amb detall, degut a les seves importants aplicacions presents i futures).

Les aplicacions de l'enginyeria genètica són aplicables a tractaments mèdics i són la solució a curt i llarg termini de determinades malalties genètiques amb la producció de substàncies diverses d'origen transgènic. Algunes substàncies o tractaments específics obtinguts per aquests mecanismes són:

- Fabricació de proteïnes o pèptids d'interès sanitari
- Fabricació de substàncies hormonals en la llet de la vaca
- Substàncies pal·liatives del dolor
- Trasplantaments d'òrgans i teixits
- Solucions a problemes cardíacs.
- Vies de solució al Dengue.
- Tractaments contra el càncer o la SIDA.
- Diagnòstic i solució de malalties hereditàries: hemofilia, anèmia falciforme, retràs mental, fibrosis quística, esquizofrènia, espina bífida...entre d'altres.
- Fabricació de vacunes transgèniques o d'antibiòtics.

En l'agricultura:

Les llavors i plantes transgèniques es van començar a produir i comercialitzar en la segona meitat del segle XX. El seu ús i comercialització s'ha estès en varis països i regions, per a la seva major productivitat i resistència a plagues. No obstant, existeix un moviment contrari a la seva acceptació al·legant que podrien no ser segures i/o convenients per a la salut i per a l'alimentació dels éssers humans tot i que no existeixi una evidència científica que recolzi aquesta postura, ni cap que la pugui desmentir.

La legislació sobre la producció i venda d'aliments derivats d'organismes modificats genèticament varia enormement d'un país a un altre, variant des de la legalització de la seva producció després de presentar estudis sobre la seguretat, a regions que es declaren lliures de transgènics.

Inexistents al 1993; al 2011 les superfícies cultivades amb OMG (Organismes Modificats Genèticament), representaven 160 milions d'hectàrees segons *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, una organització no governamental de promoció de biotecnologies, casi el 50% en els països de desenvolupament. Això presenta el 3% de les terres agrícoles d'escala mundial, tot i que per a certs països com els Estats Units representen el 17% de la superfície agrícola i el 47% de les terres arables. Segons el mateix organisme el mercat de productes de cultius comercials transgènics com blat, soja, cotó... està valorat en 160 bilions de dòlars (al 2011), i el 13.2 bilions en les seves llavors.

Les organitzacions ecologistes estimen que les xifres concernents a les superfícies de cultius estan sobrevalorats.

Mitjançant l'enginyeria genètica s'ha pogut modificar les característiques d'una gran quantitat de plantes per a fer-les més útils per a l'espècie humana, són les anomenades plantes transgèniques. Les primeres plantes obtingudes mitjançant aquestes tècniques van ser un tipus de tomaqueres, aconseguint que els seus fruits tardessin en madurar algunes setmanes més després d'haver estat collits.

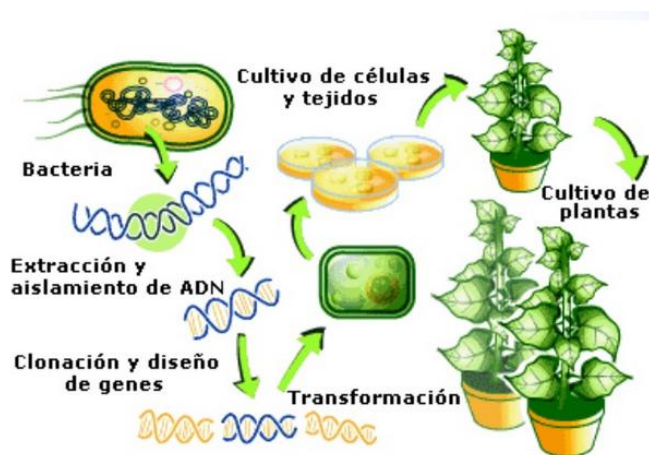
Recordant que la cèl·lula vegetal posseeix una rígida paret cel·lular el primer que s'ha de fer es obtenir protoplasts; unes cèl·lules desproveïdes de paret

cel·lular que s'aconsegueix emprant enzims que destrueixen la làmina mitja i desorganitzen la paret de cel·lulosa.

En els cultius cel·lulars s'hi poden realitzar diferents tècniques per a modificar el patrimoni genètic de les cèl·lules que el formen.

Tècniques indirectes:

Transformació de les cèl·lules mitjançant *Agrobacterium tumaciens*, bacteri que es pot considerar el primer enginyer genètic, degut a la seva particular biologia. On el bacteri és utilitzat com a vector dels gens que es desitgen introduir en una cèl·lula vegetal, on s'aconsegueix la transformació de la cèl·lula, la qual pot regenerar per micropropagació una planta plenament transgènica.



Tècniques directes:

Electroporació, microinjecció, liposomes i mètodes químics.

En animals de granja:

L'enginyeria genètica en animals de granja s'ha dirigit a millorar la productivitat animal: s'han desenvolupat vaques que produeixen més llet, ovelles que produeixen més llana i peixos amb una major taxa de creixement.

La producció de peixos genèticament modificats és objecte de molt interès des del punt de vista comercial, sent els trets de major interès el creixement, la resistència a les malalties i la millor tolerància ambiental. S'han obtingut ja

peixos transgènics de, al menys, 20 espècies, i dos d'aquests estan esperant la seva aprovació als Estats Units per a poder ser utilitzats com a aliment.

La manipulació genètica de animals de granja és, també, objecte de preocupació en alguns sectors a causa del sofriment que pot comportar a l'animal la introducció d'uns transgen. Per exemple, els porcs transgènics als que s'ha introduït el gen de l'hormona de creixement de la vaca per incrementar la seva producció de carn, pateixen artritis, úlceres, malalties del ronyó i problemes de fertilitat.

La modificació genètica s'ha estès en un gran nombre d'espècies com per exemple el cuc de seda per segregar col·lagen o fibres de nous colors i qualitats úniques; o erugues portadores de *espidroína*, la proteïna responsable del ultra resistent fil de les aranyes, amb el qual es disposaria d'abundant matèria prima per a teixir paracaigudes i armilles antibales.

En l'estudi de malalties:

Molts animals transgènics es dissenyen per a augmentar la comprensió del paper dels gens en el desenvolupament d'una malaltia, o per a imitar malalties humanes amb la finalitat d'investigar nous tractaments.

Existeixen models transgènics per a una ampla varietat de malalties humanes, com càncer, fibrosis quística, artritis reumàtica i Alzheimer. L'inconvenient radica en que aquests animals no siguin, probablement, ni adequats ni rellevants com a models humans.

En la producció de productes biològics:

Es poden crear animals transgènics que produeixin productes biològics útils (medicaments, proteïnes...) mitjançant la introducció de la porció de DNA que codifica aquest producte en particular. Per exemple, el tractament del enfisema es duu a terme mitjançant la proteïna humana *a-1-antitripsina*, i s'han desenvolupant ovelles que produeixen aquesta proteïna en la seva llet en majors quantitats que en els cultius cel·lulars convencionals.

No obstant, la producció de proteïnes alienes a l'organisme de l'animal pot provocar-li problemes en les seves funcions biològiques.

En l'assaig de seguretat de vacunes i productes químics:

S'han desenvolupat ratolins transgènics per assajar la seguretat de les vacunes abans de subministrar-les en humans. També s'emprenen animals transgènics amb gens que els fan més sensibles a la toxicitat de fàrmacs o productes químics presents en l'ambient, de forma que en els assajos es realitzen amb menys animals i s'obtenen resultats amb més rapidesa.

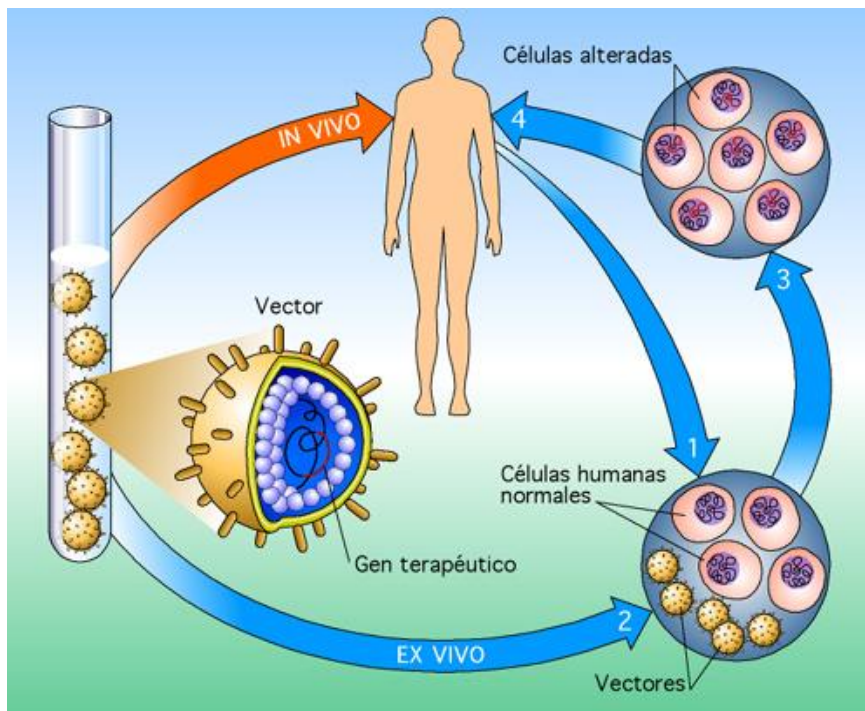
Per a la donació d'òrgans:

S'han desenvolupat porcs transgènics amb al finalitat de produir òrgans per a transplantaments de forma que no existeixi el rebuig per el sistema immunològic del pacient. Per això s'ha introduït un gen que expressi una proteïna humana en la superfície de les cèl·lules de l'animal, de manera que aquestes cèl·lules no son desconegudes per al sistema immune de l'humà i per tant s'evita el rebuig.

Aquest procediment no es tan senzill com pot semblar, ja que evitar la resposta immune implica tenir en compte altres factors a part dels mencionats. Per una altra banda, existeix la preocupació de que els transplantaments d'animals a humans permetin a un virus animal saltar a l'espècie humana, amb el conseqüent risc d'epidèmia.

8. TERÀPIA GÈNICA:

La teràpia gènica és un tractament mèdic que consisteix en manipular la informació genètica de cèl·lules malaltes per a corregir un defecte genètic o per a dotar a les cèl·lules d'una nova funció que els permeti superar una alteració.



Amb l'ajuda dels vectors adequats, que són generalment els virus, s'introdueix el gen correcte i s'integra en el DNA de la cèl·lula malalta mitjançant tècniques de recombinació genètica.

En principi existeixen tres formes de tractar malalties amb aquestes teràpies:

- Substituir gens alterats:

Es poden corregir mutacions mitjançant la cirurgia genètica, substituint el gen defectuós o reparant la seqüència mutada.

- Inhibir o contrarestar efectes nocius:

Es duu a terme mitjançant la inhibició dirigida de l'expressió gènica. Aquest procés es desenvolupa bloquejant promotors, interferint amb els mecanismes d'expressió gènica mitjançant RNAs "anti-sentit", que són complementaris de RNA-missatgers i s'uneixen a ells bloquejant-los o, més recentment mitjançant

siRNA (“small interfering RNA”, “RNAs, petits interferents”) que bloquegen seqüències específiques de RNA, pel que poden inhibir qualsevol gen bloquejant els seus RNA missatgers.

- Inserint nous gens:

Es realitza per suspensió dirigida de cèl·lules específiques. S'insereixen gens suïcides que destrueixen a la pròpia cèl·lula que els allotja o gens estimuladors de la resposta immune. També es pot introduir una còpia d'un gen normal per a substituir la funció d'un gen mutant que no fabrica una proteïna correcta.

Per exemple, en el tractament dels càncers que es realitza avui en dia, una de les principals vies d'investigació és la de marcar genèticament a les cèl·lules tumorals d'un càncer per a que l'organisme les reconegui coma estranyes i pugui lluitar contra elles, estimulant la resposta immune, Unes altres estratègies que es segueixen en l'actualitat contra el càncer són: inactivar oncogens, introduir gens supressors de tumors, introduir gens suïcides o gens que augmentin la sensibilitat a fàrmacs...

Aquí es recullen alguns dels tractaments que s'utilitzen recentment:

Enfermedad	Incidencia	Gen implicado	Alteración	Células a modificar	Vector
Inmunodeficiencia combinada Severa (SCID)	Rara	Adenosina desaminasa	Falta de función génica	Médula ósea / Linfocitos T	Retrovirus
Hemofilia A	Varones	Factor VIII de coagulación	Falta de función	Hepatocitos / Fibroblastos	
Hipercolesterolemia familiar	1/500	Receptor de LDL	Falta de función	Hígado	Retrovirus
Fibrosis quística	1/2.500	CFTR	Falta de función	Pulmón	Adenovirus Liposomas
Distrofia muscular de Duchenne	1/10.000 varones	Distrofina	Falta de función	Músculo	
Cáncer	Alta	Multifactorial	Falta de control de la proliferación y muerte celular	Múltiples tipos celulares	

Tomado de Mayor Menéndez, F.

9. PROJECTE GENOMA HUMÀ:

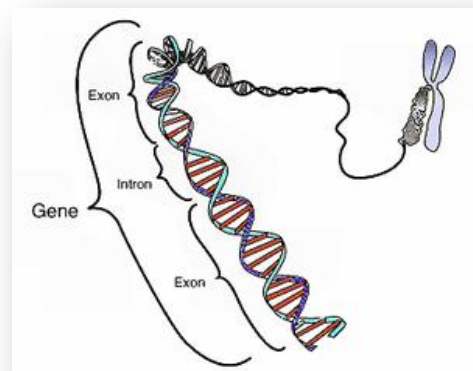
Proyecto del Genoma Humano



Per a poder explicar en què consisteix el Projecte Genoma Humà, cal saber què és el genoma humà.

El genoma humà és el genoma del Homo Sapiens Sapiens, és a dir, la seqüència de DNA continguda en 23 parells de cromosomes en el nucli de cada cèl·lula humana diploide.

La seqüència de DNA que forma el genoma humà, conté codificada la informació necessària per a l'expressió, altament coordinada i adaptable a l'ambient, del conjunt de les proteïnes de l'ésser humà. I, són les proteïnes i no el DNA, les principals biomolècules efectores, és a dir, contenen funcions estructurals, enzimàtiques, metabòliques, reguladores...



El conjunt de proteïnes de l'ésser humà, anomenat pròtoma fonamenta la morfologia i la funcionalitat de cada cèl·lula. Alhora que l'organització

estructural i funcional de les cèl·lules forma els teixits i els òrgans, i, finalment l'organisme viu en el seu conjunt.

Així, el genoma humà conté tota la informació bàsica i necessària per al desenvolupament físic d'un ésser humà complet.

Introducció: origen i justificació del projecte:

El Projecte genoma humà va ser el primer gran esforç coordinat internacionalment en la història de la biologia. Proposant-se determinar la seqüència completa (més de $3000 \cdot 10^6$ parells de bases) del genoma humà, localitzant amb exactitud (cartografia) els 100.000 gens aproximadament i la resta de material hereditari de la nostra espècie, responsables de les instruccions genètiques del que som des del punt de vista biològic.

Realment, el que anomenem *Projecte Genoma* és el terme genèric amb el que designem una sèrie de diverses iniciatives per a conèixer al màxim detall els genomes no tan sols dels humans, sinó d'una sèrie d'organismes model de tots els dominis de la vida, tot el qual s'espera que doni un impuls formidable en el coneixement dels processos biològics (des de l'escala molecular fins a l'evolutiva) i de la fisiologia i patologia dels éssers humans, i que es traduiria en multitud d'aplicacions tècniques i comercials en àmbits com el diagnòstic i teràpia de malalties, biotecnologies, instrumental, computació, robòtica...

Fins a mitjans de la dècada dels anys 80 la metodologia del DNA recombinant i les seves tècniques associades (vectors de clonació, enzims de restricció, transformació artificial de cèl·lules procariotes i eucariotes, biblioteques de gens, sondes moleculars, seqüenciació, genètica inversa, PCR...) no havien arribat a una maduresa suficient com per a que es plantegés la pertinència i viabilitat d'un projecte coordinat de caracterització detallada (fins a nivell de seqüència de nucleòtids) del genoma humà i de genomes d'una sèrie d'organismes model.

Per què cartografiar i seqüenciar genomes?

La biologia pretén donar respostes el més completes i detallades possibles dels fenòmens vitals. Al ser el DNA la molècula universal de l'herència, i constituir la base genètica de la vida, la tendència natural ha sigut acabar buscant explicacions al nivell del DNA. Aquest coneixement molecular pot donar la clau de molts fenòmens que avui entenem a nivells menys profunds ja descrits per altres ciències biològiques (fisiologia, biologia cel·lular, bioquímica...)

Ha arribat un moment en que es planteja que abordar l'estudi detallat dels genomes dels organismes és molt menys costós i més interessant intel·lectualment, aconseguint el coneixement detallat de la seqüència. Però els *Projectes Genoma*, no són més que un punt de partida per a nous descobriments en les ciències biomèdiques. Amb les dades de seqüències s'haurà de treballar per a donar respostes a qüestions de expressió de gens, de regulació genètica, de interacció de les cèl·lules amb el seu entorn...

La seqüenciació de genomes de plantes i animals domèstics conduirà a nous avenços en la millora agrònoma i ramadera.

Per a entendre l'evolució serà cada vegada més essencial el disposar de dades de seqüències. La bioinformàtica permet comparar gens i genomes complets, fet que junt amb altres dades biològiques i paleontològiques, està donant noves claus de l'evolució de la vida.

La principal justificació del *Projecte Genoma Humà* de cara a la societat és la promesa de avenços importants en medicina. Tot i que l'estudi de les malalties en humans s'ha vingut fent majoritàriament amb l'absència de la seva comprensió genètica, la disponibilitat de tècniques poderoses anima a emprendre la seqüenciació sistemàtica, el que subministrarà un formidable impuls sobre tot per a les malalties poligèniques i multi factorials; identificant els gens que els causen o que contribueixen a elles, i així poder determinar els canvis en la seqüència que determinen la malaltia.

Una de les conseqüències més immediates del *Projecte Genoma Humà* (i que ja experimentades des de fa uns anys) és la de disposar de sondes i marcadors moleculars per al diagnòstic de malalties genètiques, de càncer i de malalties infeccioses. A llarg termini s'espera que alhora, la investigació genòmica permeti dissenyar noves generacions de fàrmacs, que siguin més específics i que tendeixin a tractar les causes i no tan sols els símptomes. La teràpia genètica, tot i que de moment està en els primers passos; pot aportar solucions a malalties, no sols hereditàries, sinó càncer i malalties infeccioses.

Un dels principals objectius és desenvolupar a curt termini tecnologies de vanguardia. És a dir, una de les principals justificacions del projecte és la necessitat d'impulsar poderoses infraestructures tecnològiques que han de proporcionar a les institucions, empreses i països implicats un lloc de privilegi en la investigació biomèdica i en multitud d'aplicacions industrials com: diagnòstic, teràpies, instrumental de laboratori, robòtica, hardware, software...

Amb la seqüenciació del genoma, disposarem de la informació necessària per a obtenir qualsevol gen particular en mostres de DNA i continuar la investigació en la biologia molecular humana.

Així també, poder proporcionar l'oportunitat per a elaborar proteïnes humanes abans desconegudes amb un valor potencial en la medicina.

Origen del Projecte Genoma

Tot i que abans dels anys 80 ja s'havia realitzat la seqüenciació de gens solts de molts organismes, així com de "genomes" d'entitats subcel·lulars (alguns virus i plasmidis), i tot i que "flotava" en el entorn d'alguns grups d'investigació la idea de comprendre els genomes d'alguns microorganismes, la concreció institucional del PGH va començar als Estats Units al 1986 quan el ministre d'energia (DOE), en un congrés a Santa Fe (New Mexico) va plantejar dedicar una bona partida pressupostària a la seqüenciació del genoma humà, com mitjà per a afrontar sistemàticament l'avaluació del efecte de les radiacions sobre el material hereditari. L'any següent, després d'un congrés de biòlegs al *Laboratori de Cold Spring Harbor*, va unir-se a la idea l' *Institut Nacional de la Salut (NIH)*, un altre organisme públic amb més experiència en biologia (però

no tanta com el DOE en la coordinació de grans projectes d'investigació). El posterior debat públic va tenir l'habilitat de captar la imaginació dels responsables polítics i oferir l'atractiu de que no tan sols el PGH era el gran emblema tecno-científic de finals de segle (com havia estat el Projecte Apolo en els anys 60), sinó que una de les seves finalitats explícites era desenvolupar tecnologies de vanguardia i coneixement directament aplicable (no sols en el camp de la biotecnologia) que assegurarien la primícia tecnològica i comercial del país en el segle XXI. Al 1988 es van publicar informes de l'*Oficina de Avaluació Tecnològica del Congres* (OTA) i del Consell Nacional d'Investigació (NRC), que van suposar recolzaments essencials per a donar llum verda a la iniciativa. En el mateix any s'estableix l' *Organització del Genoma Humà* (HUGO), com una entitat destinada a la coordinació internacional, a evitar duplicacions d'esforços, i a disseminar el coneixement.

El començament oficial del PGH correspon al 1990, i es calcula que finalitzaria al 2005. Els seus objectius eren elaborar en una primera etapa mapes genètics i físics amb una suficient resolució, mentre se posaven a punt tècniques més eficients de seqüenciació, de manera que en la fase final es pogués abordar la seqüenciació de tot el genoma humà. Entre els objectius s'hi inclou la caracterització i seqüenciació d'organismes model, i la creació de infraestructures tecnològiques, entre la que destaquen noves eines de hardware i software destinades a automatitzar tasques, a processar l'enorme quantitat de dades que s'esperen, i a extreure la màxima informació biològica i mèdicament significativa.

El projecte tenia un termini de 15 anys però degut a tota la col·laboració internacional en el camp de la genòmica, la tecnologia computacional i d'altres, el primer esborrany del genoma va ser anunciat per Bill Clinton i Tony Blair el 26 de Juny del 2000.

Anys després, a l'Abril del 2003 va ser presentat el genoma complet, dividit en fragments que formen els 23 parells de cromosomes diferents de l'espècie humana. El genoma humà està compost entre aproximadament 22500 i 25000 gens diferents i cadascun d'aquests gens conté codificada la informació

necessària per a la síntesi d'una o varies proteïnes (o de RNA funcionals, en el cas dels gens RNA).

Metodologia del Projecte Genoma Humà

El PGH, al tractar-se d'un projecte que pretén identificar la seqüència completa del genoma humà, tant les seqüències codificants (exons) com les no codificants (introns), necessita de tècniques que permetin identificar el lloc (*locus*) i la distància en que es troben aquest gens. La seqüenciació és el procés per el qual s'identifiquen les seqüències en que estan unides els $3 \cdot 10^9$ parells de bases i, posteriorment, saber què signifiquen aquestes seqüències. En un principi va acordar-se que el PGH es realitzaria en dues etapes, una de lligament o cartografia genètica de tots els cromosomes, etapa que va concloure al 1998, i una altra que correspon a la seqüenciació, que va iniciar-se al 1998 i va finalitzar al 2003.

Existeixen dos categories principals de tècniques de cartografia genètica:

Lligament o cartografia genètica; que sols identifica l'ordre relatiu dels gens al llarg del cromosoma

Cartografia física, que son mètodes més precisos per a determinar les distàncies entre gens dins del cromosoma

La cartografia mitjançant lligament es va desenvolupar a principis del segle XX gràcies al treball de T.H. Morgan. El mapa de lligament de Morgan localitza una sèrie de seqüències marcadores, una respecte a una altra i respecte a un gen defectuós. D'aquesta manera, es pot determinar la regió cromosòmica que conté un gen mutat que s'hereta d'acord a les Lleis de Mendel. Al 1994 el mapa genètic del PGH contenia 6000 marcadors ubicats a menys de un milió de parells de bases l'un de l'altre.

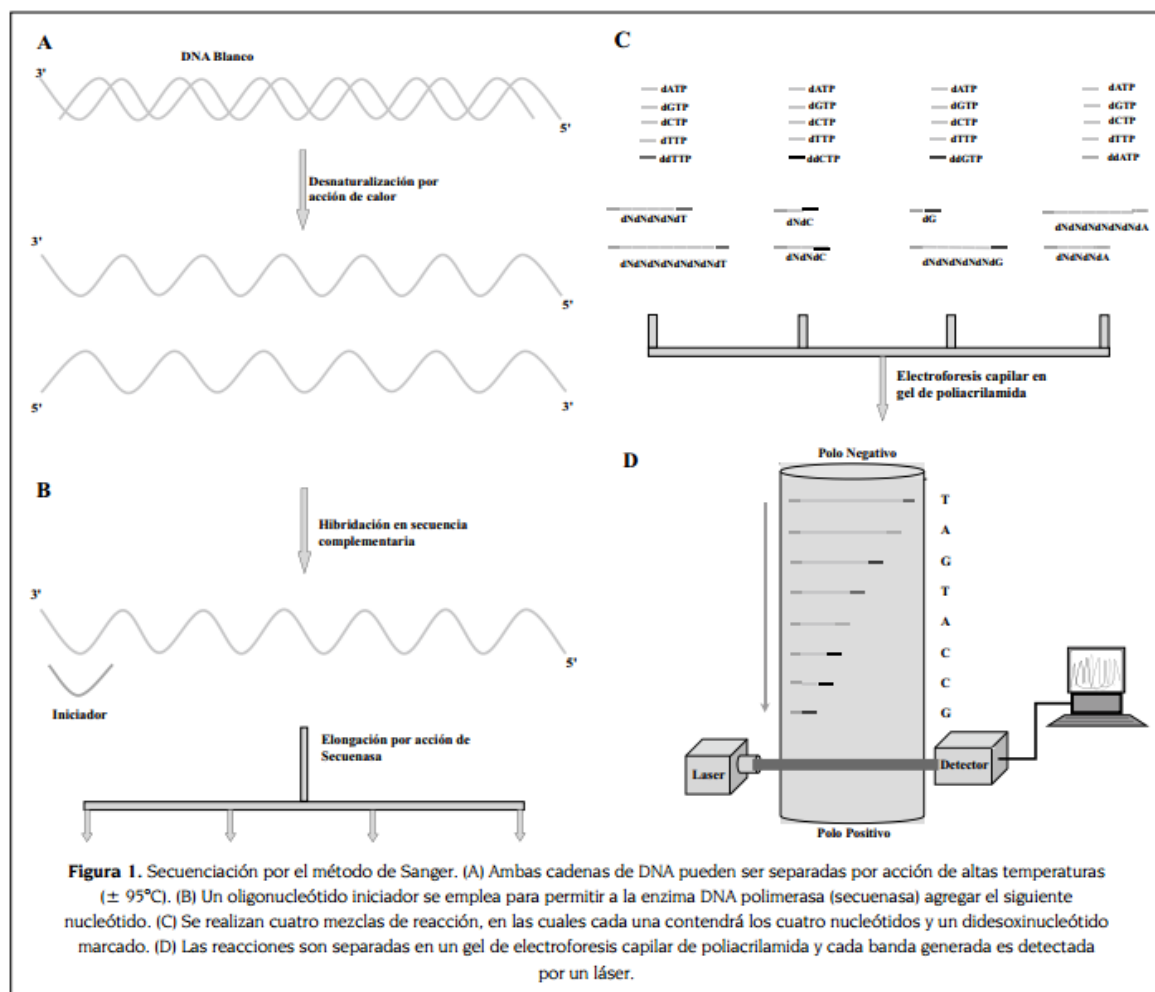
La cartografia física determina la distància real entre punts diferenciats dels cromosomes. Les tècniques més precises combinen robòtica, ús de làser i informàtica per a mesurar la distància entre marcadors genètics. Per a realitzar aquests mapes s'extrau el DNA dels cromosomes humans i es trenca aleatòriament en nombrosos fragments. A continuació, aquests es dupliquen

varies vegades en el laboratori per a analitzar les còpies idèntiques obtingudes, anomenades clons. Els clons que comparteixen varies marques procedeixen generalment de segments superposats del cromosoma. Les regions de superposició dels clons poden, a continuació, ser comparades per a determinar l'ordre global de les marques al llarg del cromosoma i la seqüència exacta que ocupen inicialment els segments de DNA clonats. Els mapes físics especifiquen distàncies físiques que es poden mesurar en parells de bases o en alguns dels seus múltiples. El mapa físic correspon a la pròpia seqüència del genoma. Però abans d'arribar a obtenir-la, s'ha d'elaborar mapes físics partint de resolucions baixes i avançant cap a les resolucions cada vegades més grans.

En certa manera, els mapes físics de menys resolució són els propis cariotips: la visualització microscòpica de la dotació cromosòmica haploide humana tenyida amb colorant de Giemsa; mostra un patró alternant de bandes clares i fosques, on cada banda conté una mitjana d'uns 7 milions de parells de bases.

En el PGH es va utilitzar primordialment un mètode de seqüenciació desenvolupat per el britànic i dos vegades premi Nobel, Frederick Sanger. Aquest mètode consisteix en replicar peces específiques de DNA i modificar-les, de mode que acabin en una forma fluorescent d'un dels quatre nucleòtids.

En els seqüenciadors moderns automàtics de DNA, el nucleòtid modificat, situat a l'extrem d'una de les cadenes, es detecta amb un feix de làser i es determina el nombre exacte de nucleòtids de la cadena. A continuació, es combina aquesta informació en un ordinador per a reconstruir la seqüència de parells de bases de la molècula original de DNA.

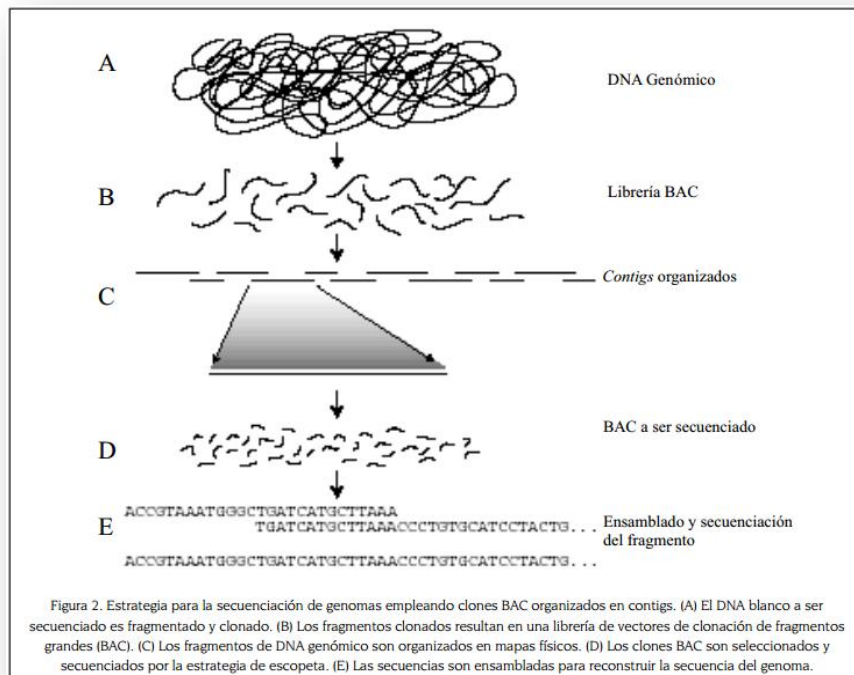


Els mapes físics de més resolució se solen elaborar a partir de genoteques (biblioteques de gens) en les que el genoma a estudiar es troba fragmentat en multitud de trossos aleatoris i desordenats, cadascun d'ells clonat per separat en un vector adequat: plasmidi, cromosomes artificials de llevats (*Yeast Artificial Chromosomes, YACs*), cromosomes artificials de bacteris (*Bacterial Artificial Chromosomes, BACs*), etc. L'elaboració dels mapes físics és, de certa manera, similar a la d'acoblar un trencaclosques: consisteix en ordenar els fragments del genoma mitjançant la cerca de fragments que tenen alguna zona en comú; és a dir, trobar conjunts de parells de fragments parcialment superposats. Això condueix al concepte *contig*⁷ (de *contiguous*), que és un conjunt de fragments d'un genoma que s'han clonat per separat, però que son contigus i que estan parcialment superposats.

Contig⁷: Un *contig* és un conjunt de la superposició dels segments de DNA que en conjunt representen una regió consens de DNA. En els projectes de seqüenciació de baix a dalt un *contig* es refereix a la superposició de dades de seqüències. En els projectes de seqüenciació jeràrquica (de dalt a baix), *contig* es refereix als clons superposats que formen un mapa físic del genoma que s'utilitza per guiar la seqüenciació i acoblament. *Contig* tant, pot referir-se tant a la superposició de seqüència de DNA i per la superposició de segments físics (fragments) contingudes en els clons depenent en el context.

La cartografia dels *contigs* es pot realitzar buscant la “empremta genètica” comú a diferents clons d'una genoteca de DNA humà. Aquesta empremta pot consistir en un patró compartit de seqüències de enzims de restricció (que es poden indagar ajudant-se d'algorismes i programes de còmput adequats).

Les estratègies més recents fan ús de DNA humà en forma d'uns 20.000 fragments independents clonats als BACs, i buscant la “empremta genètica comú” entre clons amb base en la detecció de determinades seqüències repetitives. L'última gran fita en quant a l'elaboració de mapes física, ha estat el desenvolupament de “*marcadors físics universals*” fàcilment generables, que permeten que les dades obtingudes en un laboratori siguin ràpidament compartides i assumides per tota la comunitat investigadora. Es tracta dels anomenats “llocs etiquetats per la seva seqüència” (*Sequence Tagged Sites, STS*). Els STS consisteixen en fragments curts de DNA (de entre 100 i 1000 parells de bases) dels quals se'n coneix la seva seqüència exacta i es sap que és única en tot el genoma. Els STS defineixen punts concrets únics del mapa físic i constitueixen magnífics “marcadors” fàcilment detectables.



La tasca dels STS ajuda a elaborar mapes de *contigs* segons el contingut del STS dels clons superposats. Aquests mapes de STS permeten la integració dels mapes genètics i físics, fan accessible la fase de seqüenciació i faciliten la clonació de gens implicats en malalties mitjançant la estratègia del candidat posicional; que consisteix en utilitzar informació disponible sobre la funció i posició en el mapa de gens prèviament aïllats, informació que es pot obtenir d'altres projectes de genoma.

L'equip de la companyia Celera Genomics, que inclou a uns 282 investigadors d'institucions dels EEUU, Austràlia i Espanya, en representació de 12 organitzacions acadèmiques, sense finalitats de lucre i comercials, va obtenir mostres de DNA de cinc persones, tres dones i dos homes. Aquest grup va incloure un afroamericà, un xinès, un hispà i dos europeus. Després de seleccionar-los per alliberar-los de contaminants i conjuntar-los en biblioteques de DNA, es van analitzar els trossos del codi genètic d'aquests donants.

Un element central d'aquesta anàlisi va ser la estratègia de "shotgun" (o escopeta). Aquest sistema computat comença fragmentant el genoma en un

conjunt a l'atzar de peces d'una longitud coneguda de 2.000 pb (parells de bases), 10.000 pb i 50.000 pb. Després de la seva seqüenciació, s'utilitzen operacions matemàtiques per acoblar els fragments en blocs continus i assignar-los al lloc correcte que ocupen en el genoma. En comparació, el mètode de Sanger duplica grans trossos del codi humà en forma de clons BACs els quals poden ser col·locats en el mapa del genoma en la regió apropiada. Aquesta estratègia, utilitzada per els investigadors del Projecte Genoma Humà, i finançada amb fons públics, concentra al començament més temps i esforç en la generació de clons i mapes, mentre que l'estratègia de Celera Genomics utilitza al final, amb més intensitat, la computació.

Celera Genomics va utilitzar el mètode d'escopeta per establir la seqüència del DNA cobrint, per tant, tot el genoma cinc vegades. A continuació, la informació del genoma dels BACs, dipositada en el banc de dades públic, va ser dividida en segments curts de 550 bases i carregada en la fórmula d'escopeta per a cobrir el genoma unes altres 2.9 vegades. El grup de investigació va acoblar després diverses vegades la seqüència del genoma humà, utilitzant dos fórmules o operacions matemàtiques: un enfocament de *Acoblament del Genoma Íntegre* (Ensamblado del Genoma Íntegro EGI), que va permetre treballar de immediat amb tota la seqüència, i un *Acoblament d'Escopeta Dividit en Compartiments* (Ensamblado de Escopeta Dividido en Compartimentos EEC), dissenyat per aclarir segments específics. La seqüència produïda per Celera cobreix més del 99% del genoma. Segons Celera, al voltant del 85% del genoma està en segments correctament ordenats de, al menys, 500.000 parells de bases. La seqüència indica la existència de 26.383 gens codificants de proteïnes i, dèbilment, indica la existència de uns altres 12.731 gens humans hipotètics. Per tant, el total dels gens varia de 26.383 a 39.114. Per a fer una doble comprovació de la precisió de la seva seqüència, es va comparar el treball descrit amb seqüències completades dels cromosomes 21 i 22 i es va trobar una "excel·lent concordança". Quan es va comparar amb la seqüència de la resta dels cromosomes, l'anàlisi va insinuar que hi ha molts més punts de ruptura (errors d'acoblament o variacions genètiques) en el projecte d'acoblament finançat amb fons públiques, que en l'acoblament de Celera.

En les últimes dates es van crear els xips de hibridació que serveixen com un mètode de seqüenciació per hibridació en xips amb oligonucleòtids. Es basa això en sintetitzar diferents sondes de oligonucleòtids i unir-les en disposicions ordenades (arranjaments) a una fina placa de nylon o vidre. El xip es prova davant un DNA marcat amb fluorescent, de manera que el patró i la quantitat de fluorescència subministra informació sobre el DNA en qüestió. Per concloure l'estudi pilota sobre les seves possibilitats, l'empresa Affimetrix ha aconseguit re-seqüenciar per aquest mètode els 16kb de DNA mitocondrial humà, amb un dispositiu format per 135.000 oligonucleòtids.

Resultats obtinguts per el Projecte Genoma Humà:

El genoma humà conté $3,1645 \cdot 10^6$ kb de nucleòtids

La mida del gen promig consisteix en 3.000 bases, però les mides varien enormement. El gen humà més gran conegut és el que codifica per a la distrofina, amb 2.4 milions de bases.

El nombre total de gens estimats és de 30.000 a 35.000, molt menys del que s'esperava anteriorment (de 80.000 a 140.000)

Quasi totes les bases de nucleòtids (99,9%) són exactament les mateixes en tota la població.

Les funcions són desconegudes per a més del 50% dels gens descoberts.

Menys del 2% del genoma codifica per a proteïnes.

Les seqüències repetitives, com es pensava, no tenen funcions directes, però donen suport a l'estructura i la dinàmica del cromosoma. Amb el temps, aquestes repeticions acomoden al genoma, creant nous gens i modificant i reorganitzant els gens existents.

Durant els passats 50 milions d'anys, sembla haver ocorregut una disminució dramàtica en la taxa d'acumulació de repeticions en el genoma humà.

La proporció de heterocromatina seqüenciada del genoma comprèn aproximadament $2.9 \cdot 10^6$ kb de DNA. La mida total del genoma és aproximadament de $3.2 \cdot 10^6$ kb; per la qual cosa al 10% restant ($0.3 \cdot 10^6$ kb) correspon a seqüències altament repetitives en l'heterocromatina⁸. La majoria de les seqüències altament repetitives són elements transposables⁹, és a dir, que poden canviar de lloc, que es mouen al llarg de tot el genoma com intermediaris de RNA, aquests representen el 45% de la seqüència de eucromatina¹⁰. Un altre 5% del genoma consisteix de segments de DNA duplicat, de tal manera que prop del 60% del genoma humà consisteix de seqüències de DNA repetitives.

Heterocromatina⁸: Cromatina nuclear que està condensada durant la interfase i forma els cromocentres o nuclèols falsos.

Elements transponibles⁹: (En genètica molecular) Fragment o segment de DNA que es pot moure o pot ser mogut d'un lloc a un altre del genoma.

Eucromatina¹⁰: Cromatina nuclear que presenta la màxima càrrega de DNA durant la metafase de la divisió cel·lular i que desapareix en el nucli en repòs.

Perspectives del Projecte Genoma Humà:

“La gent pensava que ja amb això tindriem la clau per entendre les malalties. Però es va descobrir un problema: tots estem constituïts per les mateixes proteïnes; no obstant, no tothom produeix la mateixa quantitat ni en el mateix moment” *Dr. Arturo Ortega, ex-cap del Departament de Genètica i Biologia Molecular de Cinvestav.*

El Projecte Genoma Humà influirà en la biomedicina, ja que permetrà avançar en el coneixement de la base genètica de malalties (medicina genòmica) i obrirà perspectives noves en el diagnòstic, pronòstic i tractament de malalties; tot i que això últim requerirà d'una investigació post-genòmica.

Diagnòstic molecular: Detecció de mutacions.

L'avanç en el PGH i en els mapes i seqüències ja disponibles impulsen la necessitat de disposar de tècniques capaces de rastrejar DNA en la cerca de mutacions associades amb malalties humanes. En els pròxims anys s'hauran identificat la major part dels gens implicats en malalties humanes importants i en les bases de dades s'està introduint informació sobre mutacions i les seves implicacions clíniques. Un dels reptes de la medicina serà fer ús d'aquesta informació per a millorar el diagnòstic i pronòstic de les malalties dins de segments de DNA amb una seqüència coneguda.

Nous i millor marcadors polimòrfics.

Els SNPs¹¹ es troben freqüentment en el genoma i existeix un SNP cada 1.000 parells de bases, aproximadament. Tot i que la majoria dels SNPs es troben fora de la regió codificant dels gens, alguns contribueixen directament a la patologia per alteració d'un gen i com a conseqüència, de la proteïna corresponent. Els SNPs són la base d'un fort desenvolupament en el terreny de la disciplina farmacigenòmica i per al descobriment de nous caràcters associats amb malalties.

Els "xips" genètics.

Els SNPs proporcionen la base per a confeccionar un mapa genètic detallat de cada individu. La possibilitat d'avaluar la variació individual en un sol assaig genètic és factible gràcies al desenvolupament de la microelectrònica aplicada a la genètica molecular. Un conjunt de sondes derivades dels SNPs (que representen la variació genòmica d'un individu) es fa reaccionar amb el xip i permet obtenir un patró d'hibridació característic del genoma de l'individu estudiat. El perfil genètic s'interpreta en un lector de fluorescència confocal i en la seva anàlisi intervé un processador electrònic. Aquest tipus d'anàlisis permetrà no sols continuar l'anàlisi de malalties genètiques monofactorials, sinó també començar amb millors possibilitats d'èxit amb l'anàlisi de malalties multifactorials, tals com la hipertensió, la esquizofrènia, les malalties maniacodepressives o la diabetis tipus II. Una altra conseqüència d'aquesta

tecnologia és la cerca d'un medicament adaptat al perfil genètic de cada pacient.

SNP¹¹: (Single Nucleotide polymorphism) és una variació en la seqüència de DNA que afecta a una sola base (adenina(A), timina (T), citosina(C) o guanina(G)) d'una seqüència del genoma.

Consideracions ètiques:

El desenvolupament científic, en el que respecta al Projecte Genoma Humà, obria les portes a diferents tractaments que podrien ser beneficiosos per l'home; no obstant, no s'ha d'oblidar que això implica manipular directament els mecanismes que transmeten la vida i dirigeixen l'evolució de les espècies, incloent la humana. Aquests fets excedeixen els conceptes d'ètica i humanitat, ja que mai s'havia pensat en la possibilitat de que la vida fos manipulada d'aquesta manera. Així sorgeixen preguntes com: S'ha de prohibir o desaconsellar algun tipus de manipulació genètica? A qui correspon la responsabilitat de discriminar entre el permès i el que no?

Així, la UNESCO es compromet a promoure i desenvolupar la reflexió ètica en els avenços científics dins de les àrees de la biologia i la genètica.

10. ARXIU EUROPEU DEL GENOMA-FENOMA:

Barcelona, nova seu de l'Arxiu Europeu del Genoma-Fenoma (EGA), recurs fonamental per a la investigació biomèdica (*notícia extreta de la Generalitat de Catalunya, Premsa*)

L'Arxiu Europeu del Genoma-Fenoma (EGA, de l'angles *European Genome-Phenome Archive*) emmagatzema dades de 100.000 persones, procedents de 200 centres i grups d'investigació d'arreu del món, i constitueix un recurs fonamental per a l'avanç de la medicina personalitzada.

Fins ara, l'EGA emmagatzema les dades generades per més de 700 estudis científics sobre càncer, diabetis, malalties autoimmunes i cardiovasculars i trastorns neurològics, entre moltes altres malalties.

Aquestes dades, que sumen un total d'1.000.000 de gigabytes, s'emmagatzemaran a les instal·lacions del Barcelona Supercomputing Center (BSC-CNS) i s'analitzaran posteriorment amb el supercomputador MareNostrum.

L'Obra Social "la caixa", la Generalitat de Catalunya i el Ministeri d'Economia i Competitivitat impulsen aquesta iniciativa de cogestió entre l'institut Europeu de Bioinformàtica del Laboratori Europeu de Biologia Molecular (EBI-EMBL) i el Centre de Regulació Genòmica (CRG), que reforça el lideratge en l'anàlisi del genoma per part de grups d'investigació i institucions espanyoles a escala europea.

Barcelona, 14 de Maig de 2014,

Carmen Vela, secretària d'Estat d'Investigació, desenvolupament i innovació del Ministeri d'Economia i competitivitat; Andreu Mas-Colell, conseller d'Economia Coneixement de la Generalitat de Catalunya, i Jaime Lanasa, director general de la Fundació "la Caixa", han presentat aquest matí al Palau Macaya de l'Obra Social "la Caixa", juntament amb Luis Serrano, director del Centre de Regulació Genòmica (CRG), i Arcadi Navarro, cap afiliat de l'equip EGA, professor de la Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats

(ICREA) i director del Departament de Ciències Experimentals i de la Salut de la Universitat Pompeu Fabra (UPF), el llançament públic a Barcelona de l'Arxiu Europeu del Genoma-Fenoma (EGA), un projecte liderat pel CRG.

L'EGA és la forma de garantir que les dades de genomes i fenomes, l'obtenció de les quals és notablement cara, es posen a disposició de la comunitat científica mundial, de manera que les investigacions es puguin accelerar i tinguin lloc nous descobriments. Així mateix, l'EGA és la resposta europea al repte sorgit de l'apressant necessitat de protegir a la privacitat dels donants humans que han participat en estudis genòmics.

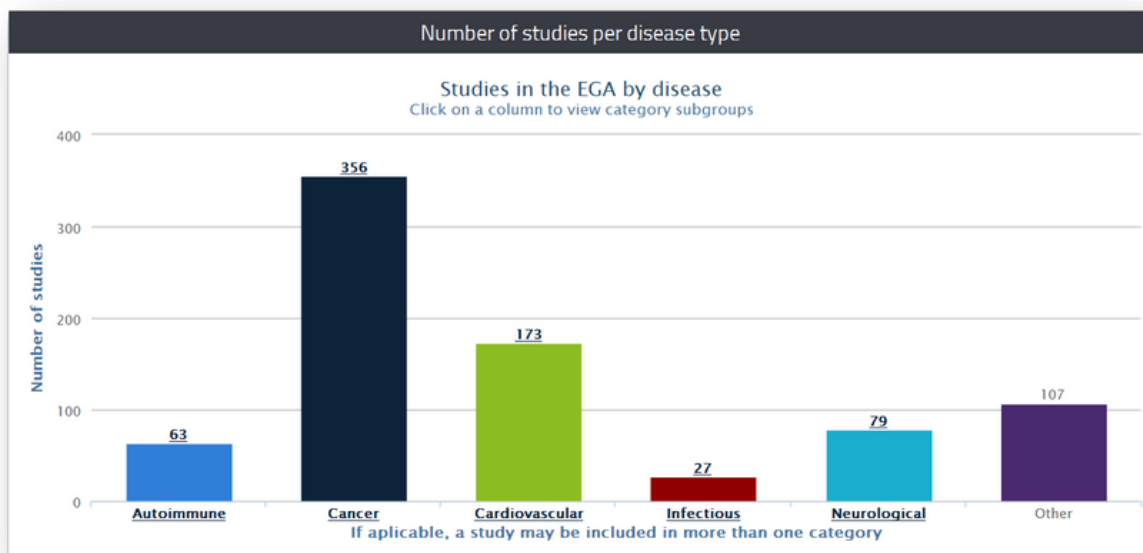
Fa un temps, Janet Thornton, directora de l'Institut Europeu de Bioinformàtica (EBI, de l'anglès European Bioinformatics Institute) i defensora d' ELIXIR; Alfonso Valencia, director de l'Institut Nacional de Bioinformàtica de l'Institut de Salut Carles III (INB-ISCIII), i Roderic Guigó, coordinador del programa d'investigació Bioinformàtica i Genòmica del Centre de Regulació Genòmica (CRG) i professor de la UPF, van començar a explorar de compartir l'EGA i instal·lar una còpia d'aquesta base de dades al CRG. Tots tres van estar d'acord que en l'entorn de les xarxes de col·laboració europees, i en concret dins la infraestructura europea de bioinformàtica ELIXIR, aquesta iniciativa seria millor i més forta. Més endavant, el CRG i el Barcelona Supercomputing Center – Centre Nacional de Supercomputació (BSC-CNS) van acordar que les dades s'emmagatzemarien físicament a les instal·lacions del BSC, centre que també col·laborarà en l'anàlisi de dades amb el superordinador MareNostrum i el treball d'investigadors propis. Actualment, l'equip EGA-CRG està construït per sis persones i liderat per Arcadi Navarro i per un dels directors de l'INB-ISCIII.

La posada en marxa d'aquesta iniciativa és fruit del treball i l'esforç conjunt de nombroses entitats, a més del CRG, entre les quals hi ha l'Obra Social "la Caixa", el Ministeri d'Economia i Competitivitat a través del programa Centres d'Excel·lència Severo Ochoa, la Generalitat de Catalunya, el BSC-CNS, l'INB-ISCIII, el consorci ELIXIR i l'EBI-EMBL. També ha contribuït a l'establiment de l'EGA el seu desenvolupament com a projecte pilot al si de la infraestructura europea ELIXIR.

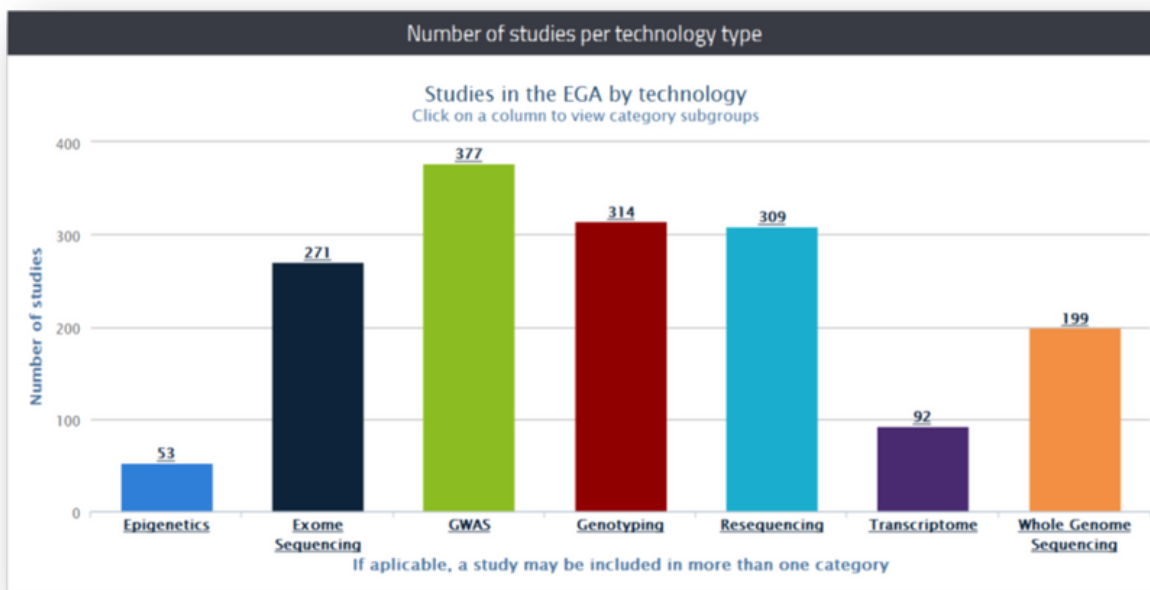
Fins ara, l'EGA ha construït un servei de l'EBI-EMBL. La seva finalitat consisteix a arxivar de manera permanent i segura, i compartir de forma controlada, tota mena de dades genòmiques i fenotípiques de persones identificables, resultants de projectes d'investigació biomèdica, especialment de projectes relacionats amb malalties complexes.

En essència, l'EGA conté dades confidencials relatives a informació sobre variants genòmiques portades per individus que presenten fenotips de malalties i per individus sans. La informació recollida procedeix exclusivament de persones el consentiment de les quals autoritza la publicació de les dades per utilitzar-les en el marc d'investigacions científiques o per a científics registrats.

Les dades emmagatzemades a l'EGA fan referència a més de 100.000 persones que en la major part dels casos pateixen malalties complexes. Es tracta de malalties amb un gran impacte en la salut pública, incloent-hi molts tipus de càncer (de mama, de còlon), malalties autoimmunes (esclerosi múltiple o diabetis), malalties cardiovasculars o psiquiàtriques, i un llarg etcètera de més de 50 patologies diferents.

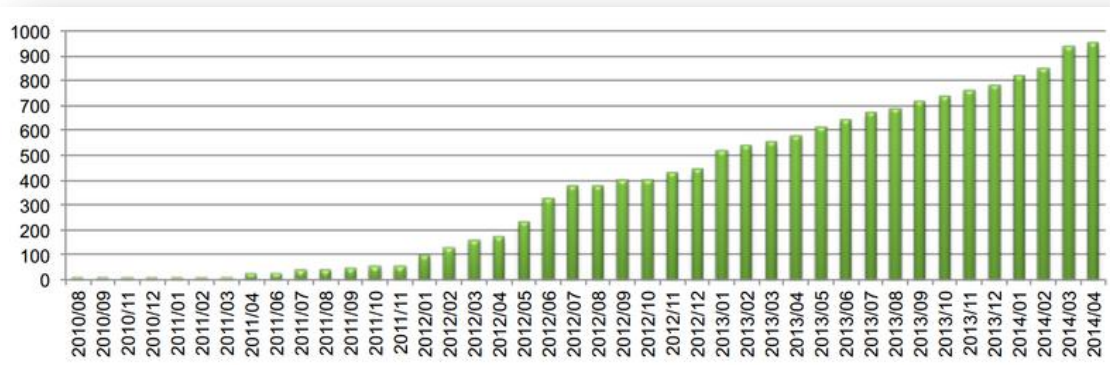


L'EGA arxiva de forma permanent diversos nivells de dades obtingudes mitjançant diferents tecnologies, incloent-hi dades de seqüenciació sense processar (que, per exemple, es podrien reanalitzar en el futur mitjançant altres mètodes o algorisme), a més de les variants genòmiques finals proporcionades pels sol·licitants. L'EGA s'ha dissenyat com a repositori de tota mena d'experiments de seqüenciació, epigenètica i genotipatge, incloent-hi estudis de control de casos, població i familiars.



Totes aquestes dades han estat generades per grups d'investigació i consorcis i institucions no tan sols europeus, sinó d'arreu del món. Es poden esmentar, a tall d'exemple, el Wellcome Trust (Regne Unit), l'International Cancer Genome Consortium (ICGC, amb participació espanyola), la Universitat de Tòquio (Japó), la Universitat de Beijing (Xina), la Universitat de Harvard (Estats Units), la Universitat de Ginebra (Suïssa), la British Columbia Cancer Agency (Canadà) i fins a un total de més de 140 institucions internacionals. Totes aquestes entitats han confiat les seves dades a l'EGA per garantir-ne la seguretat i l'explotació en benefici de la salut humana.

Només durant els primers quatre mesos del 2014, les dades emmagatzemades a l'EGA s'han transferit més de 20.000 vegades a gairebé 5.000 usuaris de grups d'investigació dels cinc continents. D'aquesta manera, l'EGA garanteix que tota la comunitat científica pugui disposar d'aquestes valuoses dades per dur a terme treballs d'investigació que d'una altra forma serien impossibles.



Gràfic que mostra l'augment del nombre de dades emmagatzemades en el EGA (en Terabytes) respecte diferents mesos (des de l'Agost de 2010 fins a l'Abril de 2014)

Actualment, el volum total de les dades, una vegada comprimides, és d'aproximadament 1PB (1. 000.000 GB). Els últims dotze mesos, el catàleg EGA ha experimentat un creixement del 50% en el nombre d'estudis i del 70% en el nombre d'arxius. Es preveu que els pròxims dotze mesos el volum total d'arxius es multipliqui per tres.

Per regular la manera com l'equip de l'EGA gestiona aquesta informació, i com s'emmagatzema i es distribueix de forma segura, hi ha uns protocols estrictes superditats a comitès d'accés de dades (DAC, de l'anglès data Access Committee) independents. En aquests moments, l'EGA conté dades de gairebé 800 estudis.

“L'EGA és, entre altres coses, una infraestructura necessària per garantir que les dades genòmiques finançades amb fons públics s'emmagatzemen de forma adequada, es distribueixin àgilment i s'analitzen exhaustivament. Els seus continguts són fonamentals per maximitzar els beneficis obtinguts de les inversions en genòmica, que ja s'han convertit en un recurs clau i estratègic per possibilitar el desenvolupament de la medicina de sistemes personalitzada. Només a través d l'EGA, Europa podrà mantenir la seva posició de lideratge en la investigació biomèdica” explica Arcadi Navarro. “ Per això, l'objectiu d'EGA-CRG no és ser únicament una còpia de seguretat, sinó proporcionar més recursos (infraestructura i talent) a tot el projecte EGA, per ajudar a millorar i ampliar les seves funcionalitats” indica Navarro

“L’EGA representa un enorme valor afegit al ja excepcional clúster d’investigació en genòmica i salut de Barcelona, que inclou institucions líders com el BCN-CNS, el Centre Nacional d’Anàlisi Genòmica (CNAG), l’Institut de Recerca Biomèdica (IRB), el CRG i moltes més, algunes de les quals són membres de la Global Alliance for Genomics and Health, una iniciativa d’abast mundial amb uns objectius que encaixen perfectament en la missió de l’EGA. D’una manera molt significativa, l’EGA és un magnífic exemple de com una bona mostra de diferents instituts nacionals pot unir esforços per assolir un objectiu comú. La innovació no s’atura per la recessió” comenta Luis Serrano, director del CRG. “L’EGA impulsarà la marca Barcelona coma ciutat de referència en l’anàlisi dels genomes i la seva relació amb malalties. A més, al voltant de l’EGA es desenvoluparan noves eines bioinformàtiques que ens permetran avançar en el camp de la medicina personalitzada” conclou Serrano.

La meua opinió sobre l’Arxiu Europeu del Genoma-Fenoma:

Poques vegades he pogut estar més a favor d’un projecte.

La ciència està avançant a passos de gegant, però sempre acaba estant endarrerida o fins i tot aturada per culpa dels temes econòmics, per la falta de personal en l’equip, per voler avançar-se als resultats per la possible competència...

Hi ha un proverbi africà que diu: “*Si vols arribar ràpid, camina sol; si vols arribar lluny ves acompanyat*” i hi he pensat en veure tota la cooperació que ha aconseguit l’EGA. Un projecte de tals dimensions, on s’ha d’aconseguir arribar molt lluny, no podria fer-se ni ràpid ni sol; però està clar que el treball en equip enriquirà a tothom que ho necessiti.

És l’hora de treballar tots junts per aquells projectes que ens beneficien a tots, i l’EGA és un d’ells. Dóna la possibilitat de disposar dels genomes d’individus malalts i sans a molts grups d’investigació d’arreu del món; no és necessari haver de seqüenciar un genoma per a cada projecte realitzat en diferents grups o centres d’investigació; sinó que és més factible compartir aquesta informació; econòmicament, pel temps i pel bé de la ciència.

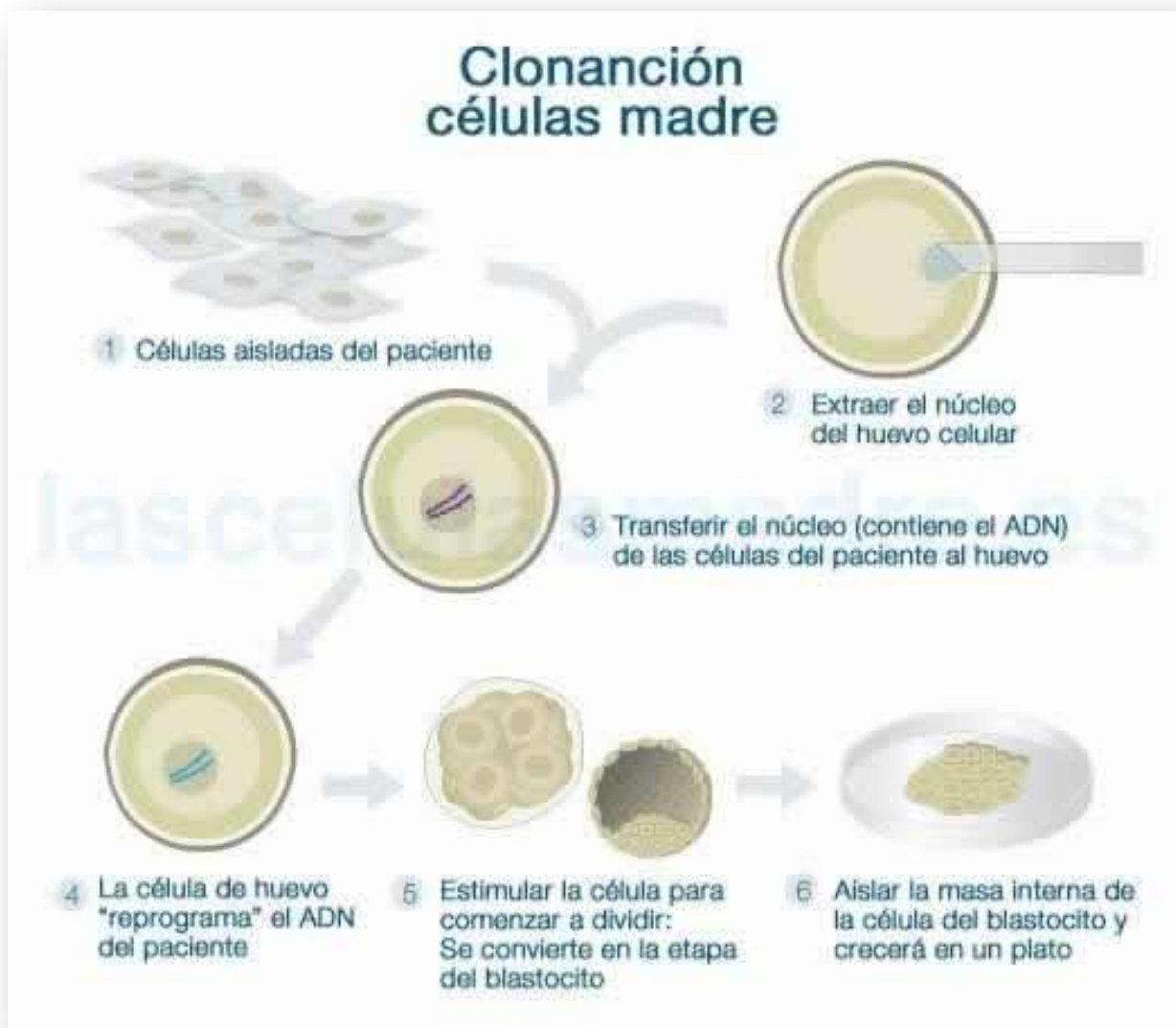
Qui sap si veient el genoma d'algú que pateix la mateixa malaltia que tu, amb uns danys semblants... et serveix per a evitar alguns tractaments que no siguin factibles i així evites temps, s'estalvien els diners d'aquests fàrmacs i et poden tractar directament amb allò que pugui curar-te o millorar la teva qualitat de vida.

Les oportunitats que l'EGA obra són moltes, i n'hi ha que segur que encara no han estat trobades, tot es qüestió de temps. Si se'n sap fer un bon ús de tota la informació que es pot arribar a aconseguir, s'expressirà l'arxiu al màxim i es trobaran moltes altres opcions a estudiar, gràcies a l'arxiu, al treball en equip i a la col·laboració de tots aquells que permeten que hi hagi emmagatzemat, i a disposició d'aquells qui ho necessiten, el seu genoma.

11. CLONACIÓ TERAPÈUTICA:

Com es realitza la clonació terapèutica?

La clonació terapèutica (andropàtrica) és una fase d'un procediment conegut com a transferència de cèl·lules somàtiques. En aquest procediment, un investigador extreu el nucli d'un òvul. El nucli conté el material genètic d'un humà o d'un animal de laboratori. Llavors, els científics prenen una cèl·lula somàtica i n'extreuen el nucli. En les aplicacions pràctiques d'humans, la cèl·lula somàtica s'obté d'un pacient que requereix un trasplantament de cèl·lules mare per a tractar una condició de salut o malaltia.



El nucli que s'extreu de la cèl·lula somàtica del pacient s'insereix llavors en l'òvul, del qual prèviament se n'ha extret el nucli. En un sentit molt bàsic, és un procediment de substitució. L'ou conté ara el material genètic del pacient, o les instruccions. S'estimula per a que es divideixi i poc després s'ha format un grup de cèl·lules conegudes com un blastòcit. Aquest blastòcit té una capa exterior i una altra interior, anomenada massa cel·lular interna, que es rica en cèl·lules mare. Les cèl·lules de la massa cel·lular interna, s'aïllen i se'n revisen els possibles errors genètics, els quals es solucionen si és necessari, després, s'utilitzen per a crear línies de cèl·lules mare embrionàries, que s'infonen en el pacient, on estan perfectament integrades en els teixits, impartint estructura i funció, segons sigui necessari.

Els beneficis de la clonació terapèutica:

Un avantatge important de la clonació terapèutica és que les cèl·lules extretes són pluripotents. Les cèl·lules mare pluripotents poden donar lloc a qualsevol cèl·lula del cos fetal o d'adults. No obstant això, per si soles no poden convertir-se en un animal adult o en un fetus perquè no tenen el potencial de contribuir al teixit extraembrionari, com la placenta. Això significa que les cèl·lules pluripotents podrien tractar malalties de qualsevol òrgan o teixit del cos mitjançant la substitució de cèl·lules danyades. Un altre avantatge d'aquest tipus de teràpia és que el risc de rebuig immunològic s'alleuja perquè el pacient rep el seu propi material genètic.

La clonació terapèutica és també important per a millorar la nostra comprensió sobre les cèl·lules mare i com es desenvolupen. Aquesta comprensió s'espera que pugui conduir a nous tractaments o cures per a algunes malalties comuns que afecten a la gent d'avui en dia. A més, el procediment permetria als científics crear teràpies amb cèl·lules mare perfectament adaptades par a la condició mèdica del pacient.

Problemes amb la clonació terapèutica:

Un problema amb al clonació terapèutica és que es requereixen molts intents per a crear un òvul viable. L'estabilitat de la infusió de l'òvul amb el nucli somàtic és pobre i pot requerir centenars d'intents abans d'aconseguir l'èxit.

La clonació terapèutica té com a resultat la destrucció d'un embrió després de que les cèl·lules mare s'extreguin i aquesta destrucció ha suscitat controvèrsia sobre la moralitat del procediment. Alguns sostenen que els avantatges superen a les contres en quant al tractament de la malaltia, mentre que altres han comparat la destrucció amb un avortament. Altres afirmen que això no canvia el fet de que l'embrió podria ser un ser humà i que, per tant, la destrucció de l'embrió no és diferent a la destrucció d'una vida humana.

Seria possible clonar éssers humans?

Fins la data, cap ésser humà ha estat clonat amb èxit, però la possibilitat de que això ocorri és terrible no sols per al públic en general i la política, sinó també per a la major part del camp de la ciència ètica. La majoria dels científics s'oposen fermament a la clonació reproductiva i en el seu lloc, recolzen la clonació terapèutica per al tractament de la malaltia. Amb les polítiques en vigor i la acurada vigilància per a garantir que la clonació terapèutica s'utilitzi de manera responsable, tots podem beneficiar-nos del potencial d'aquest procediment per a tractar moltes malalties.

12. ARTICLES PUBLICATS:

“Científicos japoneses crean la primera estirpe de monos transgénicos”

El 27/05/2009, el diari *El País*, publicava “Científicos japoneses crean la primera estirpe de monos transgénicos”, aquesta notícia feia referència a un estudi que es va realitzar a l' *institut central d'animals experimentals* del Japó. Va tenir cinc anys de durada i consistia en la creació d'aquests primats transgènics, als quals se'ls va introduir el gen de la fluorescència verda (GFP) i aquests, sotmesos a llum ultraviolada, tenien algunes parts del seu cos fluorescentes; de la mateixa manera que les seves cries.



Es van escollir uns titís pigmeus per a l'experiment, van inseminar 80 embrions amb el gen de la fluorescència a cinquanta titís, i van aconseguir cinc cries dels titís completament sanes i amb el gen dins del seu genoma. L'experiment va concloure quan les cries dels titís que s'havien modificat genèticament van

arribar a la maduresa sexual i es va veure que també tenien aquestes parts fluorescentes i per tant, es demostrava la introducció d'aquest en l'ADN dels titís pigmeus.

La revista *Nature* publicava que, “**la investigació obra una nova era en l'utilització dels primats com a models de malalties humanes.**”

En experiments anteriors amb aquest, no s'havia aconseguit la creació d'un **primat plenament transgènic** i, tot i que el simulador viu més utilitzat és el ratolí, en l'article es destaca la importància de l'estudi dels primats, degut a la seva proximitat biològica amb els humans.

Erika Sasaki, investigadora que va formar part del projecte assegura que aquest rebrà crítiques des de la bioètica, pel fet de fer néixer a primats amb una malaltia; però ho defensa dient que, “s'ha de pensar en el cost-benefici. Si

podem fer aquestes investigacions en rosegadors o in vitro, ho farem, però per a moltes malalties com el Parkinson no existeix un bon model animal”

- **La meva opinió sobre “ Científicos japoneses crean la primera estirpe de monos transgènics”:**

Veient estudis així, és inevitable acceptar la magnitud de la ciència en els nostres dies; tant en el dia a dia com en un futur.

Un experiment realitzat en bacteris, insectes, ratolins... qualsevol animal considerat inferior als humans, ens pot ocultar la complexitat d'aquest i ens pot semblar que és impossible aconseguir-ho en humans i després, aconseguir un primat plenament transgènic ens obra els ulls i, ens obliga a acceptar el poder que tenim en les nostres mans i així sorgeixen tots els conflictes, s'ha de saber controlar tot aquest poder; és a dir, utilitzar animals tant sols quan sigui inevitable i mantenint aquests amb les millors condicions de vida possible.

És per això, que estic plenament d'acord amb Erika Sasaki, les investigacions que puguin fer-se amb animals inferiors o in vitro és faran així, però en algunes no hi ha cap altra opció; i crec que és un pas enorme, que ara mateix no sembla que tingui l'importància que en realitat té; tant sols veiem uns titís prímies fluorescents; però el que hem de veure-hi és la possibilitat d'estudiar malalties tant complexes i delicades com el parkinson i això és molt important per a la cura, ja que són els animals amb els que tenim més semblança i per tant, més possibilitat d'èxit en humans si s'aconsegueix en els propis titís.

“Un mono con seis progenitores”

El 5/01/2012, el diari *El País* publicava “**un mono con seis progenitores**”, article que explicava el procés amb el qual s'havia obtingut uns bessons macacos rhesus, completament sans, els quals tenien sis progenitors.

Aquest experiment ja s'havia realitzat anteriorment amb rosegadors però era la primera vegada que tenia èxit amb primats, i això en feia augmentar les possibilitats de viabilitat en humans.

El projecte realitzat a la *Universitat de Ciència i salut d'Oregón* consistia en ajuntar embrions en un estat molt inicial, de tres parelles de macacos; les cèl·lules dels quals no van fusionar-se, sinó que van romandre juntes treballant per crear òrgans.

Shoukhrat Mitalipov, principal autor del treball descriure que **“les possibilitats per a la ciència són enormes”**

Els propis investigadors, asseguren que a simple vista sembla un projecte poc pràctic, ja que no s'aconsegueix el millor fetge, el cor més resistent o el cervell més desenvolupat... sinó que s'aconsegueix una barreja descontrolada de tot això. Els investigadors, una vegada creat el embrió-fusió i començat el procés de desenvolupament d'aquest, no van poder decidir on anaven cap dels gens dels progenitors, fet que és clau en les teràpies gèniques.

Mitalipov, creu que aquest projecte permet saber més sobre la diferenciació cel·lular en les primeres fases del desenvolupament. I extreu com a primera conclusió que, aquesta diferenciació és tan específica de cada individu que quan han passat alguns dies del desenvolupament del òvul fecundat, **no tenim suficient coneixement com per a vèncer les barreres que ens sorgeixen alhora d'escollir el destí de cada cèl·lula.**

Es creu que amb aquest projecte **s'aconseguirà trobar la diferència entre les cèl·lules mare cultivades amb les que ara s'estudia i les cèl·lules mare extretes d'embrions de dues setmanes de vida** (tècnica molt criticada i inclús prohibida per George Bush, considerada avortament), ja que el mateix experiment provat amb les cèl·lules mare cultivades no va funcionar de la mateixa manera



Roku i Hex, els macacos amb sis pares

- **La meva opinió sobre “Un mono con seis progenitores”**

En llegir aquest projecte, he après una altra vegada a que no pots extreure conclusions de res fins haver arribat al final. I és que, al principi vaig pensar que podia ser un experiment absurd, poc pràctic... fins veure que en els dos macacos, hi ha un objectiu molt clar, i aquest era comprovar la diferenciació de les cèl·lules mare, i apart, poder demostrar també que no són ni actuen igual aquelles cèl·lules mare extretes que les cultivades sintèticament.

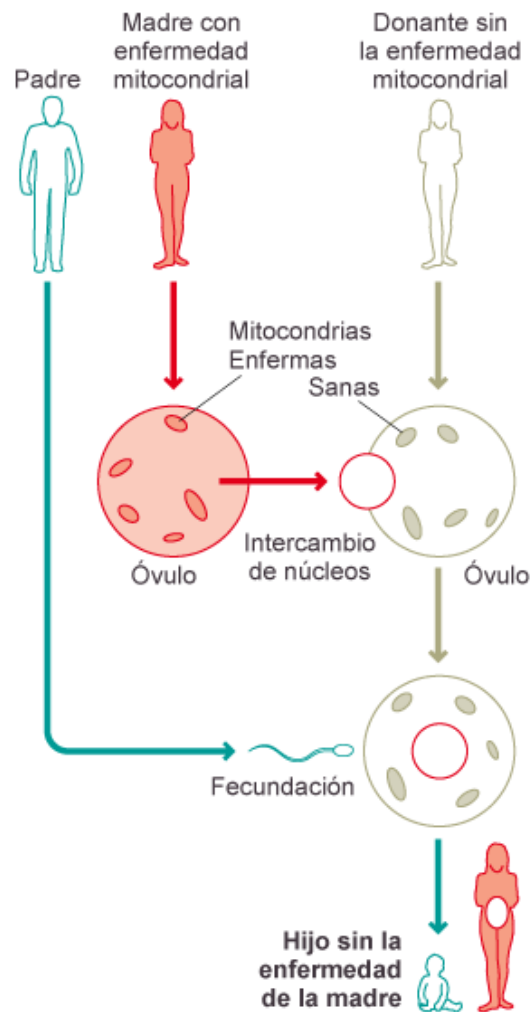
És un experiment que en si, tampoc dóna molta informació nova, però ens fa **obrir els ulls a tot allò que ens falta per conèixer**, i com no podem quedar-nos estancats en el que creiem saber.

“Luz verde a la creación de hijos con tres ‘padres’ genéticos”

Una notícia que significa un pas immens cap al naixement de nadons completament sans.

El 28/06/2013, el diari El País publicava **“El Gobierno británico da luz verde a la creación de hijos de tres ‘padres’ genéticos”**, una tècnica de reproducció assistida que evita la transmissió de malalties mitocondrials, unes greus i poc freqüents patologies que es transmeten per la via materna, i per tant, els nadons nascuts gràcies a aquest procés tenen ADN aportat per tres progenitors, ja que s'utilitza l'òvul d'una donant sana.

L'origen d'aquestes malalties està en els mitocondris, uns orgànuls que proporcionen energia a la cèl·lula però que també contenen el seu propi DNA (no arriba al 0,2% de la càrrega genètica total), el problema sorgeix quan l'òvul té mitocondris amb alteracions genètiques patògenes; per tant, després de la fecundació els mitocondris del fetus tindran els mateixos errors i aquests són principalment problemes en tots aquells orgànuls que necessiten energia procedent dels mitocondris com el cervell, el cor o els músculs...



Aquest procés que ha estat provat al complet en macacos, consisteix en **recórrer a l'òvul sa d'una donant per aprofitar-ne els mitocondris** que aquest conté, ja que és impossible eliminar una a una els mitocondris lesionats d'un òvul i substituir-los.

Així que, es buida el nucli de l'òvul sa i es substitueix pel nucli de l'òvul amb els mitocondris alterats. D'aquesta manera l'òvul resultant conté tots els cromosomes de la mare i els mitocondris sans d'una donant.

El procés conclou en una fecundació amb els espermatozoides del pare, del qual **en naixerà un nadó sa, amb el 0,2% del seu material genètic procedent d'una donant.**

- **La meua opinió sobre “luz verde a la creación de hijos con tres “padres” genéticos”**

L'opinió davant d'aquest article és completament positiva, davant les possibilitats de qualsevol dona a tenir un fill sense condicionar-lo a malalties inevitables. Crec que són descobriments molt importants davant una societat tan avançada com la nostra, on podem evitar la condició de malaltia a molts nens.

Tot i això, davant la llibertat de tothom segur que molta gent creu, com el director de l'organització *Human Genetics Alert*, David King, que **aquestes tècniques són innecessàries i alhora insegures. Considerant aquest avenç un desastre que creua la línia, i que ens pot dur a un mercat de nadons dissenyats.**

També hi ha una opinió completament contrària a la de David King; com la de A Li Hafner, presidenta de l'associació *Asociación de Enfermos de Patologías Mitocondriales*, i també mare. Un dels seus fills va morir per encefalomiopatia mitocondrial i davant aquest projecte, es mostra continguda dient que; **és una bona notícia, però passarà temps fins que el procés arribi a Espanya, i s'ha de comprovar encara la seva eficàcia total.**

“Mosquitos transgènics para combatir la epidemia de dengue”

El 19/07/2012, el diari *El País* publicava **“Brasil allibera mosquits transgènics per a combatre l'epidèmia de dengue”**,

CREACIÓN DE MOSQUITOS TRANSGÉNICOS CONTRA EL DENGUE

▶ CICLO NATURAL VITAL DEL MOSQUITO



▶ TRATAMIENTO GENÉTICO

A partir de los huevos de mosquitos, se realiza un tratamiento para erradicar la especie.



¿QUÉ ES EL DENGUE?

SÍNTOMAS:

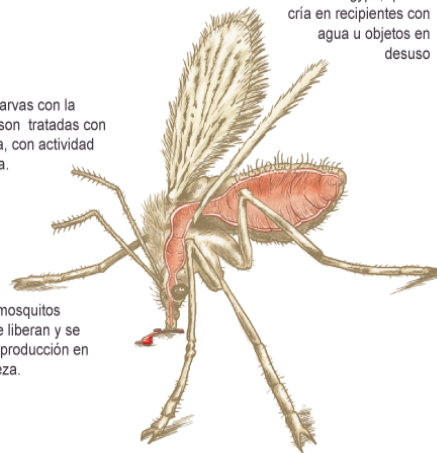
- Fiebre
- Dolor de cabeza
- Dolor articular
- Erupciones cutáneas
- En casos graves produce hemorragias que pueden ser mortales

No hay vacuna ni tratamiento. La única forma de luchar contra la enfermedad es evitar la propagación del mosquito

CASOS AL AÑO

- 50-100 millones de casos
- 500.000 hospitalizaciones
- 12.500 muertos

El mosquito portador del dengue es el *Aedes aegypti*, que se cría en recipientes con agua u objetos en desuso



on s'explicava que la biofàbrica de la Organització Social Moscamed, valorant les dues necessitats bàsiques de qualsevol animal; alimentació i reproducció i traslladant-ho al mosquit *Aedes aegypti*, les femelles dels quals s'alimenten quan piquen als humans i n'obtenen la seva sang alhora que els hi inclouen el virus del dengue, i es basen en la segona necessitat bàsica per la cura de l'enfermetat.

La ciutat de Juazeiro es converteix en el laboratori del projecte, allí s'alliberaran aquests **mosquits mascles modificats genèticament per a tenir cries no viables**, per tant complauran la reproducció de la femella però no se n'obtindran cries viables, així que reduiran la població d'aquests insectes.

Segons els científics de Moscamed, es creu que s'ha aconseguit reduir la població de mosquits en un 85% i asseguren que “els mosquits transgènics es comporten igual que aquells que no han estat modificats genèticament. Viuen uns vint dies i no surten d'un radi de vol màxim de 80-100 metres”.

Ara, sols falta comprovar la relació entre la disminució de la població de *Aedes* i la caiguda dels casos de dengue; per poder comprovar-ho es realitzarà un segon experiment afirma Carvalho, gerent del projecte.

- **La meva opinió sobre “Mosquitos transgènics apra combatir la epidemis de dengue”**

Cada vegada que llegeixo un projecte d'enginyeria genètica que s'està duent o que s'ha dut a terme, m'adono de la facilitat de creuar la línia. És a dir, **com de complicat és valorar si el que estem fent és realment ètic**.



Per considerar per exemple que aquest experiment sí que és ètic i per tant donar un vot per realitzar-lo ens hem de posicionar a nosaltres, els humans en l'esglaó més alt de la jerarquia i així considerar-nos superiors als mosquits i per tant, donar-nos a nosaltres mateixos el dret de reduir o fins i tot extingir

una població d'aquests, abans de que ells puguin reduir o extingir una població d'humans com semblava ser que podia passar al Brasil.

Vist així, moltes vegades tothom té una visió més egoista, i pensa que és correcte perquè estem salvant moltes vides.

La veritat és que en el fons, tampoc ho considero incorrecte, però crec que potser estaria millor invertir el mateix pressupost, el mateix personal expert en enginyeria genètica i tot el que és necessari per dur a terme un projecte d'aquestes dimensions... en crear una vacuna davant l'epidèmia de dengue, és a dir; no eliminem al mosquit *Aedes aegypti* però ensens hi fem resistents.

“Fabricada una medusa artificial con células de músculo de rata”

El 23/07/2012, el diari *El País* publicava **“Fabricada una medusa artificial con células de músculo de rata”**

Es tracta d'un projecte realitzat pel departament de bioenginyeria de la Universitat de Harvard i publicat a Nature Biotechnology.

El resultat d'aquest projecte, és a dir, la medusa; està formada únicament per ADN de rata cultivat damunt d'una estrella de sílica.- explica Kit Parker, el creador. I aquest “medusoide” es contrau quan està en un medi que transmet impulsos elèctrics, de la mateixa manera que ho fan les meduses en la natura.

En el projecte hi ha col·laborat John Dabiri, bioenginyer del California Institute of Technology, tant John com Kit; asseguren que no es tant sols un joc, sinó que es un avenç molt útil ja que la contracció muscular és clau per a la vida, és així com es mou el cor. I per tant, proposen la creació d'un medusoide amb cèl·lules cardíques humanes podent així crear una mena de cor artificial per aquelles persones que necessitin un transplantament. Tot són suposicions i falten moltes hores de treball per aconseguir-ho, ja que aquest “medusoide” tan sols es contrau en un medi que transmet impulsos elèctrics.



- La meva opinió sobre “Fabricada una medusa ratifical con células de músculo de rata”

Aquest projecte és en realitat, un petit aperitiu d'un altre de magnituds immenses com és la creació d'un cor artificial.

És el primer pas, és a dir, aconseguir que unes cèl·lules (en aquest cas, musculars) es contreguin en un medi que emet impulsos elèctrics; després pot venir el mateix projecte però amb cèl·lules cardíques humanes, i qui sap si s'arriba al cor artificial. Un projecte tan difícil, acaba sent la suma de molts de més senzills, alguns tan sols intents sense èxit... així que aquest “medusóide” acaba sent molt interessant i pot obrir moltes portes a qualsevol que intenti arribar a una mena de cor que bategui sol.

13. IRB DE LLEIDA; SERVEI DE TRANSGÈNICS

L'IRB de Lleida és l' *Institut de Recerca Biomèdica* de la ciutat de Lleida des del seu naixement l'any 2004. Institució que representa a tots els grups de recerca biomèdica de la regió de Lleida, tant de la UdL com del sistema sanitari.

En l'IRB de Lleida hi participen la *Universitat de Lleida* i l'*Institut Català de la Salut*, amb grups de recerca de la *Facultat de Medicina*, *Hospital Universitari Arnau de Vilanova*, *Hospital Santa Maria* i el *Departament de Salut* de la Generalitat de Catalunya. I aquest en conjunt està compromès en avançar en la recerca biomèdica com a mitjà per a millorar la salut de la població i facilitar una activitat assistencial òptima en situacions de malaltia.

S'hi ofereixen diferents serveis científicotècnics, un d'aquests el **servei de transgènics** format únicament per Maite Rodriguez-Manzanaque, biòloga llicenciada a la *Universitat de Barcelona*, i amb un doctorat sobre "la caracterització i anàlisi funcional d'una família de glutaredoxines monotioliques en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*" dirigit per Enrique Herrero.

A part, Maite ha estat estudiant d'Erasmus a la *Universite Libre de Bruxelles* (Brussels, Belgium) realitzant un projecte titulat "An approach in the study of earthworms"; ha obtingut una Beca predoctoral a la *Universitat de Lleida* i també una Beca Marie Curie, amb la qual va realitzar un projecte al *Departament de Biologia Cel·lular i Molecular* (Laboratori Lundberg) a la *Universitat de Gothenburg* (Suècia) titulat "Two hybrid analysis and cellular location of monothiolic glutaredoxins" i també ha estat tècnic especialitzat en el *Servei de transgènics Institut Max-Planck de Bioquímica i Neurobiologia*, Martinsried (Alemanya); i avui dia, **és tècnic superior en el Servei de Transgènics a l' Institut de Recerca Biomèdica de Lleida.**

Durant aquests anys en diferents centres, Maite ha format part de grups de recerca on ha aconseguit publicacions rellevants com:

- "Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*."

- “Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes.”
- “Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein.”
- “Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6.”
- “Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly.”
- “A novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in restricting epithelial-to-mesenchymal transition to the primitive streak.”

Tots publicats en revistes científiques com *Molecular and Cellular Biology* (MCB).

Després de descobrir com avança la ciència per Europa; al febrer de 2010, Maite Rodriguez-Manzaneque, entra al IRB de Lleida com a tècnic superior del servei de transgènics. Aquí, hi treballa sola però no realitza projectes ni personals ni en grup; sinó que facilita els avenços en els transgènics a altres projectes que s'estiguin realitzant al IRB; però completament externs a ella.

Concretament, en el servei de transgènics s'hi realitzen 3 tècniques; no totes elles de enginyeria genètica.

I. Re derivació

Quan s'ha de fer un projecte i es necessiten animals per a completar-lo, aquests arriben a l'estabulari amb un informe sanitari (siguin els animals recent nascuts o vinguin d'un altre centre d'investigació); on se'n identifiquen les infeccions, possibles virus, i la salut general de l'animal (sovint ratolins); però per a comprovar aquest informe, els animals són examinats per un veterinari especialista.

Si es detecta per exemple una femella que no està completament sana, s'hi efectua una re derivació; és a dir, aquesta es enviada a un estabulari especial per a animals infectats, anomenat “quarantena” i allà és netejada, re derivada.

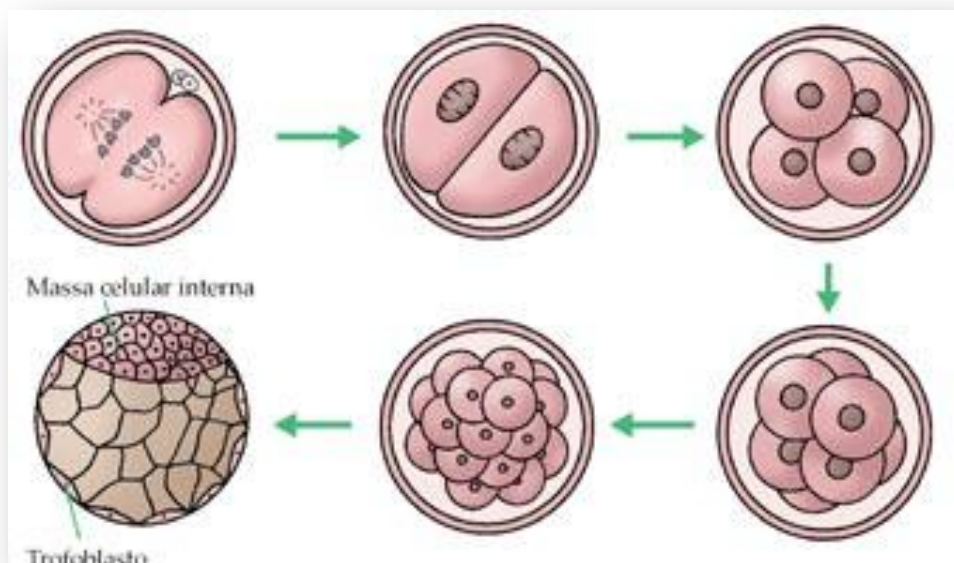
La feina del tècnic que realitzi la re derivació consisteix en extreure els embrions sans de les femelles contaminades, i trasplantar aquests en una femella sana; així poder obtenir-ne cries sanes.

II. Congelació d'embrions:

Una altra tècnica que realitza al servei de transgènics, però no relacionada amb l'enginyeria genètica, és la congelació d'embrions. Que s'ha convertit en un procés d'estalvi ja que és molt car mantenir les línies de ratolins, així que surt més econòmic congelar els embrions d'aquestes línies (400-600 per línia) en nitrogen líquid. Així es minimitza l'espai i el cost econòmic.

III. Infecció de Blastocist:

L'única tècnica realitzada on és necessita coneixements d'enginyeria genètica, és aquesta i consisteix en introduir cèl·lules mare modificades genèticament a un blastòcit.



En els ratolins; quan es produeix una penetració, és òpticament visible, ja que es produeix un líquid gelatinós blanc en l'entrada de la vagina de la femella, anomenat *plug*. Si el ratolí femella ha estat fecundat, des de que es veu el *plug*,

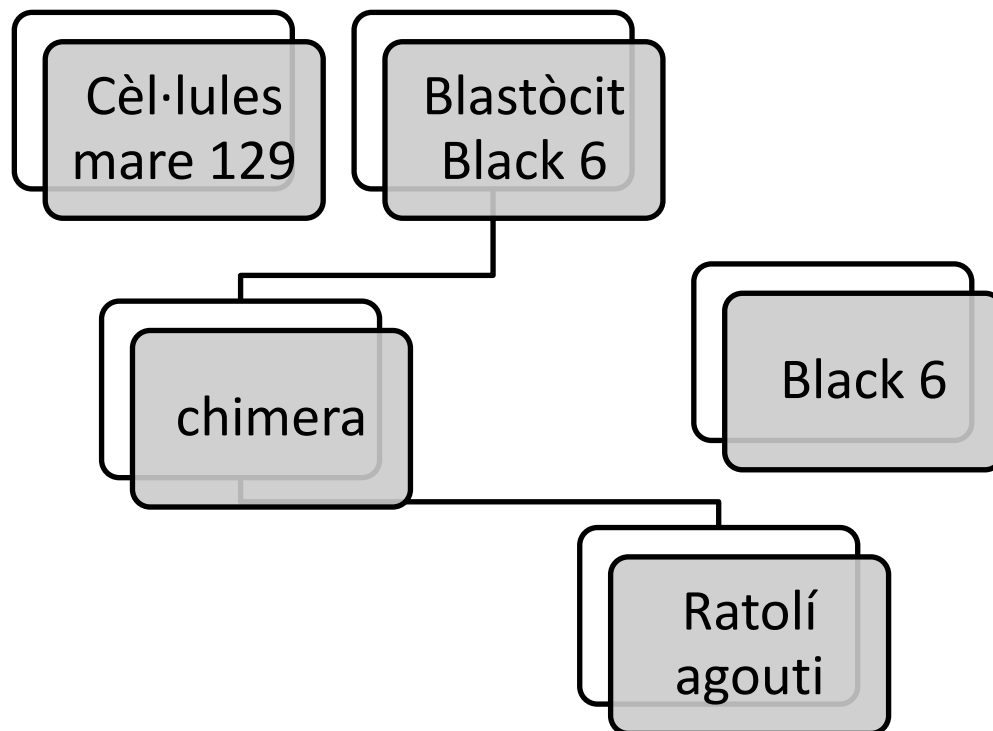
es comptabilitza; 0.5 dies després, l'òvul fecundat és un oocit; 1.5 dies després conté dues cèl·lules; fins arribar a ser un blastòcit 3.5 dies després del *plug*.



En la cavitat que es forma en el blastòcit s'hi introdueixen cèl·lules mare, anteriorment modificades; per obtenir així ratolins transgènics.



Una de les pràctiques més comuns al IRB de Lleida, és la introducció de cèl·lules mare modificades del ratolí 129, *agoutis* (caracteritzats per tenir el pèl marró) en un blastòcit del ratolí *Black6* caracteritzats per tenir el pèl fosc, gairebé negre. La *chimera* que en surti, és creuarà amb un altre *Black6*, si en la descendència apareix algun ratolí *agouti*, la infecció s'haurà realitzat amb èxit.



En acabar l'explicació on vaig poder entendre què s'hi feia exactament al IRB de Lleida; vaig poder visitar la SPF (specific pathogen free), establari on hi havia les línies mare de ratolins, o ratolins immunodeficients o aquells que han d'estar completament sans i desinfectats per a ser estudiats; així que hi ha una extrema higiene.

Aquí es mostra un ratolí *Chimera*, i la campana d'extracció on es treballa amb aquests animals per a que no es contaminin.





Després de posar-me una bata, guants, mascareta i peücs; vaig entrar en uns vestuaris on vaig haver-me de posar una mena de pijama d'hospital, una altra mascareta, guants, gorra que em cobrés els cabells, i uns altres peücs; i finalment, abans d'una dutxa d'aire vaig haver de posar-me un mono, un burca, i unes sabates.

Després de recórrer uns passadissos, vaig arribar on eren els ratolins. Vam escollir als més aptes i els vam dur a una altra sala per a operar-los. Una petita classe pràctica on vaig poder veure com es realitzava primer una vasectomia i després una simulació d'una introducció d'embrions en una femella; en realitat vam introduir-li un líquid semblant al que s'utilitza en el gel d'agarosa; per a poder visualitzar-ho millor.

Per finalitzar la visita a la Maite, vaig realitzar-li una entrevista:

Has pogut treballar en molts laboratoris d'Europa, creus que les maneres d'investigar canvien molt d'un lloc a un altre?

Si. A cada lloc s'imposa una manera de treballar que depèn de diversos factors: qüestions culturals (horaris), econòmiques (recursos disponibles), organització. Quan comences a treballar en un institut d'investigació i, sobretot, si està en un altre país, t'has d'adaptar a les maneres de fer. No costa gaire.

T'agradaria poder emprendre una investigació personal? Cap on s'encaminaria?

Si, suposo que tots els que treballem en aquest sector ens agradaria tenir el PROJECTE de la nostra vida. M'agradaria poder saber el que hi ha darrera de algunes malalties mentals, com l'esquizofrènia

D'entre tots els projectes què has realitzat, amb quin et sents més orgullosa i perquè ?

Del què estic més orgullosa és d'haver pogut aconseguir aquí, a Lleida, les meves primeres quimeres, resultat de la injecció de blastocists. He començat de zero al IRB i, per fi, estic obtenint resultats. Sé que en altres laboratoris i on estava abans, a Munich, això era feina rutinària, però aquí ha estat difícil.

Creus que de tots els petits projectes que es realitzen avui en dia, es podrà arribar a algun descobriment de grans magnituds ?

Crec que tots estem aportant el nostre gra de sorra. El que hauríem de fer és compartir més els resultats obtinguts, tant els positius com els negatius, ja que de tot s'aprèn i s'evitaria la repetició d'experiments.

Què en penses de totes les organitzacions que estan en contra de la utilització d'animals al laboratori ?

Actualment tota la investigació amb animals està molt regulada, hi ha comitès d'ètica que asseguren el benestar dels animals en tot el temps que dura la investigació. Un projecte amb animals ha de tenir l'aprovació d'aquest comitè per poder dur a terme la investigació. A més, tant els investigadors com els tècnics encarregats del manteniment dels animals han de disposar d'una acreditació que els permeti treballar amb animals. Com tu mateixa has vist a l'estabulari de la UdL, treballem de la millor manera per assegurar el benestar dels animals. Penso que el model de ratolí és un model animal molt útil per investigar malalties humanes i alhora relativament econòmic.

IRB de Lleida compta del finançament de moltes entitats, què diries a aquells que poden invertir en ciència perquè no deixin mai de fer-ho?

Penso que invertir en desenvolupament i educació és la millor inversió d'un país.

Per acabar, veus l'enginyeria genètica com al futur de la investigació científica?

La enginyeria genètica està resultant molt útil per investigar la funció genètica humana. Saber quina funció exacta fa cada gen i en quin moment del desenvolupament ens donarà lloc a resoldre moltes malalties com ja ho ha fet.

14. PART PRÀCTICA

Programa “Bojos per la bioquímica”

Tota una gran experiència va començar un dia en una classe de biologia, amb un paper d'inscripció a un projecte organitzat per la “Fundació la Pedrera”.

Uns cursos, que es realitzarien els caps de setmana als quals, sense cap mena d'esperança vaig inscriure'm. Els que més em van atraure van bioquímica i biomedicina, perquè donaven més peu a la investigació i volia saber què s'hi feia exactament.

Durant l'octubre, vaig rebre l'ajuda de la meva tutora i professora de química, i de la meva tutora del treball de recerca i també professora de biologia; per a completar la inscripció al projecte, escrivint una carta de motivació, i una carta de recomanació per part de cadascuna d'elles.

La següent notícia que vaig rebre; tal com m'esperava, era que després de 400 sol·licituds per al curs de biomedicina “*Crazy about biomedicine*” organitzat per l'IRB de Barcelona, no havia passat a la fase d'entrevistes. Però pocs dies després, en Josep M^a Fernandez, director del projecte “*Bojos per la bioquímica*” realitzat a la Universitat de Barcelona m'enviava un correu per a que confirmés la meva assistència a la segona fase de selecció.

Òbviament, vaig confirmar-ho; sense pensar massa on m'estava posant. Aquell correu que vaig enviar com a resposta, va obrir-me les portes a la investigació de veritat. Tothom que s'apuntava al curs sabia que allò implicaria un esforç extra per als caps de setmana, que els caldria una dosi més d'energia... però vivint a Tremp, en vaig necessitar un parell.

Així que el dimecres de la setmana de la ciència, saltant-me algun examen... vaig anar a Barcelona a demostrar que volia fer ciència de debò.

A la sala d'espera per les entrevistes, tots ben nerviosos ens preparàvem alguna frase més tècnica, algun projecte important per sorprendre al jurat, alguns explicaven experiments fets a classe, altres experiències a centres importants d'Alemanya i jo, no podia ni pensar en una cèl·lula. Sols pensava el que em suposaria entrar en aquell curs, el no poder anar a esquiar, el no poder

anar als monòlegs dels divendres a la nit... I una altra vegada, sense esperances vaig entrar a la sala de les entrevistes; on dues noies i un noi em van començar a fer preguntes en català, castellà i anglès; sobre què havia estudiat, quins experiments havia fet, què volia estudiar, què em sorprenia de la ciència...

Vaig sortir-ne contenta, començant a valorar tot allò positiu que podria guanyar en aquell curs, havent conegut als que podrien ser els meus futurs companys de caps de setmana. I unes setmanes després vaig saber que estava dins del curs, un dia per anar a la presentació i tot un any amb classes diferents a les que rebria a tremp i en laboratoris importants.

El curs, va començar amb 4 classes teòriques dividides en dos dies; i després en les sessions pràctiques de les explicacions anteriors. En acabar, vam tornar a fer 4 teòriques i 4 pràctiques.

- Proteïnes transportadores dels precursors de l'ADN.
- Aplicacions biotecnològiques dels virus bacterians.
- Plantes transgèniques.
- Microscòpia multidimensional.
- Bioinformàtica i les seves aplicacions.
- Fermentacions (bones i dolentes) i llevats.
- Bioquímica a través d'Internet, aquesta hamburguesa porta carn de cavall?
- Ús d'animals experimentals en el laboratori d'investigació.
- Entendre i preparar un article científic.
- Presentació pública de l'article.

En totes les sessions, vaig poder veure com es treballava amb animals, com s'evitava treballar amb aquests i es feia en programes informàtics, com utilitzar diferents tipus de microscopis i principalment, vaig aprendre com funciona un laboratori científic.

GMO plants, a friend or a foe?

D'entre totes les pràctiques que vam realitzar, per grups de 3 vam haver d'escollir-ne una; de la qual vam haver de fer un treball i vam, també, presentar-la en públic l'últim dia del curs.

El meu grup, format per la Judith Sabaté i el Josep M^a Ferrer, vam escollir representar la pràctica titulada “*GMO plants, a friend or a foe?*”.

Sessió teòrica

En la sessió teòrica vam valorar en general els organismes modificats genèticament, com es produeixen i per a que s'utilitzen. I després, vam realitzar un debat sobre l'ètica d'aquests.

Sessió pràctica

Problema a investigar: Han estat modificats genèticament aquests nachos?

La sessió pràctica consistia en saber si uns “nachos” havien estat modificats genèticament o no.

Hipòtesi:

Potser els “nachos” a estudiar han estat modificats genèticament prèviament.

Introducció:

En aquesta pràctica, la intenció era poder saber si uns “nachos” d'un supermercat Pakistaní eren transgènics o no.

Aquests, no marcats com a producte transgènic, però vam voler estudiar-los sabent que hi ha un 1% d'alteració genètica del producte que no cal especificar en l'embolcall, i també sabent que no sempre es compleix l'etiquetatge correcte de molts productes que consumim diàriament.

Material:

- Nachos
- Civada com a control
- Un morter
- Aigua destil·lada
- InstaGene Matrix
- Agarosa
- Encebadors per un gen específic de totes les plantes i un altre només dels transgènics.

Variables independents:

Percentatge d'aliment utilitzat i la quantitat respectiva d'aigua destil·lada

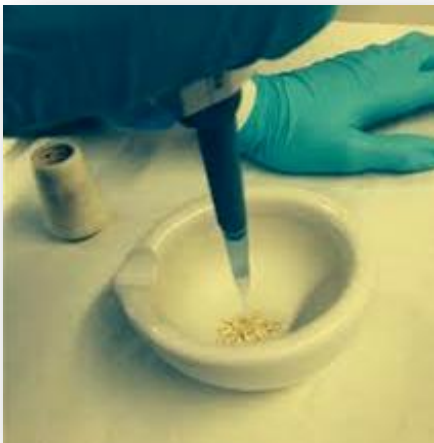
Seguiment de processos; extracció de DNA, tècnica de PCR i tècnica d'electroforesi.

Variables dependents:

Resultats en l'electroforesi que diferenciarien aquells productes transgènics d'aquells que no ho són.

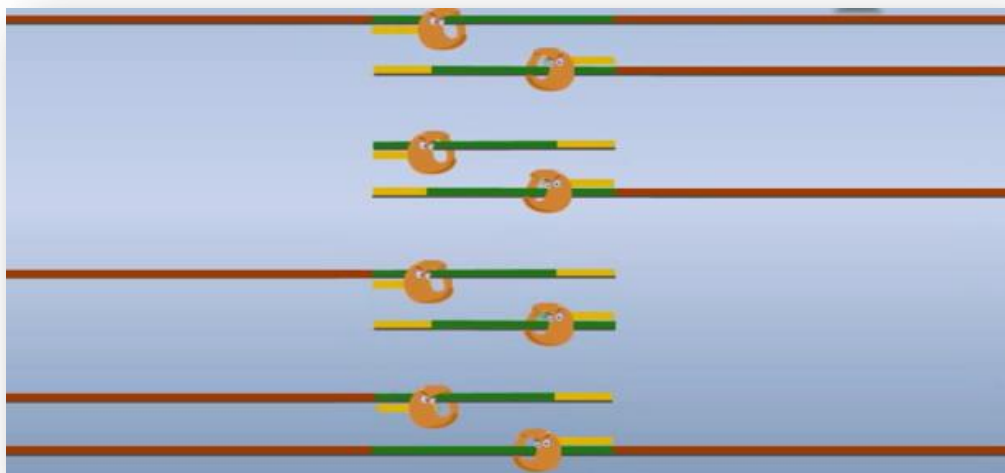
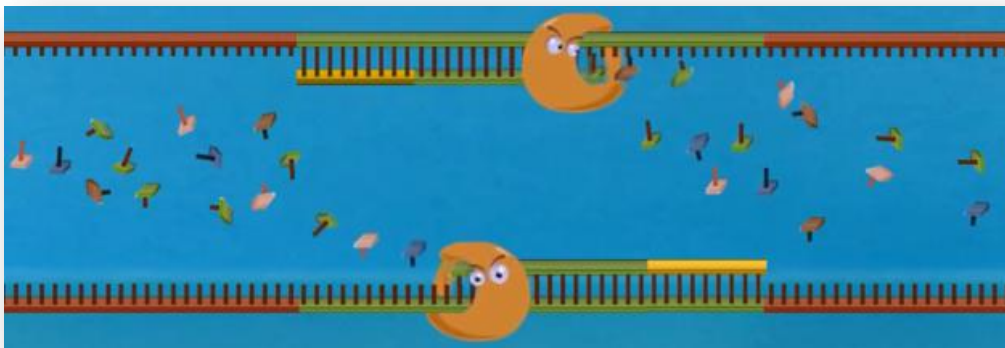
Pràctica:

- Extracció de DNA de les mostres:



- Afegim 2,65mL d'aigua a 0,53g de civada i 6,15mL a 1,23g de nachos (5mL→1g) i ho triturem.
 - Afegim 50 μ L d'InstaGene Matrix.
 - Bullim durant 5 min.
 - Centrifuguem
- Tècnica de la PCR:
 - Aconseguim un medi aquós en el producte a investigar barrejant la seqüència de DNA diana amb DNA-pol resistent al calor, desoxiribonucleòtids i dos encebadors.
 - Ho escalfem fins a 80°C per aconseguir la desnaturalització DNA inicial.

Dues cadenes amb dos encebadors i el DNA-pol, sintetitzaran la cadena complementària per aconseguir la doble hèlix en el nostre segment de DNA, i aquest procés s'anirà repetint per obtenir el major nombre de segments possible.



- Tècnica d'electroforesi:

L'electroforesi, explicat anteriorment, consisteix en el transport de partícules col·loïdals a través d'un gel per l'acció d'un camp elèctric. Segons la posició final d'aquestes partícules podrem identificar un gen transgènic i així reconèixer un producte transgènic.

Realització del gel:

- 147mL aigua + 3mL TAE (buffer tampó 50x)
- 1,5g agarosa en 50 mL d'aigua + buffer al microones (gel al 3%).

En el gel d'agarosa hi col·locarem una pinta, la qual retirarem quan en gel sigui ja compacte i els forats d'aquesta els utilitzarem per introduir-hi al mostra a estudiar.

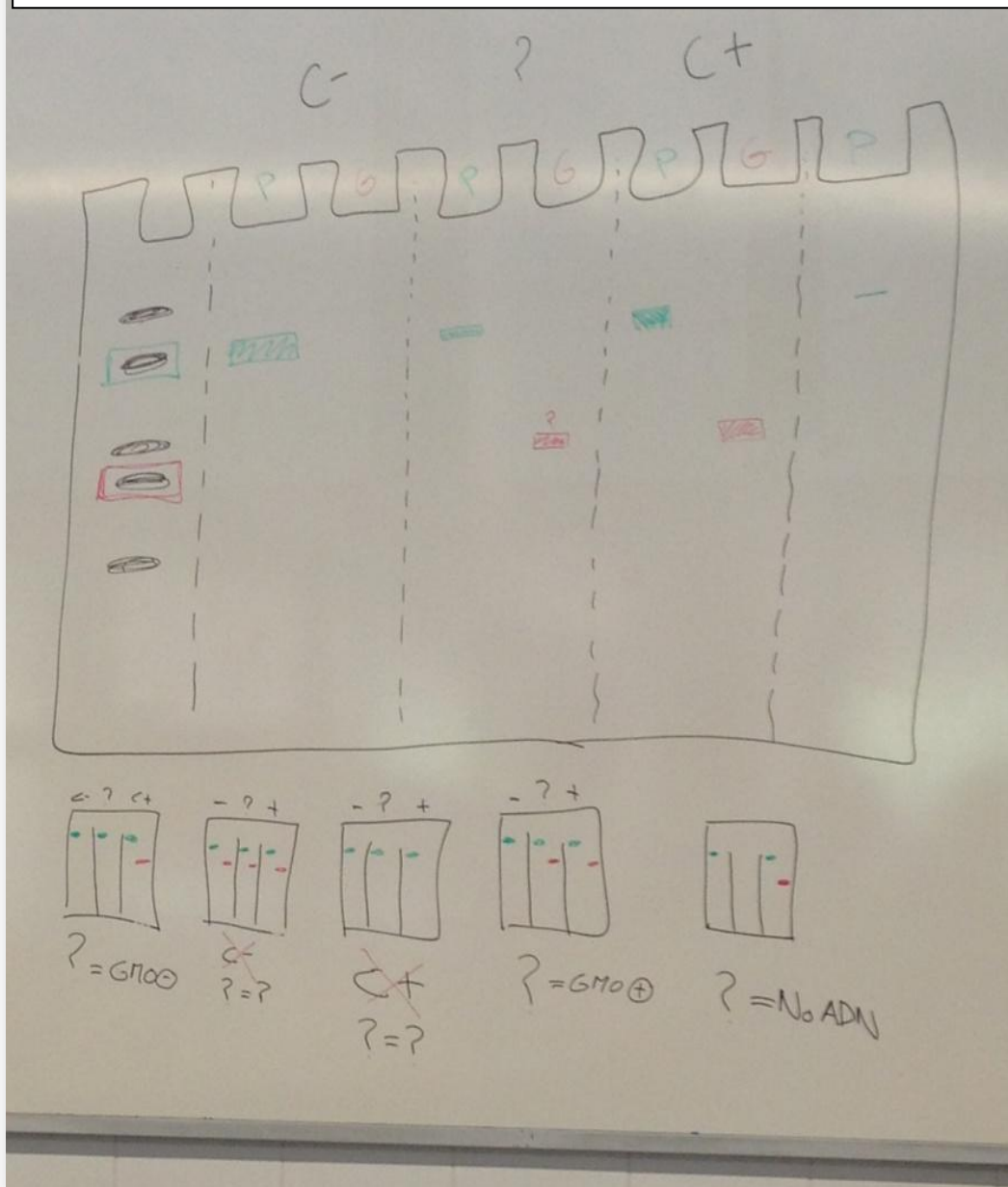
També introduïrem un Molecular Weight Marker que ens servirà com a control del pes molecular i en els porus següents hi introduïrem les altres mostres. S'hi aplica una font de corrent elèctric continu i així s'aconsegueix que les partícules de DNA migrin cap al pol positiu, depenent del seu pes molecular.

Possibles resultats:

Mentre esperàvem que es completes el procés de l'electroforesi, vam estudiar els possibles resultats que en podríem obtenir i van ser aquests.

1. Control negatiu correcte, control positiu correcte i producte negatiu, (sense modificació genètica)
2. Control negatiu incorrecte; no és una prova vàlida.
3. Control positiu incorrecte; no és una prova vàlida
4. Control negatiu correcte, control positiu correcte i producte positiu (modificació genètica existent)
5. Control negatiu correcte, control positiu correcte i sense resultats en el producte a investigar; no hi ha DNA. No és una prova vàlida.

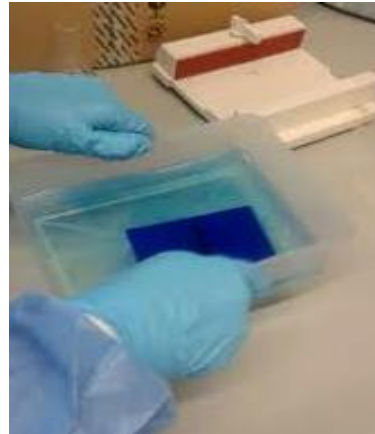
Marker-Control Negatiu- Nachos a estudiar- Control positiu



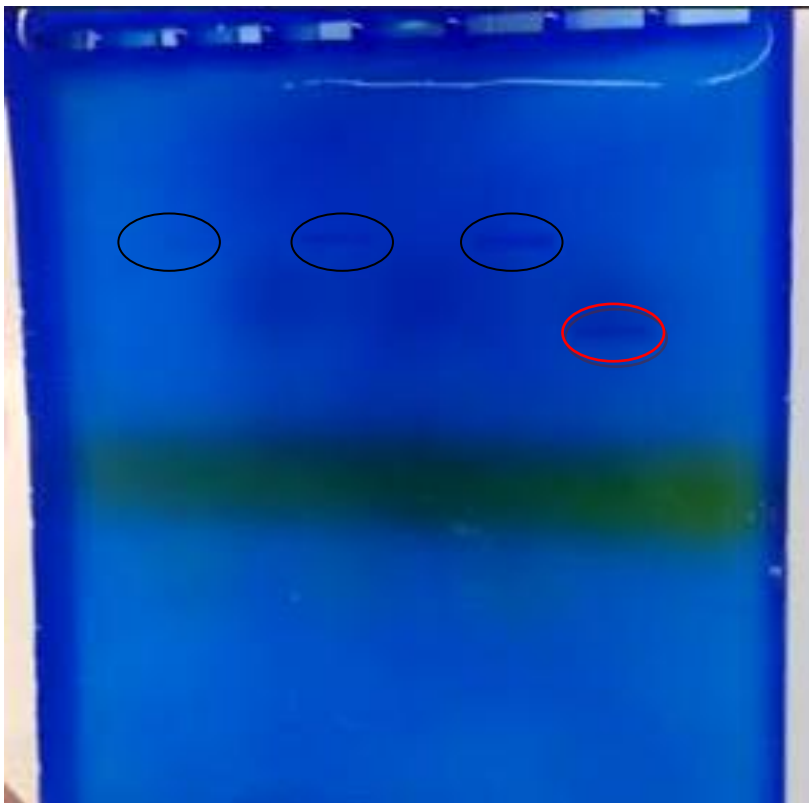
Amb verd es mostra un gen específic de les plantes per tant un gen que ha d'estar present en les tres mostres. I amb vermell es mostra el gen específic dels transgènics; en aquest cas, esperàvem que la mostra de "nachos" hagués estat modificada genèticament i així vam voler preveure-ho en l'esquema.

Resultats:

Després de realitzar el gel d'electroforesi, tenir-lo i deixar-lo reposar; i després extreure'n el tint sobrant passant el gel per diferents recipients amb aigua calenta, vam poder observar els nostres resultats.



C.Negatiu	"Nachos"	C.Positiu
-----------	----------	-----------



Amb negre es mostra un gen present en les tres mostres, un gen present en les plantes (el qual podem arribar a conèixer pel seu pes molecular, marcat per la primera banda on hi hem introduït el Marker DNA); i amb vermell un gen transgènic; el qual hagués aparegut en els "nachos" si haguessin estat modificats genèticament.

Com es pot observar, la mostra dels “nachos” ha donat el mateix resultat que la mostra del control negatiu, per tant; no han estat modificats genèticament.

- Conclusions:

En acabar, vam realitzar un petit debat per trobar els avantatges i inconvenients dels transgènics.

- Avantatges:

Qualsevol mena d'aliment modificat genèticament ens pot proporcionar un munt d'avantatges; per la modificació de les proteïnes, addició o alteració de vitamines que necessitem.

Els transgènics són, també, capaços de resistir a factors físics i ambientals com l'ús de plaguicides i l'atac d'alguns insectes; per tant disminueix la possibilitat de dany i n'augmenta la producció en el camp agrari i també així s'evita l'ús dels plaguicides i així s'evita la contaminació ambiental produïda pels residus químics que aquests provoquen.

A part, els aliments transgènics poden presentar la capacitat d'endarrerir el seu procés de degradació; per tant pot arribar al consumidor més fresc i menys madur.

- Inconvenients:

L'ús dels aliments transgènics pot afectar la biodiversitat d'un país, la seva pèrdua i també pot afectar a la seva economia; per això i per altres factors com la exportació i la seguretat alimentària.

Els transgènics poden ocasionar problemes en la salut humana com al·lèrgies a certes substàncies que poden ser nocives depenent de cada organisme.

El problema que més preocupa, ara per ara, és la possible transmissió d'algun tipus de gens d'aquests aliments als humans.

El que defensen els grups que s'hi posicionen en contra, són els problemes a llarg termini; és a dir, els que sorgiran amb el temps i dels quals no en sabem res encara.

Pràctica a la Universitat de Barcelona:

El fet d'haver participat en el programa "Bojos per la Bioquímica" em va donar l'oportunitat de realitzar, fora d'aquest projecte, una pràctica a la Universitat de Barcelona amb l'ajut de dos tutors, assignats pel Departament de Bioquímica de la Universitat.

La pràctica va consistir en la "**modificació genètica de bacteris E.Coli (*Escherichia Coli*) en introduir-los-hi un plasmidi *pGlo***"

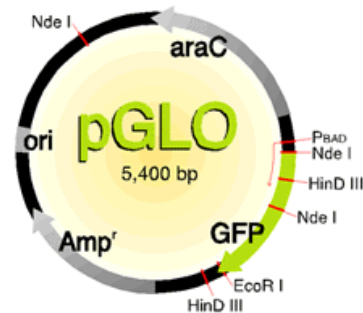
L' *Escherichia Coli* són bacteris, és a dir, de cèl·lules procariotes, amb el material genètic dispers de manera circular, sense introns en el seu DNA. Aquestes característiques faciliten la seva modificació genètica, i per això és un dels bacteris més utilitzats en l'enginyeria genètica.

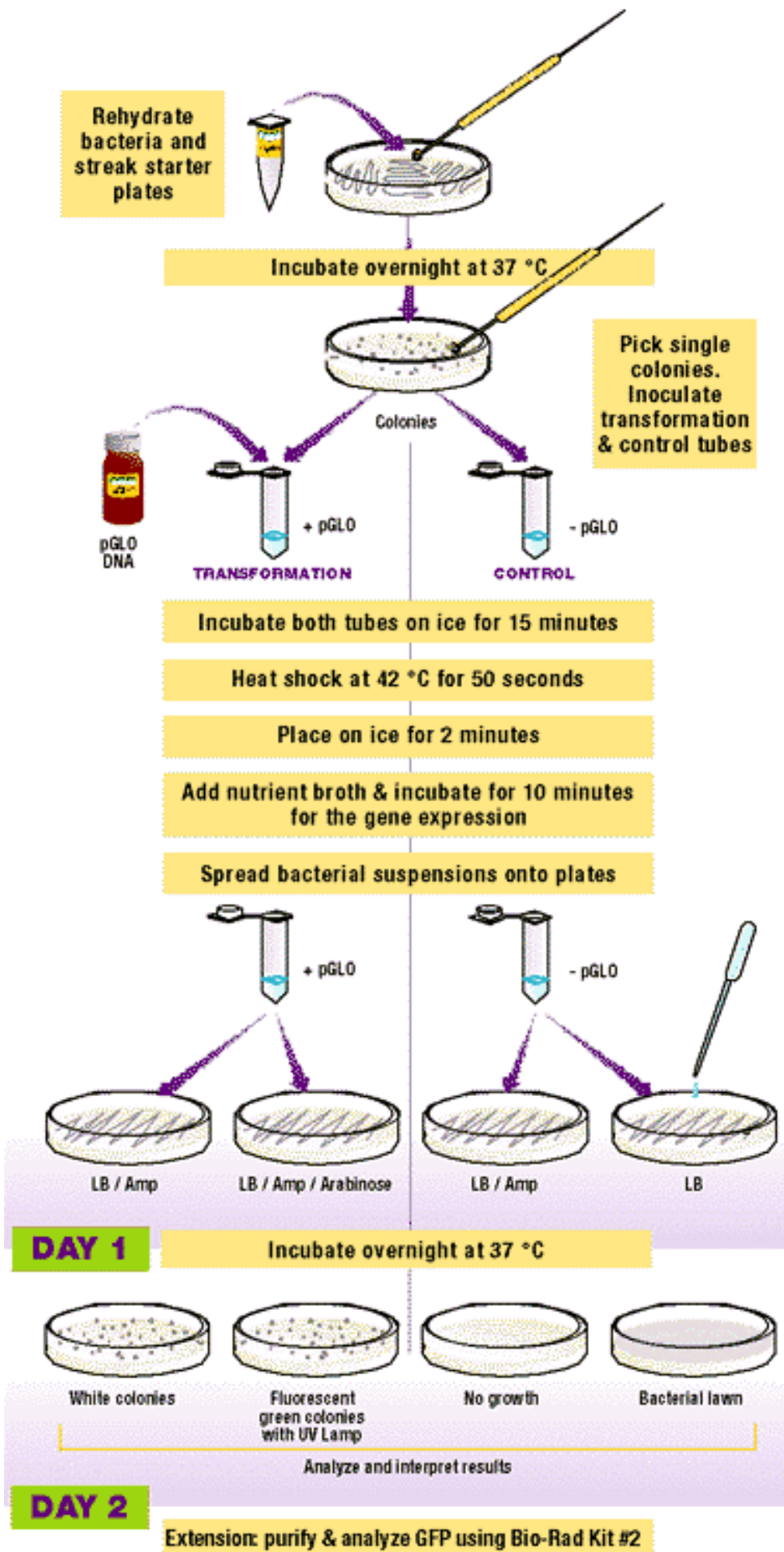
El DNA que codifica el gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) es troba en els cromosomes d'una de les meduses (*Aequorea Victoria*, que es troba en l'Oceà Pacífic Oriental). Els biotecnòlegs han aïllat aquest gen mitjançant tècniques d'enginyeria genètica i s'ha inserit en un plasmidi bacterià. Aquest plasmidi recombinat que conté el gen GFP de les meduses, s'anomena *pGLO*.

El *pGLO* conté diversos gens que permeten la replicació del plasmidi de DNA i l'expressió de la característica fluorescent en els bacteris.

Els gens importants del plasmidi:

- GFP: produeix la proteïna GFP
- Bla: gen que codifica per la β -lactamasa, un enzim que descompon l'antibiòtic ampil·lina. Els bacteris que contenen el gen *bla* poden créixer en mitjans que contenen ampil·lina.
- Ori: origen de replicació.
- Ara C: Només quan l'arabinosa s'uneix a la proteïna *ara C* s'activa la producció de la GFP.





La transformació:

Aquest procediment de transformació consta de tres passos principals.

Aquestes mesures estan destinades a introduir el DNA plàsmic en les cèl·lules E. Coli, i proporcionar un entorn perquè les cèl·lules puguin expressar els seus gens recentment adquirits.

La primera fase per a la modificació genètica és la transformació (realitzada a partir d'un xoc tèrmic); és a dir, la introducció del plasmidi en el bacteri (en aquest cas en l'Escherichia Coli competents, que són bacteris tractats amb unes sals perquè la paret que els embolcalla sigui permeable i així facilitar la introducció del plasmidi)

El creixement en plaques de LB (líquid amb tots els nutrients necessaris) i ampil·lina indica la presència del plasmidi en el bacteri. No obstant això, l'arabinosa també ha de ser present en el mitjà per activar l'expressió de la proteïna GFP.

Les cèl·lules creixen i expressen la resistència a l'ampil·lina gràcies a la β -lactamasa, (produïda pel gen *bla*) de manera que les cèl·lules transformades sobreviuen i aquelles que no hagin realitzat el procés de modificació correctament no.

- **“Modificació genètica de bacteris E.Coli (*Escherichia Coli*) en introduir-los-hi un plasmidi *pGlo*”**

NOTA: La part de modificació del bacteri, és realitzada sota una flama per aconseguir una zona estèril, per evitar així una possible contaminació d'aquests.

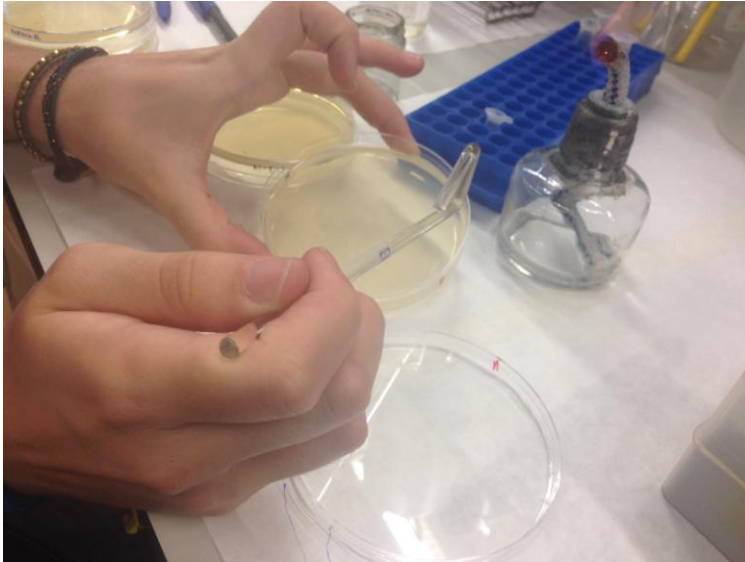


1. Repòs de 2 μ l de bacteris i 1 μ l de plasmidi en eppendorfs a -4°C de temperatura durant 20 minuts
Aquí s'aconsegueix que el plasmidi desitjat es col·loqui prop de la cèl·lula, on més tard s'introduirà
2. **Xoc tèrmic:** 1 minut i 30 segons a 42°C i després de 2 a 5 minuts amb gel. Així s'aconsegueix la introducció del plasmidi en la cèl·lula.

3. Recuperació en 100µl de LB líquid durant 45minuts-1hora.

LB líquid + 100µg/ml d'ampicil·lina + 6mg/ml d'arabinosa.

La dissolució obtinguda l'avoquem en una placa de petri en un medi líquid amb LB (on hi ha els nutrients necessaris per al bacteri) .



Utilitzarem 4 plaques de petri, amb diferents condicions per als bacteris.

En la primera, on hi haurà LB i ampicil·lina hi avocarem uns bacteris que no hagin introduït el plasmidi pGlo, per tant, aquests no sobreviuran perquè no seran resistents a l'ampicil·lina.

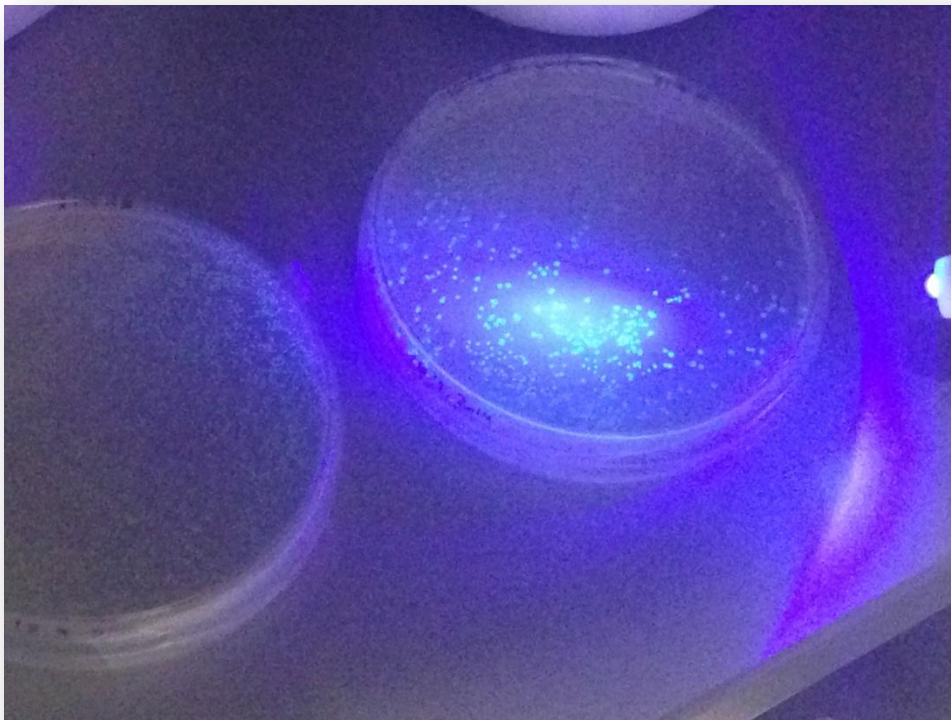
En la segona, on hi haurà LB, ampicil·lina i arabinosa, hi avocarem també uns bacteris que no hagin introduït el plasmidi pGlo i per tant, aquests no necessitaran l'arabinosa per a manifestar el gen per a la fluorescència i apart, moriran ja que sense el plasmidi, no són resistents a l'ampicil·lina.

En la tercera, on hi haurà LB i ampicil·lina, hi avocarem els bacteris amb el plasmidi pGlo. I aquests, sobreviuran ja que seran resistents a l'antibiòtic.

I en l'última, on hi haurà LB, ampicil·lina i arabinosa; hi avocarem també bacteris que hagin introduït el plasmidi, i en aquesta per tant serà en la que aconseguirem els bacteris fluorescents, ja que l'arabinosa activarà el gen de la fluorescència i així se sintetitzarà GFP.

Una vegada avocades les mostres i dispersades amb cura per tota la placa de petri, els deixarem reposar en agitació 24 hores (*overnight*) i a 37°C de temperatura, per a augmentar la velocitat de reproducció del bacteri.

24 hores després, podrem observar que aquells bacteris modificats genèticament i introduïts en la placa de petri amb ampicil·lina, LB i arabinosa; desprendran fluorescència davant llum ultraviolada.



Després d'haver demostrat la correcta introducció del gen en el bacteri, en picarem les colònies, allà on hi hagi més densitat per augmentar així les possibilitats d'agafar més bacteris.

Els bacteris que agafem de les plaques de petri els introduïrem en diferents tubs d'assaig.

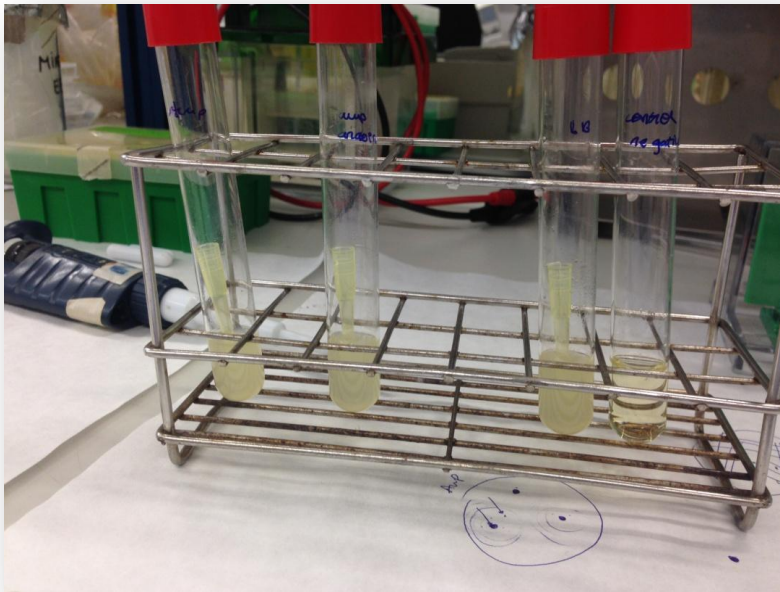
En aquesta part, n' utilitzarem 4.

En el primer, hi introduïrem els bacteris en un medi líquid de LB + ampicil·lina; per tant, sols sobreviuran aquells que hagin introduït correctament el plasmidi pGLO, i així seran resistents a l'antibiòtic.

En el segon, hi introduïrem els bacteris en un medi líquid de LB + ampicil·lina i també arabinosa; per tant sols sobreviuran aquells que hagin introduït correctament el plasmidi pGLO, que seran aquells amb resistència a l'antibiòtic i apart, manifestaran la fluorescència quan l'arabinosa s'uneixi a la proteïna araC, present en el plasmidi.

En el següent, hi introduïrem els bacteris en un medi líquid de LB; per tant aquests sobreviuran tan si han estat modificats o no, però no manifestaran el gen adquirit.

Per últim, com a control utilitzarem un tub on hi introduïrem un medi LB amb arabinosa i ampicil·lina i els bacteris, però sense el plasmidi modificat; és a dir el percentatge de plasmidi que hem introduït als altres, en aquesta mostra serà d'aigua.



Els tubs d'assaig, es deixen reposar durant una nit (over night) a una temperatura de 37°C, la qual es considerada òptima per al creixement del bacteri i en agitació, per accelerar el procés de reproducció dels bacteris.

Al matí següent, després de tota la nit en agitació, realitzarem l'extracció de la proteïna GFP de la nostra dissolució; i per això agafarem 1 ml de la dissolució que contingui LB, ampicil·lina i arabinosa, de la part més tèrbola de la dissolució, (ja que allà hi ha un percentatge més elevat de concentració de bacteris) i l'introduïrem en un eppendorf.

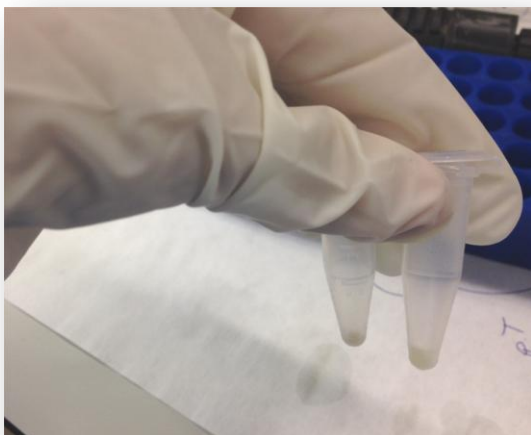
Realitzarem el mateix procediment però amb bacteris sense arabinosa. És a dir, introduïrem 1ml en un eppendorf, per a col·locar-lo en la centrifugadora amb la mostra de bacteris amb el plasmidi. La mostra que no expressarà el gen de la GFP, serveix per a realitzar la centrifugació amb seguretat. És obligatori col·locar una mostra de mateix pes que compensi a la que de veritat volem centrifugar, si la centrifugadora està descompensada podria sortir la mostra disparada i inclús explotar. I així ens servirà per a trobar la proteïna que varia d'una mostra a l'altra en el gel de policrilamida.

Les dues mostres es posicionen una davant de l'altra, per aconseguir així el màxim equilibri possible entre elles.

La centrifugació durarà d'un màxim de 2 minuts a $13,4 \cdot 10^3$ r.p.m.



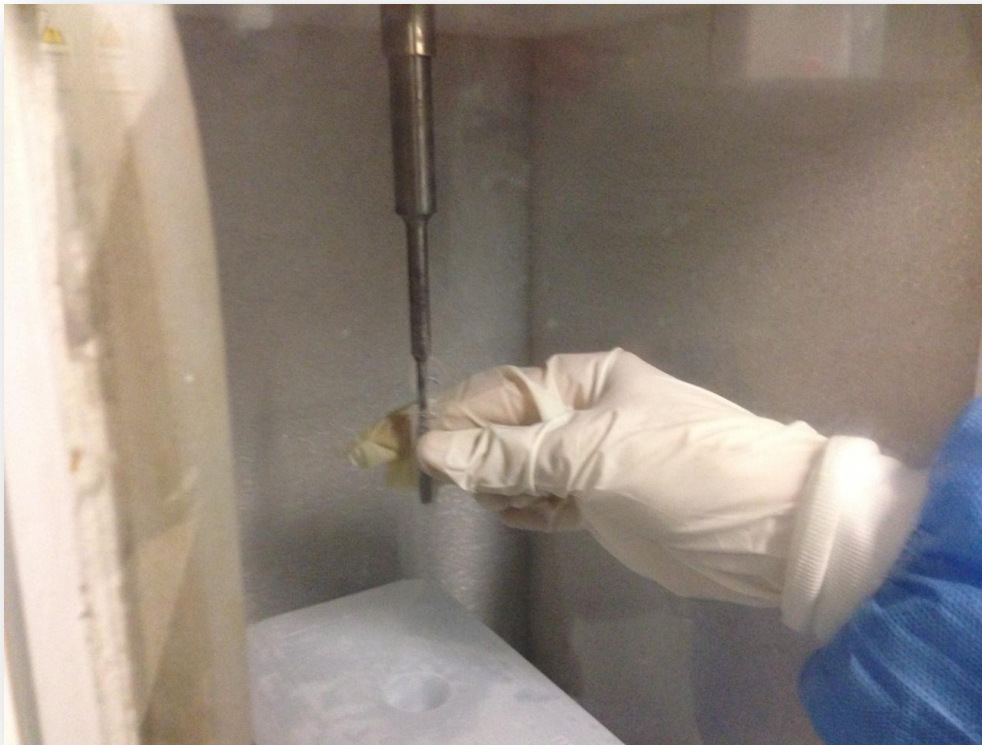
Una vegada centrifugades les mostres, podem observar que s'ha creat una substància sòlida a la part inferior del eppendorf.



Avocarem el sobrenedant de l'ependorf i ens quedarem amb el pellet, que es aquesta part sòlida enganxada al fons. Després, per aconseguir un pH neutre (7.4), suspendrem el pellet en 500µl d'una solució salina.

Seguidament realitzarem una lisi cel·lular, que és el procés de ruptura de la cel·lular que produeix la sortida del material intracel·lular; per aconseguir-ho, aplicarem una sonificació a les mostres, un procés que mitjançant ones, crea uns canvis de pressió que fan que el bacteri exploti i deixi lliure el seu material intracel·lular.

Per aconseguir-ho, hi aplicarem 10 repeticions de 5 a 10 segons cadascuna, a una potència intermèdia.



Finalitzada la sonificació, repetirem el procés de centrifugació, durant 2 minuts a $13,4 \cdot 10^3$ r.p.m. (màxima potència).

En acabar, pipetegem 100µl del sobrenedant de cada mostra al qual hi afegim 20µl d'un tampó de càrrega. El tampó donarà coloració a la mostra (per a poder visualitzar la mostra amb facilitat dins del gel de policrilamida), hi donarà més

La revolució dels gens

densitat (per a facilitar la mobilitat de les proteïnes dins del gel) i hi donarà una càrrega negativa.

Aconseguida ja la dissolució, es deixa reposar al congelador, mentre es prepara el gel de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida, estarà format per dos gels de diferents densitats i 10 pous per a introduir les mostres. En la part inferior; un gel separador amb una densitat elevada per a facilitar la mobilitat únicament a les proteïnes més petites. En la part superior, un gel de densitat menor, el gel concentrador, que actua acumulant les proteïnes en l'inici del gel següent, i així, aconseguir que totes iniciïn el recorregut pel gel separador alhora.

Gel POLIACRILANIDA

	1 gel 0.75 5ml	2 gels 0.75 10ml
3%		
30% Acrilamida/Bis	0.32 ml	0.64 ml
Tris-HCl pH 8.8 (0.5M)	0.62 ml	1.24 ml
SDS 10%	23 µl	46 µl
H ₂ O	1.5 ml	3 ml
Temed	2.5 µl	5 µl
APS 10%	25 µl	50 µl

Concentrador

	1 gel 0.75 5ml	2 gels 0.75 10ml
5%		
30% Acrilamida/Bis	0.825 ml	1.65 ml
Tris-HCl pH 8.8 (0.5M)	1.25 ml	2.5 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl
H ₂ O	2.875 ml	5.75 ml
Temed	5 µl	10 µl
APS 10%	50 µl	100 µl

Separador

	1 gel 0.75 10ml	2 gels 1.5 20ml	Total 0.75 4ml
SDS 10%	50 µl	100 µl	150 µl
H ₂ O	2.05 ml	4.1 ml	6.15 ml
Temed	5 µl	10 µl	15 µl
APS 10%	50 µl	100 µl	150 µl

	1 gel 0.75 10ml	2 gels 1.5 20ml	Total 0.75 4ml
12.5%			
30% Acrilamida/Bis	4.125 ml	8.25 ml	12.375 ml
Tris-HCl pH 8.8 (0.5M)	2.5 ml	5 ml	7.5 ml
SDS 10%	100 µl	200 µl	300 µl
H ₂ O	3.165 ml	6.33 ml	9.495 ml
Temed	10 µl	20 µl	30 µl
APS 10%	100 µl	200 µl	300 µl

30% Acril. Tris-HCl pH 8.8 SDS H₂O Temed APS

1 gel 0.75 10ml: 0.825 ml, 1.25 ml, 50 µl, 2.875 ml, 5 µl, 50 µl

2 gels 1.5 20ml: 1.65 ml, 2.5 ml, 100 µl, 5.75 ml, 10 µl, 100 µl

Per a sintetitzar els gels, utilitzarem:

- Acrilamida i bisacrilamida (la mescla dels quals sintetitza poliacrilamida)
- Tris-HCl per a estabilitzar el pH de la dissolució
- SDS per a donar càrrega negativa a les proteïnes desnaturalitzades
- H₂O
- Temed, un catalitzador que augmentarà la velocitat de reacció.
- ADS, (persulfat d'amoni) per aconseguir un electró lliure que s'ajuntarà amb el radical de l'acrilamida.

Els dos gels estaran formats per els mateixos elements, però amb diferents concentracions i quantitats.

El gel concentrador estarà a un 3% i el gel separador a un 12,5%.

Una vegada avocada la dissolució sintetitzada anteriorment i aquesta polimeritzada, connectarem l'aparell al voltatge i introduïrem diferents quantitats de les mostres i el marker DNA en els pous.



En el primer hi introduïrem 20 μ l de la mostra de bacteris sense expressió de la proteïna GFP, degut a la falta d'arabinosa.

En el segon hi introduïrem 5 μ l de la mostra de bacteris sense expressió de la proteïna GFP, degut a la falta d'arabinosa.

En el tercer hi introduïrem 20 μ l de la mostra de bacteris modificats genèticament i amb l'arabinosa necessària per a activar el gen de la GFP.

En el quart hi introduïrem 15 μ l de la mostra de bacteris sense expressió de la proteïna GFP, degut a la falta d'arabinosa.

En el cinquè hi introduïrem 15 μ l de la mostra de bacteris modificats genèticament i amb l'arabinosa necessària per a activar el gen de la GFP.

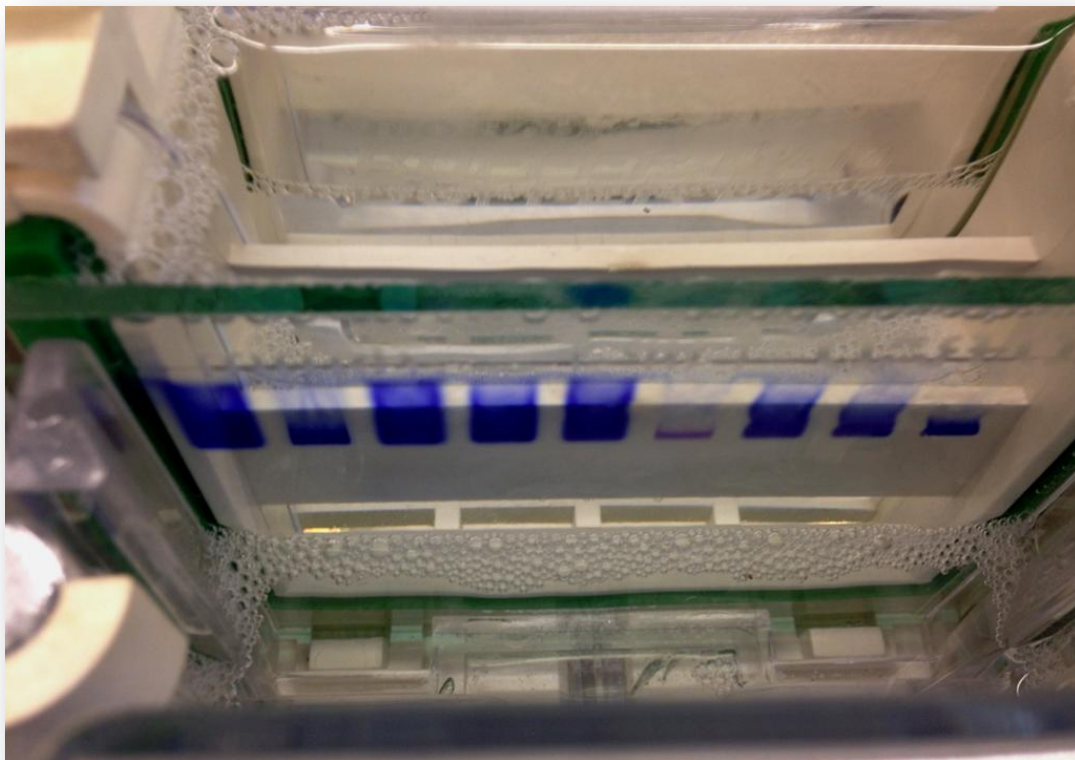
En el sisè introduïrem un Marker DNA per a poder conèixer els pesos de les proteïnes.

En el setè hi introduïrem 10 μ l de la mostra de bacteris sense expressió de la proteïna GFP, degut a la falta d'arabinosa.

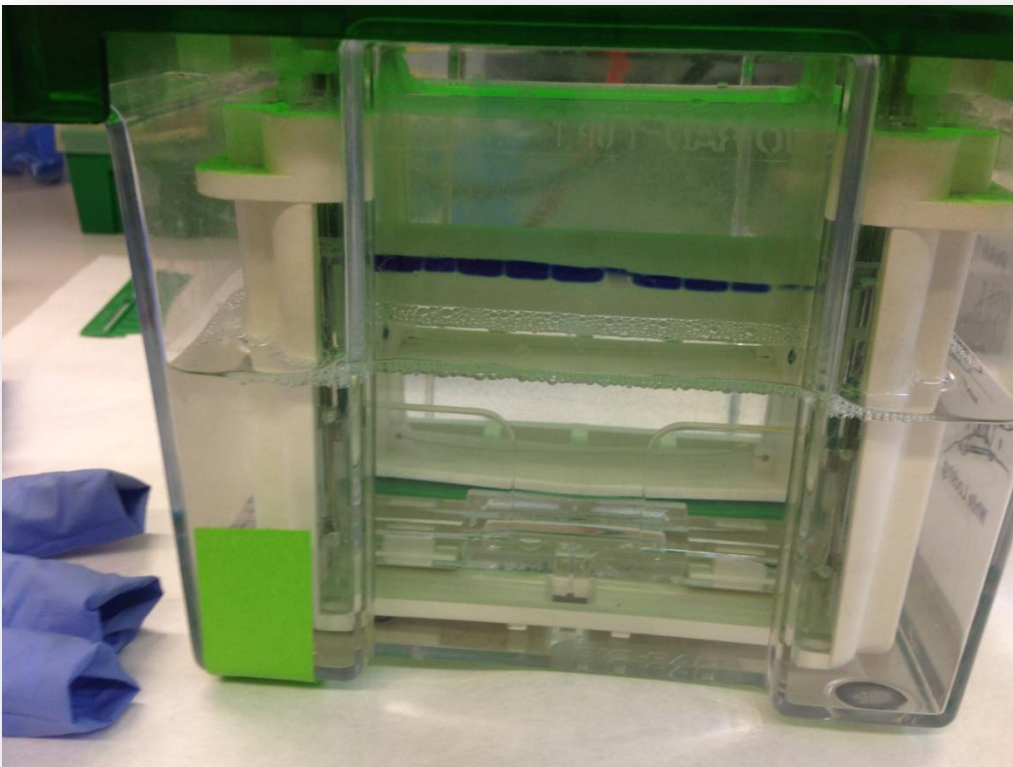
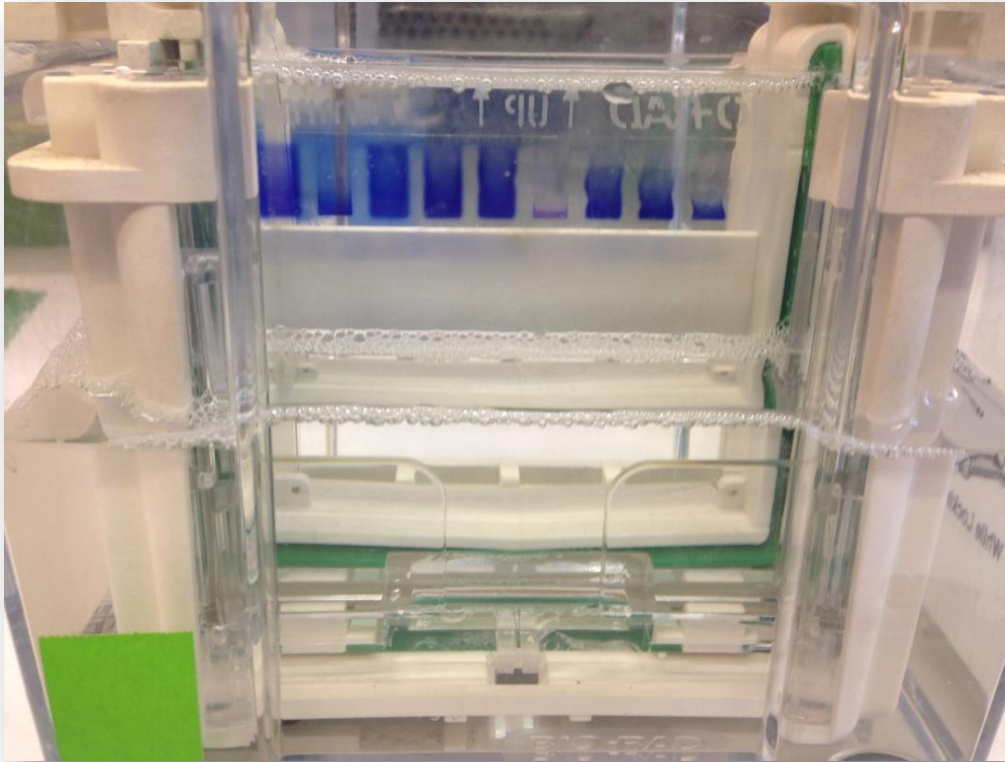
En el vuitè hi introduïrem 10 μ l de la mostra de bacteris modificats genèticament i amb l'arabinosa necessària per a activar el gen de la GFP.

En el novè hi introduïrem 5 μ l de la mostra de bacteris sense expressió de la proteïna GFP, degut a la falta d'arabinosa.

I en l'últim, hi introduïrem un altre marker DNA, per a facilitar-nos la feina a l'hora de veure el pes de cada proteïna.



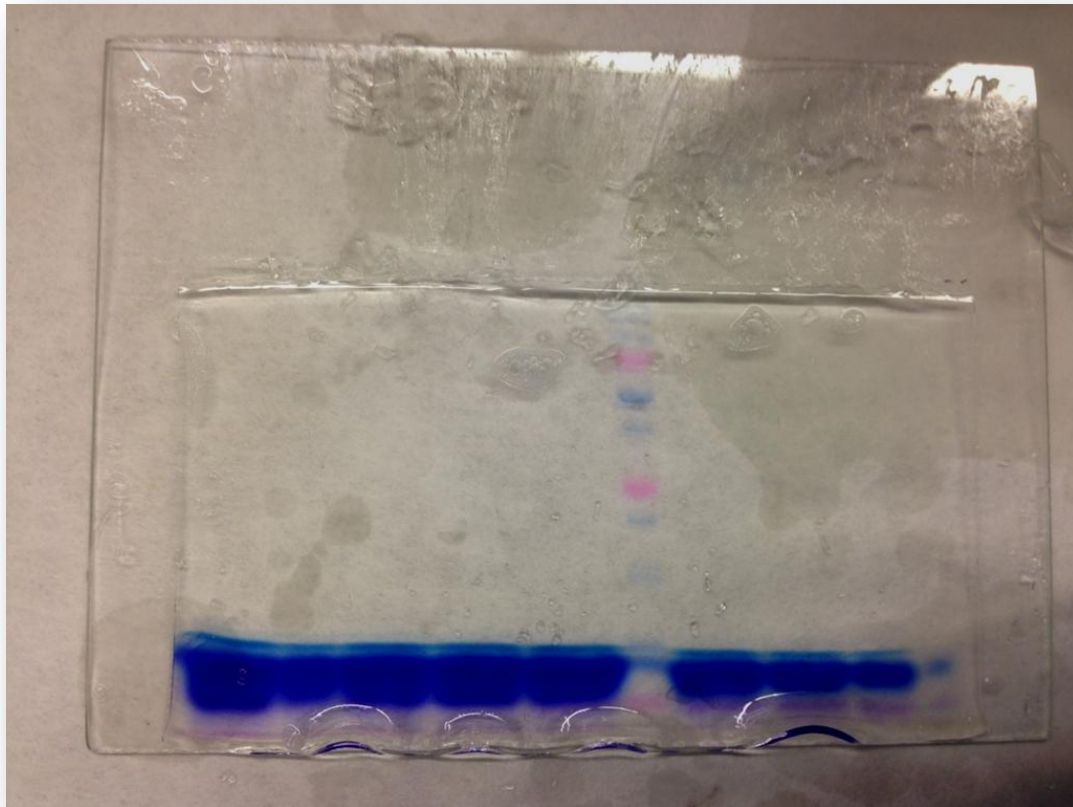
En començar a corre les proteïnes per el gel, aquestes es posicionaran totes en l'inici del gel separador. I una vegada allà, alhora començaran a córrer pel gel separador, variant la velocitat segons el seu pes molecular.



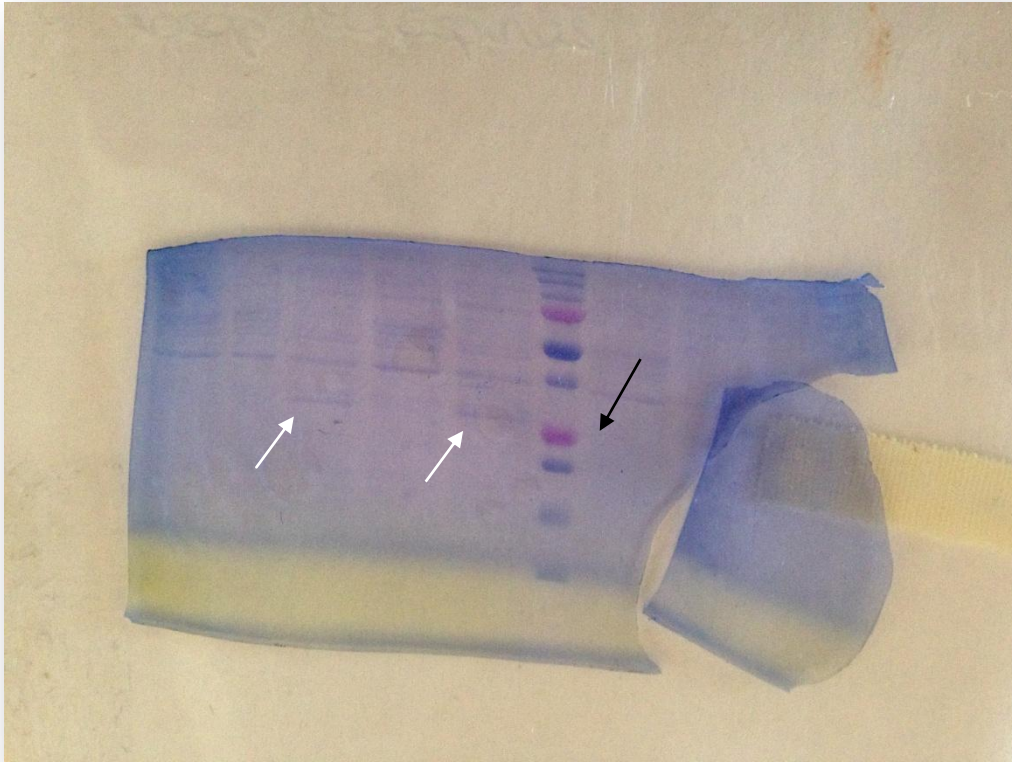
Deixats passar uns 45minuts a un voltatge alt, podem apagar l'aparell i retirar el gel,

Una vegada fora, el tenyim per a poder veure amb més facilitat les proteïnes que s'hi troben i el deixem reposar; després el netegem amb aigua destil·lada.

Si el repòs no és suficient no es poden veure amb claredat les proteïnes.



Com es mostra en la fotografia, sols es visualitza un dels Markers introduïts, i això es degut a la falta de repòs. Així que en vista de que no apareixien els resultats i donant per a finalitzada la pràctica. Vam recollir el laboratori i vam marxar. I, dos dies més tard, en anar a mirar els resultats del gel que vaig endur-me per ensenyar-los a aquells que m'havien preguntat què havia anat a fer, es visualitzaven perfectament totes les proteïnes; però el gel s'havia trencat per una punta. Ja que quan deixa d'estar en remull s'asseca.



Vam utilitzar un Marker DNA anomenat “Precision Plus Protein Dual Color Standards”; i buscant els pesos que aquest indica, veiem que la franja lila (senyalada amb una fletxa negra en la fotografia), indica un pes de 25kDa. A part, busquem el pes de la proteïna GFP, i trobem que aquest és de 27kDa.

Una vegada es sap això, podem mirar si és cert que aquesta proteïna sols es manifesta en aquells carrils on ha estat introduïda una mostra que contingues bacteris modificats i amb l'arabinosa necessària per a activar el gen de la GFP, i així la producció de la proteïna. I veiem que en el carril número 3 i número 5, els quals contenen 20µl de la solució de bacteris amb arabinosa i 15µl de la mateixa solució, respectivament; s'hi manifesta una franja que no es manifesta en aquells carrils on s'hi ha introduït una mostra amb bacteris incapacitats per a produir la proteïna. La proteïna marcada amb una fletxa blanca és, per tant, la GFP.

També podem observar que hi ha algunes proteïnes que es manifesten en totes les mostres i amb més intensitat que d'altres, això depèn de la importància d'aquestes en el bacteri, la quantitat, etcètera.

Conclusions:

Per a què serveix aquesta pràctica?

Pot semblar una pràctica sense una finalitat gaire clara. Bé, en el meu cas, va servir per aprendre a realitzar una modificació genètica d'un organisme. I aquesta va ser també la finalitat dels primers que van realitzar-la.

De totes les modificacions que es poden dur a terme, és de les menys complexes i per tant, més fàcils de realitzar sense error sense ser un expert del tema.

El gen de la GFP, procedent d'unes meduses, els hi resulta útil a aquestes per a no fer ombra en les profunditats del mar i així no ser detectades per les seves preses. Al bacteri *E.Coli* no li serveix la proteïna fluorescent sintetitzada per aquest gen, però sí que pot servir als investigadors, en diferents projectes d'investigació, per a poder detectar els bacteris.

La pràctica, s'utilitza molt per la facilitat a l'hora de demostrar si la modificació s'ha realitzat amb èxit; ja que sols cal aplicar llum ultraviolada als bacteris i aquests desprenen la fluorescència si han introduït correctament el plasmidi.

Com ha estat la realització de la pràctica?

La modificació genètica no ha estat extremadament difícil, tal com podia semblar en un principi.

La tècnica del *xoc tèrmic* és relativament senzilla i el bacteri *E.Coli*, mostra facilitat a l'hora d'introduir en el seu material genètic, el material genètic provinent del plasmidi *pGLO*.

Tot i això, resulta impensable la quantitat de protocols i passos entremetjats indispensables que s'han de seguir per a poder arribar al bacteri modificat genèticament i aquí sorgeix la dificultat de la pràctica.

Realitzant-la; he après a treballar en un laboratori sense deixar de banda els detalls, com el treballar sota la flama (que em va costar molt recordar cada vegada que havia de pipetejar alguna cosa de fer-ho sota), donar importància a

la seguretat del laboratori (guants, bata...), valorar els possibles resultats abans de veure el resultat final, entre d'altres.

El fet que en el primer moment no es veiessin les proteïnes en el gel de policrilamida, va ensenyar-me a repassar tots els passos seguits en l'experiment. Sense trobar-hi cap error, i així al final, va resultar aparèixer allò que esperàvem.

Voldria agrair l'ajut de Maria Jose, Enric i Xavier Hernández, sense els quals no hagués estat possible la correcta modificació, i especialment; per la seva paciència en explicar-me tots els passos un munt de vegades, el perquè de cadascun i també per al seu interès en què el resultat de la pràctica en el meu treball quedés bé.

En acabar, vaig realitzar una entrevista als dos tutors que em van ajudar moltíssim a poder realitzar la pràctica correctament:

- **Maria José López Iniesta:**

Estudis cursats:

Grau de Biologia, Màster en Genètica i Genòmica. Actualment cursant el Doctorat en Genètica. (Tots els estudis realitzats a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona)

Quin paper creus que té l'enginyeria genètica en les investigacions?

L'enginyeria genètica seria alhora una eina en sí que permetria profunditzar en l'estudi de la biologia molecular, i alhora un mitjà per modificar organismes. Dit d'una altra manera, s'empra tant en la ciència bàsica com en l'aplicada. En les investigacions de ciència bàsica permet abordar qüestions de la vida que d'altra banda serien, si no impossibles, molt difícils de resoldre; i també permet fer qüestionar la vida fent-hi modificacions que en la natura no hi tindrien lloc, així que obre un gran i nou ventall de possibilitats d'investigació.

T'agradaria poder emprendre un projecte personal en aquest àmbit ? Cap on s'encaminaria ?

Sí que m'agradaria (i, de fet, no sé si part de la meua tesi es dirigirà en part a aquest àmbit). Preferiria que s'encaminés resoldre o bé problemes socials (com ara la cura de malalties, o transgènics que permetin tenir aliment més nutritiu en regions àrides, per exemple), o bé problemes ambientals (com podria ser la destoxicació de les aigües).

Creus que de tots els petits projectes que es realitzen avui en dia, es podrà arribar a algun descobriment de grans magnituds?

El que fa avançar la ciència és la posada en comú de les descobertes i les proves infructuoses. La suma del que puguin fer petits projectes, pot donar peu a un descobriment de grans magnituds que, potser si no fos per totes aquestes aportacions, no se'ls hagués acudit alguna idea que hagués conduït a un gran descobriment. Per tant, sí, ho crec.

Què en penses dels valors ètics de la modificació dels gens d'un organisme ?

Es modifica sense rancor tot tipus d'organismes, fins i tot més darrerament la teràpia gènica modifica ni que sigui una part del cos d'un humà per curar-lo d'una patologia. Tenim una visió molt antropocèntrica, i pensem que pel bé d'avançar en la ciència i el saber de la humanitat, ens és permès de modificar altres organismes. Si bé es pot dubtar l'ètica de tot plegat, sí que és innegable que, de no ser així, no s'hagués avançat ni una ínfima part com s'ha avançat en el coneixement.

Què en penses de totes les organitzacions que estan en contra de la utilització d'animals al laboratori ?

Seguint amb la pregunta anterior (i et contesto ambdues com si fos la mateixa, gairebé), entenc molt bé les raons d'aquella gent que està en contra de la utilització d'animals d'experimentació. En aquest sentit, si se vol continuar avançant (sobretot en camps que tenen tanta demanda com el descobriment de fàrmacs), no es pot prescindir de la utilització d'aquests animals. Ara bé, potser es podria intentar restringir que s'utilitzessin només quan fos estrictament necessari. De totes maneres, sempre que és possible s'intenta utilitzar alternatives, com cultius cel·lulars (camp que està en expansió per les cèl·lules pluripotents induïdes).

Què diries a aquells que poden invertir en ciència perquè no deixin mai de fer-ho?

Invertir en ciència és un bé cap a la societat: s'augmenta el saber i el coneixement del món, i es donen solucions a problemes humans i ambientals. No és un gest infructuós en cap sentit.

Per acabar, veus l'enginyeria genètica com al futur de la investigació científica?

Encara que sigui en una part de la investigació científica, certament l'enginyeria genètica és una eina molt potent que no es para d'actualitzar en tècniques

constantment. Així que sí, la veig en un futur, i per un futur que durarà de molts anys en endavant!

- **Xavier Hernandez Alias:**

Estudis cursats: *Grau de Bioquímica a la Universitat de Barcelona*

Quin paper creus que té l'enginyeria genètica en les investigacions?

Aporta moltes eines avui en dia indispensables per poder avançar en les investigacions.

T'agradaria poder emprendre un projecte personal en aquest àmbit ? Cap on s'encaminaria ?

Sí, especialment en el camp de l'estudi de la biologia del càncer.

Creus que de tots els petits projectes que es realitzen avui en dia, es podrà arribar a algun descobriment de grans magnituds?

Crec que el futur de la investigació està cada vegada més globalitzat, i és la suma de molts projectes el que fa els grans descobriments.

Què en penses dels valors ètics de la modificació dels gens d'un organisme ?

Sempre que porti a la cura de malalties o millora de la qualitat de vida hauria de ser possible, però és molt important establir clarament uns límits.

Què en penses de totes les organitzacions que estan en contra de la utilització d'animals al laboratori ?

Els animals de laboratori són indispensables a l'hora de fer estudis que en un futur poden arribar a curar malalties o millorar la qualitat de vida. Ara bé, el seu ús ha d'estar ben regulat.

Què diries a aquells que poden invertir en ciència perquè no deixin mai de fer-ho?

La ciència es un camp en contínua expansió i les millores que se'n poden derivar a llarg termini són extremadament rellevants a la societat.

Per acabar, veus l'enginyeria genètica com al futur de la investigació científica?

El futur de la investigació científica està en la enginyeria genètica i molts altres camps d'estudi, i aquesta interdisciplinarietat serà un punt clau.

15. CONCLUSIÓ FINAL, VERIFICACIÓ DE LA HIPÒTESI

En escollir aquest treball, en escriure les primeres frases sobre l'enginyeria genètica, i sobretot en començar a buscar informació per a saber què feia exactament l'enginyeria genètica en la recerca; vaig veure clar que aquestes tècniques tindrien, de ben segur, un paper importantíssim en la ciència.

I ara, escrivint les últimes paraules; **reafirmo que el paper de l'enginyeria genètica en la investigació científica és clau**, però cal remarcar que és sols el començament i que l'enginyeria genètica serà l'eina del futur per a realitzar projectes que ara per ara ens resulten inimaginables. De la mateixa manera que fa cinquanta anys, aquells que no sabien clarament l'estructura del DNA, aquells que van descobrir que els gens codificaven per a proteïnes o aquells que fa vint-i-cinc van aconseguir la primera molècula de DNA recombinant en el laboratori, no es podien imaginar la quantitat de projectes que aquells petits descobriments han permès.

Queda clar que, els projectes que s'han aconseguit gràcies a l'enginyeria genètica són fonamentals per a la cura de moltes malalties, per a la millora dels productes que ingerim, per a la fabricació de qualsevol mena de fàrmacs... Però sense aturar-nos aquí, cal donar un pas més i veure què més en podem extreure de la infinitat de projectes que l'enginyeria genètica ens permet.

16. OPINIÓ PERSONAL:

Després de gairebé deu mesos, ha arribat el final d'un gran esforç que ha comportat moltes hores davant la pantalla de l'ordinador intentant explicar, amb paraules comprensibles per a qualsevol que volgués llegir el treball, un seguit de tècniques molt complexes. I després de tot, crec que n'hi ha algunes, com el projecte genoma humà que m'ha resultat impossible d'explicar d'una manera senzilla, la complexitat del projecte ho impedeix. L'esforç també ha comportat viatges a Barcelona, a Lleida, entrevistes amb entesos de ciència, i frustració a l'hora de voler explicar alguna cosa que ni jo mateix entenia. Ha estat realment difícil però ara, una vegada acabat m'adono del que dia ha dia he aconseguit i del que m'ha enriquit científicament i me'n sento molt orgullosa.

Un cop acabat el treball, espero que de la mateixa manera que m'ha servit a mi redactant-lo; serveixi a molts curiosos que el vulguin llegir. Que qualsevol amb ganes de saber que ens depararà la ciència en uns anys, pugui fullejar el que he estat escrivint, que qualsevol pugui sentir interès en les pràctiques que he fet, que pensi en projectes que es podrien realitzar gràcies a l'enginyeria genètica, que s'hi posicioni a favor o en contra, que es conscienciï sobre els transgènics, sobre l'obtenció dels fàrmacs que qualsevol es pren sovint, sobre la cura de la malaltia que pateix aquell familiar, amic, veí... Que un petit projecte obri les portes d'aquesta societat científica a molts.

Una de les meves fites en acabar el treball, era poder posicionar-me a favor o en contra de l'enginyeria genètica i ara, després d'haver vist tot el que pot arribar a aconseguir per als nostres beneficis directes, crec que és una eina molt favorable per a la societat humana; però que sols ho seguirà sent si es segueix establint la mateixa rigidesa a l'hora de mirar els comportaments ètics de tots els projectes.

L'enginyeria genètica pot arribar a crear coses increïbles, però si no es controla i se'n va de les mans d'aquells que tenen el poder de controlar-ho, pot resultar inclús perillosa.

Així, la meva conclusió seria: **“Enginyeria genètica? Sí, però no de qualsevol manera”**

17. WEBGRAFIA:

(27 abril 2014)

<http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/bitstream/10609/1211/1/36286tfc.pdf>

(9 Juny 2014)

<http://blog.educastur.es/entrelneas/files/2010/05/ingenieria-genetica-lucia-obeso-almeida.pdf>

<http://www.arrakis.es/~ibrabida/viginsercion.html>

<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=4>

(10 juny 2014)

<http://genemol.org/biomolespa/organismo-transgenicos/plantas-transgenicas.html>

<http://genemol.org/biomolespa/plasmidos/plasmidos-01.html>

<http://books.google.es/books?id=7RkM2ilzaXYC&pg=PA286&lpg=PA286&dq=sexducci%C3%B3&source=bl&ots=YCZ8DvtP7o&sig=7TyAG4sdzEyLBZQG6junT6ubFzQ&hl=es&sa=X&ei=aN6eU4m9LYKp0QXZi4DADw&ved=0CJoBEQgBM A8#v=onepage&q=sexducci%C3%B3&f=false>

(18 juny 2014)

<http://es.wikipedia.org/wiki/Electroporaci%C3%B3n>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Microinyecc%C3%B3n>

<http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/biote c/ampliarecombinante.htm>

<http://joseppamies.wordpress.com/la-locura-de-las-semillas-transgenicas/>

<http://www.lavanguardia.com/vida/20120308/54266162244/espana-apostara-activamente-transgenicos.html>

http://elpais.com/tag/manipulacion_genetica/a/

(19 juny 2014)

<http://www.its.caltech.edu/~johnmm/publicPerspectives2GMOs.htm>

<http://www.caltech.edu/search/sites/genetical%20modified#gsc.tab=0&gsc.q=genetical%20modified&gsc.page=1>

(8 Juliol 2014)

http://noticias.lainformacion.com/salud/cancer/hm-hospitales-aplica-la-electroporacion-irreversible-para-el-tratamiento-de-tumores-hepaticos-y-pancreaticos_np0PwBFsGY9jPCjQkLZf85/

(21 Juliol 2014)

<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/PCR/PCR.htm>

<https://www.youtube.com/watch?v=TalHTjA5gKU>

<https://www.youtube.com/watch?v=V9PtQlp-e7g>

<http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/biote/c/contenidos4.htm>

<http://es.wikipedia.org/wiki/RT-PCR>

<http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>

(5 Agost 2014)

http://www.bio.davidson.edu/Courses/immunology/Flash/RT_PCR.html

(10 Agost 2014)

<http://www2.cbm.uam.es/jalopez/personal/seminariosvarios/transgenicos.htm#SEIS>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Retroviridae>

(15 Agost 2014)

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n5.pdf>

<http://www.nslc.wustl.edu/courses/Bio2960/labs/07DNA/Gel/>

http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular-weight_size_marker

<http://commons.wikimedia.org/wiki/Electrophoresis>

(19 Agost 2014)

http://es.wikipedia.org/wiki/Proyecto_Genoma_Humano

http://carlosgimenez.info/bbq2014/bdm_p.html

<http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/2940601.stm>

http://prensa.lacaixa.es/obrasocial/barcelona-nueva-sede-archivo-europeo-genoma-fenoma-ega-obra-social-la-caixa-esp_816-c-20100_.html

(1 Setembre 2014)

http://ca.wikipedia.org/wiki/Transcriptasa_inversa

<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=33>

(8 Setembre 2014)

<http://llunadeneu.files.wordpress.com/2012/04/enginyeria-genc3a8tica.ppt>

http://www.iesvegadelpiron.es/DtosDidacticos/DTOCIENCIAS/documentos/apuntes%20de%20biologia/24Gen_apli.pdf

(8 Setembre 2014)

<http://biologia.laquia2000.com/microbiologia/los-plasmidos>

<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/expresion.htm>

(8 setembre 2014)

<http://prezi.com/ptthvuwczrf/enginyeria-genetica/>

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/28/DNA_replication_es.svg/500px-DNA_replication_es.svg.png

(9 Setembre 2014)

http://www.bbc.co.uk/mundo/ciencia_tecnologia/2010/01/100118_plantas_lp.shtml

<http://www.diariomedico.com/2006/06/20/area-cientifica/especialidades/cardiologia/investigacion/el-tejido-celular-adulto-evita-el-marcapasos-en-el-bloqueo-cardiaco-infantil>

(11 Setembre 2014)

<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/genoma-2.html>

(12 Setembre 2014)

<http://www.bq.ub.edu/bojosBioquimica/programa.htm>

(17 setembre 2014)

<http://www.redalyc.org/pdf/674/67403309.pdf>

<http://www.diccionari.cat/>

<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2010/10/22/nar.gkq967.short>

http://www.crg.eu/sites/default/files/crg_media/381361.PDF

<https://www.bsc.es/about-bsc/press/bsc-in-the-media/barcelona-new-home-european-genome-phenome-archive-fundamental>

http://premsa.gencat.cat/pres_fsvp/docs/2014/05/14/14/38/c5c38f09-78f3-4452-9d2c-1db4afd8a547.pdf

(30 Setembre 2014)

<http://es.slideshare.net/rojassuhail/ingenieria-genetica-y-clonacion-humana>

(5 Octubre 2014)

http://es.wikipedia.org/wiki/Organismo_gen%C3%A9ticamente_modificado

(8 Octubre 2014)

<http://www.monografias.com/trabajos68/ingenieria-genetica/ingenieria-genetica2.shtml#historiada>

(17 Octubre 2014)

<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/genetica/contenido14.htm>

(20 octubre 2014)

<http://lascelulasmadre.es/clonacion>

http://ca.wikipedia.org/wiki/Pot%C3%A8ncia_cel%C2%B7lular

18. AGRAÏMENTS:

Començar aquest treball no hagués estat possible sense l'ajuda d' Eva Costa, qui em va incitar a endinsar-me d'una manera especial en el món de la ciència; i es va convertir en la meva tutora d'aquest treball.

Una vegada començat, he d'agrair la col·laboració d'en Josep M^a Fernandez, director del departament de Bioquímica de la Universitat de Barcelona; de tots els companys del curs "Bojos per la Bioquímica", en especial aquells que van realitzar amb mi la pràctica "*GMO plants, a friend or a foe?*" Judith Sabaté i Josep M^a Ferrer; de Cristina Fabà (antiga alumna de l'INS de Tremp, estudiant de Medicina a la Universitat de Barcelona); de Maite Rodriguez-Manzaneque, cap del servei de transgènics de "l'Institut de Recerca Biomèdica" de Lleida; de Maria José López, Xavi Hernández i Enric, els tutors que em van ajudar a poder realitzar amb èxit la pràctica a la Universitat de Barcelona; a Isidre Felip (antic alumne de l'INS de Tremp, grau en Ciències Biomèdiques a la Universitat de Lleida) qui em va facilitar els contactes necessaris per a poder enriquir el meu treball de recerca.

Per acabar, voldria agrair també l'ajut, (no escrivint més paraules, sinó animant-me a que jo ho fes) dels meus pares i germana, qui han suportat tots els meus mals de cap, nervis i estrès a l'hora de redactar el treball; de la meva àvia, qui estava més il·lusionada que ningú imaginant-me en un laboratori descobrint la cura per a milers de malalties quan anava a les primeres sessions teòriques i pràctiques del programa "Bojos per a la Bioquímica"; de la meva abuela, qui explica orgullosa a totes les seves amigues cadascun dels petits projectes que he fet, l'avanç del meu treball i el meu possible futur dedicat a la ciència; dels tiets i tietes, que han aportat el seu granet d'arena amb tot el que podien; amics i amigues, amb els que hem compartit dia rere dia les preocupacions que el Treball de Recerca ens comportava i ens hem animat uns als altres; i tots aquells que d'alguna manera o altra hagin format part del meu, ja acabat, treball de recerca.