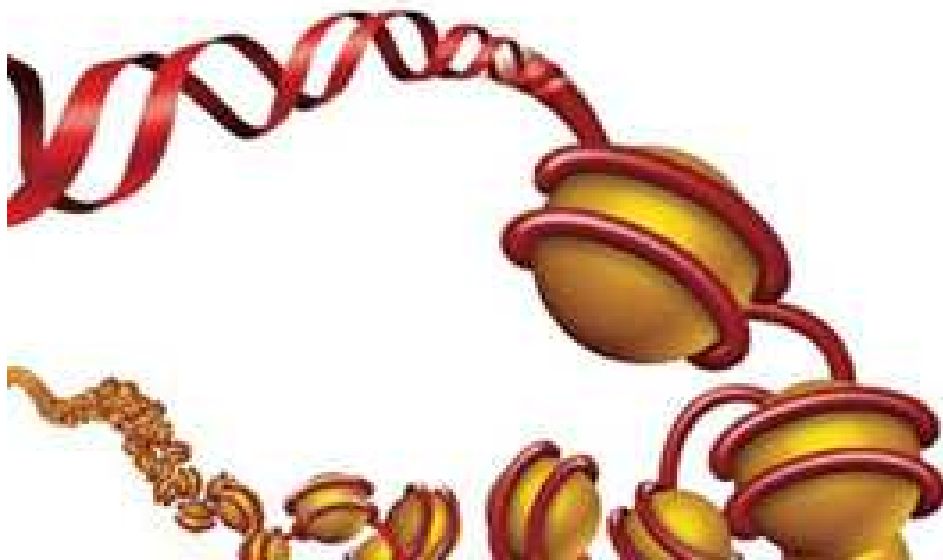
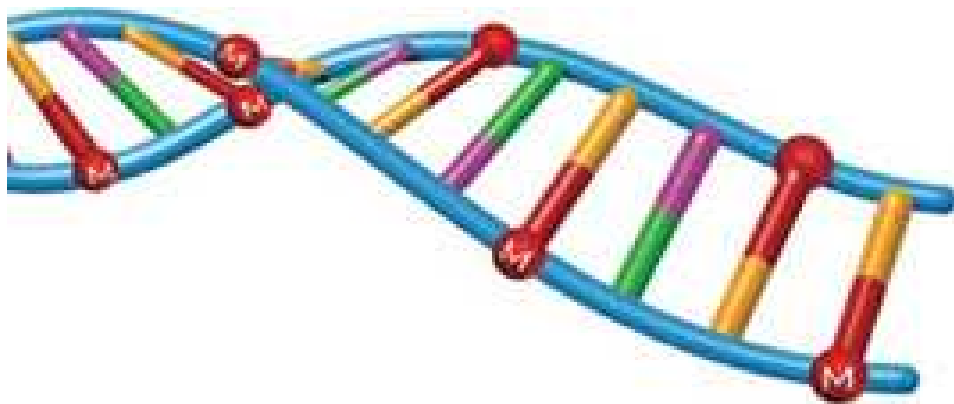


INTRODUCCIÓ AL EFECTES
TRANSGENERACIONALS DE
L'EPIGENÈTICA HUMANA



AGRAÏMENTS:

Aquest treball, ha estat possible, gràcies a:

*****, la meva tutora, que amb la seva insistència i perseverança m'ha fet treballar quan tocava . També aprecio molt els seus contactes al món acadèmic, que em van permetre conèixer en Jordi Viñas (el que ha estat el meu tutor a la UdG) i en Juan A. Subirana, .

Jordi Viñas, per donar-me grans quantitats d'informació a la qual difícilment hi hagués pogut tenir accés, per assessorar-me durant la planificació del treball, per les pràctiques de laboratori i l'ajut per emplenar els papers de la beca.

Francesc Piferrer, per ser el primer en contestar-me i en obrir el seu laboratori per a mi, i per una entrevista llarga i molt intensa.

Luciano Di Croce, per mostrar-me el seu laboratori i experiències, però el més important, per mostrar-me el caliu humà que es respira en el seu grup de treball.

Juan A. Subirana, per deixar-me el que ha estat el meu llibre guia (sobre l'epigenètica) durant tot l'estiu i bona part del setembre i octubre; i per mostrar-me les millors instal·lacions que he vist fins ara.

També vull donar les gràcies a en Gerard (llicenciat, que investiga amb Jordi Viñas), l' Elsa i la Raquel (científiques sota la supervisió de Subirana) per mostrar-me bona part de les seves investigacions i elements diversos del laboratori.

També vull donar les gràcies a la UdG, per confiar en mi i les meves capacitats, al donar-me la beca Botet i Sisó 2010 pel treball de recerca.

ÍNDEX

1.Introducció.....	3
1.1.Història.....	4
1.2. Enginyeria Genètica.....	6
1.3. Epigenètica.....	6
2.Epigènesi.....	8
2.1. Processos epigenètics.....	8
2.1.1. Metilació del DNA.....	8
2.1.2. Acetilació d'histones.....	9
2.1.3. RNA no codificant.....	10
2.1.4. Infecció per prions.....	11
2.1.5. <i>Imprinting</i>	13
3.Efectes transgeneracionals de l'epigenètica.....	14
3.1. Introducció.....	14
3.2. <i>Soft inheritance</i>	16
3.2.1. Efectes parentals adaptatius en mamífers (no humans).....	17
3.2.2. Programació fetal en el gènere humà.....	19
3.3 Efectes epigenètics transgeneracionals no adaptatius.....	20
3.3.1. En mamífers (no humans).....	21
3.3.2. En humans.....	23
4.Pràctiques.....	24
5.Conclusions.....	33
6.Bibliografia.....	35
7.Annexos.....	38
7.1. Glossari.....	38
7.2. Protocol original d'extracció del DNA.....	44
7.3. Entrevistes.....	47
7.3.1. Entrevista Francesc Piferrer.....	47
7.3.2. Entrevista Luciano Di Croce.....	55
7.3.3. Entrevista Juan A. Subirana.....	65
7.4. Annexos multimèdia.....	71

1.INTRODUCCIÓ:

Abans de començar a parlar sobre què és la enginyeria genètica i l'epigenètica, m'agradaria fer un petit preàmbul sobre aquest treball; del que tracta, quines són les seves pretensions, els motius que he tingut per a dur-lo a terme, etc.

Aquest treball, és una visió sobre la enginyeria genètica moderna i un dels seus processos més innovadors. En aquest treball, podrem apreciar un petit fragment del que és la enginyeria genètica i posteriorment una entrada amb més profunditat en el tema que ens ocupa.

Aquest treball, pretén ser una visió objectiva sobre la genètica moderna, però explicada en clau divulgativa, és a dir, posseeix tot el rigor científic possible però sense perdre la seva essència, és a dir, ser un treball assequible per un ampli públic.

He triat el tema d'aquest treball, degut a la meva fascinació pel camp de la genètica, les seves manifestacions i els seus processos. Però la genètica és mot àmplia, així que vaig decidir buscar branques d'aquestes que em semblessin interessants i que a la vegada, fossin un tema totalment desconegut per a mi, on trobo l'essència d'una feina de recerca: fer teu un coneixement que no posseeixes, és més, que no n'havies ni sentit a parlar.

A més a més, mentre que anava fent el treball, van anar apareixent periòdicament, les idees i conceptes de Lamarck, de qui jo, obertament, me'n declaro gran admirador, tant a nivell personal (fent front a una societat creacionista) com en els àmbits científics.

NOTA: Tots els elements marcats amb cursiva, són tecnicismes o estrangerismes, que es troben exposats en el glossari per ordre alfabètic. Altres elements tècnics, no es troben marcats en cursiva, degut a que són explicats en el mateix treball.

Pel que fa a les referències bibliogràfiques, no es troben esmentades en el text, degut a que el sistema de treball que he usat no he contemplat l'extracció directa de dades, sinó el processament i adequació de la informació.

1.1. HISTÒRIA:

Començarem aquest viatge a través del que coneixem o hem sentit a parlar, l'enginyeria genètica.

Podem dir que la enginyeria genètica, és el canvi en les característiques pròpies d'un ésser per part dels humans per a treure'n un profit (ja sigui la cura de malalties o la millora d'uns cultius). Aquest procés ens pot resultar relativament modern, però el concepte o idea és molt més antic del que ens pensem.

Coneixem, que aquest viatge, va ser iniciat per la civilització més antiga, els mesopotàmics. Ens situarem cap el 5000 a.C, en una terra fèrtil, entre dos grans rius, el Tigris i l'Èufrates. La principal font d'aliment per aquells temps, era l'agricultura i la ramaderia, tot i això no era tant eficient com ho és ara. Tot i així, els mesopotàmics, es van trobar un sistema per millorar periòdicament les seves collites i caps de bestiar; van deduir que si es guardaven els millors exemplars de cada "cicle", per a la reproducció o la sembra, el següent cicle, era de més bona qualitat. Així, van trobar un sistema que millorava quantiosament el seu nivell de vida i supervivència, i sense adonar-se'n, influïen en la genètica de les espècies domesticades per obtenir-ne un benefici.

Aquestes modificacions, van ser explotades durant molt de temps, van ser refinades i provades fins a obtenir diferents espècies o híbrids; un exemple d'això en són les vaques lleteres, la mula o la nectarina. A través d'aquets canvis influïts per les conductes humanes, la informació genètica de la gran majoria d'espècies d'éssers vius que coneixem han estat canviades, han interromput el que podríem anomenar com a selecció natural i ha estat canviada per la selecció artificial.

A partir d'aquest punt, van arribar a passar molts segles perquè es fes un progrés significatiu. No va ser fins a partir del segle XVII d.C. on es van fer avenços (juntament amb molts descobriments que va dur a terme la ciència, això venia donat per la rapidesa amb que avançava la tècnica):

- 1665, R.Hooke descobreix la cèl·lula vegetal i animal.
- 1831, R.Brown descobreix el nucli.
- 1860, G.Mendel escriu les seves observacions sobre les probabilitats i herències genètiques en vegetals.
- 1885, Virchow aporta la idea actual de la duplicació cel·lular (*Omnis cellula ex cellula*).

- 1902, Sutton i Boveri aporten la teoria en que la cèl·lula posseeix tota la informació necessària per la síntesi de la seva estructura, els control del seu funcionament i la capacitat de transmetre-ho als seus descendents.
- 1902, H.Spemann, postula que les cèl·lules no perden informació, sinó que la desactiven. A més, va ser el primer científic en provocar la formació d'un clon, al dividir amb un pèl, l'ou d'una salamandra.
- 1909, P.Levine, descobreix la *ribosa*.
- 1929, P.Levine, descobreix la *desoxiribosa*.
- 1941, A.Jost i C.Waddington, encunyen el terme enginyeria genètica (de forma més o menys paral·lela).
- 1953, Watson i Crick descobreixen el *DNA* i un de les seves formes, la doble hèlix. A més, C.Waddington, va encunyar el terme epigenètica, recobrat les idees clàssiques i lamarckianes.
- 1957, Meselson i Stahl, verifiquen la *hipòtesi semi conservadora* que va ser anunciada per Watson i Crick. A més Crick i Gamov donen la relació circular del DNA, dels *aminoàcids* i els proteïnes.
- 1966, M.Nirenberg, H.Mathaei i S.Ochoa, descobreixen el *codi genètic*.
- 1972, es va crear la primera molècula de *DNA recombinant* al laboratori.
- 1973, van tenir lloc els primers experiments de l'enginyeria genètica, en el què els gens d'una espècie són introduïts en l'organisme d'una altra i funcionen correctament.
- 1975, D.Nathans, W.Arber i H.O. Smith, van descobrir els *enzims de restricció*, fet que dóna pas a poder investigar molt més sobre el DNA.
- 1976 es va fundar a la Genetech, a EE.UU, la primera empresa d'enginyeria genètica del món.
- 1977, es va produir amb èxit una hormona humana en un bacteri.
- 1978, es va clonar el gen de la insulina humana
- 1980, la comunitat científica arriba a la conclusió que els éssers vius som la suma dels nostres gens.
- 1982, es va aconseguir crear el primer ratolí transgènic. I a més a més, inserint el gen de l'*hormona del creixement* de la rata en òvuls de rata fecundada.
- 1982, es produeix insulina utilitzant tècniques de DNA recombinat (insulina recombinada).
- 1986, K.Mullys s'inventa la tècnica del PCR, que permet replicar gens concrets ràpidament i en grans quantitats. A més, s'autoritzen les proves clíniques de la vacuna contra l'hepatitis B

obtinguda mitjançant l'enginyeria genètica.

·1990, primer tractament amb èxit mitjançant la teràpia gènica (trastorns immunològics, metabòlics, etc).

·1997, C.Venter Clona el primer mamífer, una ovella anomenada "Dolly".

·2000, (*Projecte Genoma Humà*) Apareix completament seqüenciat, el DNA humà, tot i això, falta concretar quins dels seus components són gens, quins són encebadors, etc.

1.2. ENGINYERIA GENÈTICA:

Així doncs, reprenent el tema anterior, l'enginyeria genètica és el canvi de les característiques genètiques d'un ésser per part dels humans per treure'n un profit. Els usos i les tècniques d'aquests processos, avui en dia, es troben molt extensos i tenen diverses tipologies: poden ajudar en l'àmbit mèdic, agrari, mediambiental, investigació i desenvolupament. Existeixen 3 tècniques àmpliament usades en l'enginyeria genètica:

·Tecnologia del DNA recombinat: Procés en el qual un segment de DNA o RNA, és trencat i posteriorment unit a una altra cadena de forma artificial.

·Seqüenciació del DNA : conjunt de processos bioquímics que permeten observar les seqüències de nucleòtids del DNA en ordre, per un posterior estudi dels gens i la seva disposició intercromosòmica i intracromosòmica (al 2000 va aparèixer seqüenciat el DNA humà, gràcies al Projecte Genoma Humà.).

·Reacció en Cadena de la polimerasa (PCR): Procés per poder obtenir un gran nombre de còpies d'un segment concret de DNA , partint d'una petita mostra.

1.3. EPIGENÈTICA:

Un cop ens hem endinsat en el món de la genètica i de l'enginyeria genètica, podem començar a tractar el tema principal, l'epigenètica o epigenèsi.

Per entendre el concepte, exposem un cas real: l'ésser humà i el ximpanzé (*pan troglodytes*). Aquestes dues espècies, comparteixen el 99% de la seva informació genètica o genoma però tot i així, com pot ser que aquest 1% ens diferencia tant dels nostres cosins primats? La resposta a això es troba en el 99% dels gens comuns. Amb els ximpanzés i compartim molts

gens, però s'ha comprovat, que alguns es troben “silenciats” o inactius, tant en els ximpanzés com en nosaltres. Això ens porta a fer-nos la pregunta; i com s'han pogut silenciar aquests gens? Encara més com aquest “silenciament” de gens pot passar a les generacions següents sense ser gaire alterat? La resposta a tot això és la epigenètica. Així doncs parlem d'epigenètica quan ens referim a fenòmens que no alteren la seqüència del DNA però sí que en varien la seva expressió.

Aquest nou món, va ser encunyat per C.Waddington (utilitzant els termes *epi* sobre, i genètica, fent referència als gens i les herències) a l'any 1953, usant teories i dilemes clàssics i algunes idees lamarckianes. Amb això, va arribar a anunciar relacions entre els gens i l'entorn que són produïdes pels organismes. No va ser fins més endavant quan es va postular que el DNA es idèntic (a excepció de mutacions) en totes les cèl·lules somàtiques eucariotes i que el DNA i les histones poden presentar partícules adherides a la seva paret. Aquest conjunt de partícules formen part del que anomenem, en part, codi epigenètic. El codi epigenètic, són les característiques heretables que no venen atribuïdes per la seqüència de bases nitrogenades del DNA; per exemple, les partícules adherides al DNA, un plegament específic d'aquest degut a histones modificades o un canvi en la manera de “lectura” d'un RNAm.

Com he dit abans, aquestes característiques no venen regulades pels mecanismes d'herència del DNA, però no obstant passen més o menys regularment a la descendència. Aquestes “peculiaritats” són causades per l' *ambióma* (l'ambient) o pel nostre mateix organisme i, posteriorment, són heretades. No obstant aquests processos presenten dues peculiaritats: són reversibles i solen tenir tendència a degenerar i atenuar la seva força.

2. EPIGENÈSI

L'epigenèsi, com ja hem comentat abans, són un conjunt de fenòmens heretables que modifiquen el nostre fenotip, sense alterar el nostre genotip.

Però, no ens quedem aquí, anem més lluny: Com funcionen aquests processos? Quan es duen a terme? Són processos naturals, artificials o les dues coses alhora? Un excés o un dèficit de processos epigenètics pot portar algun problema? Les conseqüències de les meves conductes, fetes al llarg de la meua vida, les passaré a la meua descendència? I si és així, fins quan els efectes es perpetuaran? És possible una manipulació de l'epigenètica de forma eficient avui en dia?

En breu ho veurem...

2.1. PROCESSOS EPIGENÈTICS:

Existeixen varis processos bàsics d'epigenèsi, aquests, són els més comuns: Metilació del DNA, acetilació d'histones, RNA no-codificant, "Imprinting" o empremta genètica, i infeccions per mitjà de prions.

2.1.1. Metilació del DNA: La metilació del DNA és un dels processos epigenètics més comuns, i el primer en ser descobert, l'any 1980. Aquest procés es troba en la majoria dels tipus d'eucariotes a excepció dels llevats. Per poder explicar aquest fenomen, cal apreciar una característica dels enllaços CpG de les cadenes de DNA (sobretot en mamífers); són enllaços inestables, per la qual cosa tenen tendència a captar partícules i annexionar-les. Aquest és el cas, dels metils (CH₃), que posseeixen les característiques idònies per annexionar-s'hi. Un cop annexionat, la molècula passa de ser una citosina a ser una 5-metilcitosina (degut a que s'annexiona al carboni 5 d'aquesta molècula). Aquest procés, pot ser donat tant per causes artificials o naturals; tot i això sempre hi intervindrà les anomenades DNA-metiltransferases o DNMT's (proteïnes encarregades d' inserir el grup metil). Per fer-nos una idea, entre el 70% i el 80% de les citosines d'un mamífer, es troben en estat de metilació (tot i que aquest índex pot variar exponencialment, depenent de quins processos s'hagin de dur a terme). Curiosament, aquest 70% o 80% de 5-metilcitosines, es troben compreses en les regions no

codificants i al transposons del DNA, però és estadísticament difícil, trobar una 5-metilcitosina en una àrea de gens actius.

A partir d'aquestes observacions, es va deduir que era responsable de la no-codificació d'un fragment de DNA. Aquest efecte, és degut a que el grup metil, impossibilita la unió entre l'pre-RNAm (en formació) i el DNA; per la qual cosa, impossibilita al gen, impeding tot el procés i la seva expressió.

Existeixen dos casos de metilació del DNA, depenent del seu origen i conseqüències:

·La metilació de manteniment: és aquella en que les DNMT's afegeixen el grup metil en la part oposada d'on el tenia el DNA mare. Aquest efecte, es produeix per mantenir el mateix patró de metilació en el moment de la divisió cel·lular, és a dir, mantenint inactiu un gens determinat a llarg del temps. Un exemple, en són els espermatozoides, que usen una metilació propera al 100%, per evitar l'expressió genètica, fins el moment posterior de la fecundació. Un altre exemple, en són els processos de diferenciació cel·lular, en que s'usen metilacions consecutives per "silenciar" els gens no operatius per a un tipus de cèl·lula determinat i tot i això, tenir la mateixa informació genètica.

·La metilació de novo: és aquella en què els grups metil, s'adhesionen en posicions aleatòries, i moltes vegades sense haver-hi una ordre en la divisió cel·lular anterior. Aquests processos solen ser els que solen ser causats per l'ambient i després, deriven en metilacions de manteniment. En aquest cas, un exemple vàlid, seria l'exposició a tòxics o medicaments que afavorissin la metilació.

2.1.2. Acetilació d'histones: Aquest procés va ser descobert l'any 1964 per V.Allfrey, però no va ser ratificat fins els 90 amb la intervenció de C. Davis Allis (que va descobrir l'enzim histona-acetiltransferasa, que s'encarrega d'inserir grups etil a determinats punts de les histones). L'acetilació d'histones és un procés bastant semblant a l'anterior, però, el canvi es produeix en les histones, no en el DNA; per la qual cosa, els canvis que es produeixen, solen estar relacionats amb el plegament del DNA al voltant d'aquests i la divisió cromosòmica. A més, el grup adherit és diferent (és un CH₂ enlloc d'un CH₃).

Els grups acetil, se solen annexonar a les *lisines* i *arginines*, degut a preferències bioquímiques. A més, aquests aminoàcids bàsics, es troben en grans quantitats, dins el complex de la histona, prop del 20%.

L'acetilació, es produeix en l'extrem N-terminal (o extrem amino, degut a que és l'extrem de l'aminoàcid lliure). El procés d'adhesió del grup acetil a l'extrem N-terminal, és controlat per l'enzim histona-acetiltransferasa (HAT), ja esmentat anteriorment. Aquest procés d'acetilació i desacetilació, juntament amb la capacitat que tenen les histones per internar-se en el DNA, forma un repressor de la transcripció relativament usual. És usual, pel fet que té la capacitat de canviar el seu grau de repressió. Quan la histona es troba en estat no acetilat, la repressió en els processos de transcripció és total o gairebé total, fet que interromp la formació de proteïnes. En canvi, quan la histona es troba acetilada, el procés de repressió queda parcialment alliberat, fet que provoca una menor repressió de la transcripció (les histones acetilades són repressores menors), i permet la síntesi de proteïnes.

Els sistemes d'acetilació i desacetilació (en que intervé l'enzim histona-desacetilasa, HDAC), usen les propietats estabilitzadores del grup acetil per silenciar la transcripció; quan la histona es troba desacetilada, la unió entre ella i el DNA és estable, cosa que fa impossible la transcripció. En canvi, quan es troba acetilada, la unió entre la histona i el DNA es desestabilitza i permet que es produeixi la transcripció.

En les histones, també és pot produir el procés de metilació (menys corrent que la acetilació), amb resultats similars. També és possible veure histones amb un procés de fosforilació.

2.1.3. RNA no-codificant: Els *RNA*, són part fonamental de la majoria de processos genètics. Coneixem l' *RNA_m*, el *preRNA_m*, l' *RNA_t*, etc. Però, què són els RNA no-codificants (ncRNA) ? Els RNA no-codificants, són sèries de nucleòtids, de més o menys envergadura, que no codifiquen per cap proteïna, ni tampoc, solen formar part de la seva síntesi. N' existeixen molts tipus, però el que ens interessa, és el sRNA ("small RNA"). El sRNA, és de petites dimensions i té la funció de causar el silenciament de la traducció en proteïnes, provocant una sèrie d'interferències.

Al seu torn, de sRNA que intervinguin en el silenciament dels gens, hi intervenen 3 subdivisions:

- Els siRNA (“small interference RNA”): RNA monocatenari interferent de 20 a 25 nucleòtids de longitud, específic per la seqüència del seu RNAm diana. És d’origen bacterià.
- Els miRNA (“microRNA”): RNA monocatenari interferent de 21 a 25 nucleòtids de longitud, també és específic per la seqüència del seu RNAm diana, però usant el sistema RNAi. Es troba en diversos organismes, entre ells, els humans.
- Els piRNA (sRNA que interaccionen amb els anomenats PIWI): RNA monocatenari interferent de 24 a 30 nucleòtids de longitud, que impedeix l’expansió o canvi de lloc dels transposons. A diferència que la resta de sRNA, n’existeixen un nombre finit, ja que només es produeixen en zones calentes del genoma. En el procés de l’espermatogènesi, es troben peculiarment actius degut a la seva funció protectora davant els transposons.

La majoria dels sRNA tenen la peculiaritat d’unir-se amb una subfamília de proteïnes anomenada “Argonauta”, les qual tenen la capacitat de tallar bioquímicament el RNAm. Això, unit a l’especificat de nucleòtids del sRNA, forma un complex efectiu i eficient. A part d’unir-se a la subfamília *Argonauta*, també ho poden fer a la subfamília *PIWI*.

El funcionament dels tres tipus és relativament similar; el sRNA, és produït a partir d’un filament de DNA i posteriorment processat pels enzims *RNAases III*, que insereixen el centre actiu (una proteïna Ago1, Ago2 o Ago3, en els mamífers). Un cop inserit el grup Argonauta, el complex RISC (complex de silenciament format per Argonauta més sRNA), ja és format i a l’espera del seu funcionament (quan trobi el seu RNAm diana pertinent). Un cop adherits al RNAm, aquests ja es troben inservibles per a la transcripció.

2.1.4. Infecció per prions: Els *prions* o PrP, són agents infecciosos, formats per proteïnes i glicoproteïnes. No obstant, la majoria d’éssers vius, fins hi tot els humans, tenen prions en estat estable (benigne), que duen a terme diferents funcions dins la cèl·lula, sobretot a les neurones. Tot i això per un procés que encara desconeixem, passen d’estar estables, a una postura invasora, formen el que diríem la soca patògen d’aquests. Existeixen diverses hipòtesis sobre la formació dels prions, la més acceptada, però, consisteix en què les cèl·lules susceptibles, porten un gen que permet la formació de prions o la modificació d’alguns altres

sistema proteic per formar prions, segurament per mitjà d'algun procés catalític. L'activació d'aquest gen es produiria per una infecció d'aquests patògens.

Per aquesta peculiaritat, van començar a ser estudiats per l'epigenètica (n'és un cas prometedor).

Més endavant, entre el 1961 i el 1971, es va descobrir, que els prions fúngics, tenien grans faccions epigenètiques, degut a que el fenotip infecció pot ser transmès hereditàriament, sense que repercuteixi en el genoma. A més, alguns (sobre tot els llevats) tenen un efecte fenotípic, que deixa inactives algunes proteïnes, com la Sub35, que la seva manca, provoca un augment de la taxa de saltar-se el codons d'aturada dels ribosomes, cosa que acaba suposant una supressió d'algunes mutacions en altres gens. Aquest últim efecte, és la raó primordial, que les infeccions de prions, es considerin que tenen factors epigenètics (juntament amb la seva herència específica).

2.1.5. Imprinting: O empremta genètica, és un sistema d'herència genètica diferent de la *genètica clàssica* (o *mendeliana*), en que canvia l'expressió dels gens de forma específica, dependent de l'origen parental; per tant, en si mateix, no és un mecanisme epigenètic, sinó un procés. El mecanisme que sol usar, consisteix en silenciar un dels *al·lells* procedents dels progenitors, usant algun dels mecanismes epigenètics anteriors; la metilació del DNA, és la més comuna.

Els éssers *diploides*, les *cèl·lules somàtiques*, tenen 2 al·lells diferents per cada caràcter (cadascun provinent d'un progenitor diferent en el moment de la fecundació). Normalment, l'expressió dels al·lells (en els gens autosòmics) es sol expressar al uníson (codominància), no obstant, una petitíssima proporció (al voltant d'un 2 %), experimenta un fenomen d'impressió sobre un dels dos al·lells, el que representa, que el caràcter depèn de la informació d'un sol progenitor. En aquests moments, el seu funcionament és primordialment *haploide*, el que provoca que la cèl·lula sigui dèbil davant de mutacions recessives (essent diploide, gaudeix de certa protecció). El gen amb empremta, es comporta de manera diferent si és d'origen femení o masculí.

Aquest procés, es produeix, com a resposta a la no codominància, i a la no relació dominant/recessiva que solen tenir els gens; és a dir, un dels al·lells, és silenciat per evitar problemes de traducció (ja que l'acció de les dues informacions a la vegada, podrien provocar danys estructurals).

Els processos d'empremta, a part de ser heretats (cosa que guarda un gran relació amb l'herència epigenètica transgeneracional), també es pot produir “de novo” en una generació (degut a moltes causes, però sobretot, causes ambientals), la qual deixaria una nova empremta en un altre gen.

Recentment, s'estudien les diverses malalties generades per problemes en aquest sistema, com la *síndrome de Prader-Willi* i la *síndrome d'Angelman*.

A més, s'estan cursant diverses investigacions (en diferents mamífers; ratolins, ximpanzés, humans ,etc) sobre la relació entre l'epigenètica en general (sobretot l'empremta genètica) i estats d'estrès.

3. EFECTES TRANSGENERACIONALS DE L'EPIGENÈTICA:

Definim com a efectes transgeneracionals de l'epigenètica, tot aquell conjunt de processos que engloben tota la determinació no genètica de fenotip. Aquest concepte pot semblar bastant complicat, però és molt possible que ja n'haguéssim sentit a parlar sota el nom d'herència no mendeliana (ja que no es troba sota les lleis o explicacions de Mendel, en genètica clàssica).

Dins d'aquest camp, es poden transmetre caràcters a través de les generacions, que siguin tant físics com de caire psicològic i de comportament. No obstant, encara no coneixem del tot tots els mecanismes que permeten aquesta herència, però es creu que ha d'estar íntimament relacionat amb les gàmetes hi han de ser involucrats.

En l'actualitat, es creu que la millor manera d'extreure'n una conclusió és a través de la biologia molecular.

Aquí, es recullen els casos més típics o explicatius, que permeten una bona comprensió dels mecanismes transgeneracionals i, a partir de l'explicació d'aquests, es pot generalitzar per la majoria de casos semblants.

3.1. INTRODUCCIÓ:

Per començar es podria fer un aclariment entre efectes transgeneracionals epigenètics i herència transgeneracional epigenètica, ja que a llarg del temps s'ha usat el mateix terme per definir coses diferents (en els últims 50 anys, el significat ha variat).

En "efectes transgeneracionals epigenètics", s'usa el terme epigenètica en el seu sentit més ampli, és a dir, en el sentit d'incloure els processos que es produeixen per assolir una determinació del fenotip no genètica (el sentit clàssic, l'encunyat per C. Waddington). El sentit a que es referia, anava més orientat cap a la diferenciació i el desenvolupament (ja que era un biòleg del desenvolupament, encara que amb poc interès pel que fa a efectes transgeneracionals). No obstant, el temps ha demostrat que, els esdeveniments transgeneracionals són importants, per exemple en biologia evolutiva (que en els últims segles ha estudiat la determinació transgeneracional no genètica del fenotip).

Això ha format nous conceptes, com ara: el *soft inheritance*, l'*herència no mendeliana*, els *efectes parentals* i la *programació fetal* entre molts d'altres que sortirà en aquest treball. Encara que siguin mecanismes molt diferents entre ells, molt complexos (fins i tot, no els podem arribar a entendre), tots tenen en comú, que són una transferència d'informació no genètica d'una generació a una altra.

Pel que fa a l'herència transgeneracional epigenètica, podria dir que es refereix a tots els canvis (*mitòtics* i/o *meiòtics*) en la funció dels gens que no pot ser explicada pel canvi de la seqüència de bases nitrogenades. Aquesta definició es troba àmpliament acceptada, sobretot en l'àmbit de la biologia molecular.

Actualment, podem considerar que hem après quelcom dels mecanismes epigenètics, com ara la metilació de bases o la modificació de proteïnes empaquetadores del DNA, tot i que no són res més que les bases de la qüestió en general. A més, amb molts estudis recents, s'ha ratificat el que ja enuncia la teoria, l'ambienta, modifica el nostre estat epigenètic.

No obstant, no és tan senzill com aparenta la transmissió intergeneracional de caràcters epigenètics, existeixen molts mecanismes per regular-la, generalment al voltant de l'etapa de fetus (i evitar estats anormals d'aquests, que podrien provocar nombroses deficiències). Aquests mecanismes, han evolucionat (recordant que qualsevol evolució és donada per mutacions pre-adaptatives i una posterior selecció natural) per "esborrar" les marques epigenètiques (com les *germlines*, la reprogramació somàtica de la metilació del DNA i de les proteïnes de la *cromatina*). Encara que moltes d'aquestes marques estiguin "esborrades", sabem que en algun *loci* (plural de *locus*), les marques no "s'esborren".

El mecanisme que nosaltres hem vist que fa referència a aquest procés és l'"Imprinting" (en mamífers). Aquest procés, no obstant, té una gran resistència a la reprogramació, per tant, pot ser considerat com a desenvolupament normal i independent de les marques de l'ambienta. Ara parlarem de la resistència a la reprogramació transgeneracional epigenètica i si s'estableixen marques epigenètiques com a resposta de l'acció de l'ambienta.

Abans de prosseguir, cal aclarir un altre malentès acadèmic referent als efectes epigenètics transgeneracionals: els efectes epigenètics transgeneracionals, no es donen exclusivament per efecte de l'herència transgeneracional epigenètica (o herència epigenètica gamètica).

3.2. SOFT INHERITANCE:

L'herència mendeliana, és la base de trets estables i l'evolució d'aquests al llarg del temps a través de mutacions genètiques (a les gàmetes) excepcionals, selecció natural i derivació genètica. La lenta reacció d'aquesta *hard inheritance* no és la ideal perquè un organisme o una població pugui prosperar en un entorn dinàmic i canviant com és el que existeix. Un altre sistema, més dinàmic, flexible, en què les modificacions de la següents generacions les adapti al medi futur (Sí, efectivament, porta a un distanciament del pensament darwinian més purista a un pensament més aviat lamarckià). Ernst Mayr (1904-2005), va proposar per primera vegada el concepte de *soft inheritance*, per descriure aquest sistema d'herència "utòpic". La *soft inheritance*, explica més eficientment que la *hard inheritance* l'adaptació de les espècies a les fluctuacions de l'alimentació, la malaltia, la depredació, etc les quals són pràcticament impredecibles i solen durar més d'una generació.

La *soft inheritance*, és adaptativa (dins el marc de la biologia evolutiva), és a dir, que comporta un benefici per l'espècie que la posseeixi. La pròpia capacitat que tenen els mecanismes epigenètics, per perpetuar (a través de les generacions), patrons d'expressió genètica relativament estables, i de mantenir la capacitat de reaccionar davant de les marques del medi, els fa ideals per aquest tipus d'herència.

Però, existeix un problema, un obstacle, pel sistema, la resituació de les marques epigenètiques a través de les generacions.

Encara que l'existència de la *soft inheritance* és un fet àmpliament acceptat (i existeixen nombrosos estudis que ho aproven), però l'opinió científica, encara recela de la seva existència, degut a la seva "polèmica". Aquesta polèmica, es deu, a que en la *soft inheritance* s'usen o es troben molts rastres de les idees o preceptes evolucionistes de Jean-Baptist Lamarck (1744-1829); llurs treballs, anunciaven idees pre darwinianes dels mecanismes de transformació de les espècies a través del temps; usant l'herència de caràcters adquirits durant la vida d'un organisme (recordem les lleis de la complexitat, de l'ús i el desús i de la pròpia herència dels caràcters adquirits). Segons les seves idees, el propi medi a què estava exposat, i les accions directes de l'organisme, contribuïen activament en la transformació (la qual era heretada pels seus descendents). La teoria lamarckiana, però, posseeix un error gravíssim: la no distinció entre les *línies germinals* i *somàtiques* (correcció aportada al S.XIX per Weismann). Així doncs, arribaríem a una "paradoxa": Com podria l'ambient, induir canvis epigenètics somàtics en llinatges, i ser transmesos a la *germline* (o línia germinal) ? (NOTA:

el moment en que es separen les línies germinals dels teixits somàtics, canvia en cada espècie). En el cas dels mamífers (on es troba el gènere humà), les *cèl·lules germinals primordials* (PGC), deriven en l'*epiblast* i es presenten, després, en la *gastrulació*; el que es tradueix com a “poc temps” per a dur a terme alteracions epigenètiques incloses a les línies germinals. En les plantes, aquest període és molt més lax, el que permet una clara superioritat sobre els mamífers, davant la possibilitat de patir una *soft inheritance*.

Cal, però advertir, que en aquest treball i els seus homòlegs, es tenen en compte les idees Lamarckianes, no tots els seus preceptes; per tant, es podran observar elements mendelians, darwinians i lamarckians.

3.2.1. Efectes parentals adaptatius en mamífers (no humans):

Existeixen diversos casos entre els vertebrats i sobretot en els mamífers. L'exemple més il·lustratiu (i potser més representatiu) és l'adaptació transgeneracional epigenètica dels ratolins comuns (*mus musculus*) envers estats d'estrès. Aquesta resposta defensiva (per a la supervivència de la següent generació) és tramesa per la mare a la descendència.

En períodes de temps en que augmenta l'estrès en el medi, com quan hi ha un gran nombre de depredadors (en períodes de temps prolongat per l'esperança de vida de l'espècie) hi ha menys temps per que la progenitora els cuidi després del part, llepant-los, evitant problemes o deficiències en els primers moments de vida de l'ésser, com la ceguera transitòria.

Baixos nivells d'aquestes cures específiques en les primeres setmanes de vida, produeix que les cries siguin més temoroses i receloses del seu entorn. Segons la teoria, és aquest estat, el que permet que les cries tinguin un estat d'alerta semi permanent, més bo que el dels seus progenitors, el que els hi pot permetre tenir més possibilitats de sobreviure, en contraposició amb les cries amb una cura més específica en els seus estats primerencs de vida.

Aquests trets adquirits en les etapes joves de l'organisme, les arrossegarà tota la seva existència, i també les transmetrà a la seva descendència, perpetuant la tendència.

Això es pot corroborar si efectuem la següent prova o experiment:

Tenim dues progenitores (A i B). La progenitora A té la tendència de donar gran atenció a les seves cries, mentre que la B té la tendència contrària. Les dos femelles tenen descendència. Si intercanviem una cria d'A amb una cria de B (Ab i Ba respectivament) poc després del part,

les cries, després del període adopten el tipus de tendència a l'estrès que les seves mares adoptives.

Després d'aquest petit experiment, podem concloure, que efectivament, l'efecte matern en l'adaptació és un procés epigenètic (en un sentit ampli), però no gamètic.

Un element a destacar en aquest tema, és que s'han descobert múltiples aspectes del mecanisme, cosa que ha demostrat que és un procés realment complex que involucra diversos elements, com la conducta, la fisiologia, els elements cel·lulars i diversos esdeveniments a nivell molecular.

Per tant, les modificacions epigenètiques dels elements que regulen alguns gens rellevants (per aquest cas) han estat detectats i identificats.

Les respostes a l'estrès en els mamífers, estan intervingudes pel sistema o eix *hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA), que es troba conformat per l' hipotàlem, la pituitària i la glàndula adrenal i hi està regulat per les hormones glucocorticoides.

La disminució d'aquesta temença per les altes cures de la mare en els ratolins és el resultat de l' increment del nombre de receptors de *glucocorticoides* i *serotonina* (monoamina neurotransmissora) en l' hipocamp i el Sistema Nerviós Central (respectivament).

L'augment del nivell serotoninic (nivell de serotonines), comporta l'activació del *cAMP* (adenosina monofosfat cíclica) i un augment de l'expressió dels factors de transcripció dels factors de creixement nerviós, factor induït per la proteïna A (NGFI-A). L'augment de la unió entre NGFI-A i el gen promotor del receptor glucocorticoidal (GR) és associat amb la metilació del gen del DNA, l'acetilació de les histones i l'augmenten de l'expressió dels GR. Aquest augment de l'expressió per la seva banda, forma més GR a l' *hipocamp*. Les marques epigenètiques apareixen per mantenir l'estat de l'expressió dels GR per la resta de la vida del ratolí (evitant trastorns).

En resum, el comportament de la mare envers la cria (la seva cura i protecció), ha fet que aquesta última segregués determinades substàncies, que en cadena, han canviat i fixat epigenèticament el seu comportament per la resta de la seva vida.

Per provar dit experiment, s'han inoculat hormones glucocorticoides en els primers dies abans (al úter) o després del naixement, de mares que no presten molta atenció a les seves cries. El resultat obtingut va ser que els ratolins que en teoria havien d'estar adaptats a un medi més hostil no ho estiguessin.

No només l'augment de depredadors fa que es produeixin adaptacions al medi, sinó que un altre factor molt important, és la disponibilitat d'aliment, com succeeix en el gènere humà (programació fetal).

3.2.3. Programació fetal en el gènere humà:

La programació fetal és un terme usat de forma molt extensa per descriure amplis efectes permanents en el medi experimentats per fetus i nounats.

D. Barker, va informar que el pes del nadó era inversament proporcional al risc (en la etapa adulta) d'hipertensió, malalties cardiovasculars i diabetis de tipus 2 (quan menys pes a l'hora del naixement, més possibilitats té de patir en l'etapa adulta, algun d'aquests trastorns). Aquest efecte sembla accentuar-se si l'individu està ben alimentat després del naixement, degut a l'efecte advers que s'esdevé de mantenir una dieta massa rica energèticament del que el teu metabolisme està preparat per dur a terme (en aquest cas, la modificació epigenètica, modifica l'expressió de metabolisme de l'individu).

Degut a aquestes observacions, Barker diu que els efectes adversos que succeeixen el fetus quan encara és dintre l'úter, indueixen elements positius en el fetus.

Les respostes (metabòliques, cel·lulars i psicològiques) es creu que representen una adaptació produïda pel fetus, per preparar-se per la vida post natal.

Aquesta hipòtesi és coneguda com *the thrifty phenotype hypothesis* o l'hipòtesis del fenotip estalviador. Segons dita hipòtesis, l'augment a la resistència dels nivells d'insulina en els descendents de mares que haguessin patit fam (com les mares embarassades francobelgues i russes durant la Segona Guerra Mundial o les mares embarassades d'origen jueu en l'època de l'holocaust) enlloc de ser una conseqüència d'un ambient amb poc recursos, és en realitat, una resposta defensiva del fetus per aconseguir certa avantatge en el futur (i tenir més possibilitats de sobreviure).

Que un organisme, posseeixi una resistència a la insulina, provoca, una major conservació de l'energia i una reducció del creixement somàtic (traduït en deficiències de l'altura, aspecte raquític, etc), per permetre a la descendència una millor capacitat de sobreviure davant d'un entorn amb manca d'aliment. No obstant, aquest efecte és negatiu, quan les concentracions d'àcids grassos (element principal dels lípids o greixos), insulina i glucosa en el plasma sanguini esdevenen elevades, a causa d'una alimentació opulent. Aquesta hipòtesi, és

argumentada per proves fetes als descendents de les mares embarassades que van patir gran períodes de fam, com l' *hivern de la fam holandesa* (1944-1945) i el setge de Leningrad (1941-44).

Un element curiós del cas és que els descendents del primer cas, si abans de néixer estaven lleugerament mal nodrits, van donar lloc (en l'etapa adulta) a persones amb intolerància a la glucosa; cosa que no va succeir en el segon camp d'estudi.

Aquest sistema de defensa, però, només va representar una utilitat a la ciutat de Leningrad, degut a què, a diferència d'Holanda, la fam va durar molt de temps a posteriori.

A part de les teories de D. Barker, no és segur si els efectes post natalis d'embrions mal nodrits va ser o una adaptació o una anomalia en el creixement.

La programació fetal humana, a part de poder ser feta a través d'una generació, també es pot donar a través de múltiples generacions.

Aquest nou concepte, ha estat, i encara és extremadament difícil de rastrejar i identificar, degut a que els registres fenotípics, a través de diverses generacions, no s'han recopilat, i més a més, hi ha diversos factors genètics i ambientals que duen a la confusió. Per aquesta raó existeixen pocs treballs d'aquest àmbit. Aquest va ser el cas de l'estudi dels efectes de la fam holandesa, fet per Barker, en que tot i que va aconseguir dades suficients per l'estudi, va acabar desestimant-les (degut a la dificultat per mesurar el pes del fetus ja que es mesurava de forma indirecte, i en aquell moment, el mètode era deficient).

Altres treballs, han demostrat que l'alimentació d'una persona pot arribar a influir en el fenotip de la segona generació posterior (els néts). Existeixen grans registres d'això en una població sueca (Överkalix) que relaciona l'augment o disminució d'aliments amb la mortalitat i el risc de malalties.

3.3. EFECTES EPIGENÈTICS TRANSGENERACIONALS NO ADAPTATIUS:

Fins ara, els diferents exemples que s'han donat sobre epigenètica transgeneracional, tenen, com a factor comú, el concepte de resposta adaptativa al medi i generalment, els estudis, portaven una gran càrrega de la psicologia del comportament i biologia evolutiva). Existeixen molts altres exemples que no impliquen a la força l'aparició del concepte adaptació, com

l'herència transgeneracional gamètica d'un estat epigenètic, d'un *transgen* o *al·lels* paramutats.

En la majoria dels casos, el fenotip heretat, sol ser perjudicial per a l'organisme receptor. Realment, desconeixem moltes coses d'aquest camp.

Un altre fet interessant, és que la majoria d'aquests efectes, són degradatius, és a dir, que amb el pas de les generacions, a part de diluir-se la mutació (com en l'herència mendeliana) la població, també perd eficàcia, fins que arriba un punt en que el procés és invertit. Això és degut a que la característica principal de qualsevol canvi epigenètic, és la seva temporalitat.

3.3.1. En mamífers (no humans):

Els efectes transgeneracionals no adaptatius (en mamífers) són els casos més nombrosos i clars del tema; degut a què socialment són més senzills d'entendre.

Existeixen diverses vies en que es poden dur a terme, aquestes són les més senzilles:

L'acció de transgens i anàlisi comparativa d'epial·lels estables: En el cas de *mus musculus*, s'ha comprovat que les úniques diferències fenotípiques entre dos individus idèntics (genotípicament idèntics), són els nivells de metilació dels seus epial·lels.

Molts d'aquests al·lels han estat descoberts i catalogats, com els al·lels que modifiquen el color del pelatge de *mus musculus* (Avy i AxinFu), encara que siguin gens lligats. Aquests canvis en "l'aspecte" del pèl, són controlats pels nivells de metilació dels al·lels. Aquests canvis, podríem dir que posseeixen una certa "memòria" que els permet transmetre aquest caràcter a través del seu llinatge.

La memòria transgeneracional d'aquests estats epigenètics, implica l'herència gamètica epigenètica i pel que s'ha observat la marca transmesa no és la metilació de bases.

Pel que fa a l'acció dels transgens, el mecanisme que usa per produir el canvi és l'empremta genètica (a diferència dels epial·lels, que usen el sistema de nivells de metilació). En els mamífers, més d'un centenar de gens (heretats dels pares) són regulats per l'empremta genòmica.

Se sap que els transgens tenen característiques transgeneracionals, pel fet que es donen "irregularitats" en la mecànica dels processos d'empremta genètica (és a dir, gens, que per bona compatibilitat no haurien de ser metilats, acaben per ser-ho).

La naturalesa d'aquestes "irregularitats" segueix molt incerta; és una àrea d'estudi amb poc desenvolupament.

·La resposta davant una radiació ionitzant lleu o moderada: S'ha observat que la irradiació d'elements ionitzants (generalment raigs X) de forma lleu o moderada (si fos més intensa provocaria la mort del subjecte) provoca un augment de l'índex de possibles mutacions en la descendència del subjecte, el que ens porta a pensar que d'alguna manera aquesta propensió al canvi és "recordada" a través de les generacions però sense modificació expressa dels gens; el que ens porta a pensar (de forma indirecte) que ha de ser un procés d'herència de epigenètica transgeneracional.

Tot i així, com en el cas anterior, l'epigenètica i la biologia molecular, encara són ciències massa joves i inexplorades, com per poder treure conclusions d'això, per tant, com funcionen aquests mecanismes d'herència encara segueixen poc clars.

·L'exposició materna a productes químics: L'exposició de productes químics (com ara agents cancerígens, elements endocrins, toxines, etc) durant la gestació, pot produir diversos efectes en el camp de la genètica i de l'epigenètica a través de les generacions.

Existeixen varies substàncies químiques que poden induir efectes fenotípics en generacions futures. Algunes exemples en són: l'aloxà, el ciclofosfamida, l'ortoaminoasotoluol, el benzopirè, el dietilestilbestrol i vinclozolina.

La gran majoria de mecanismes que ho fan possible, es desconeixen, tot i això, tampoc podem descartar que es tractin de l'herència de lesions genètiques.

S'han dut a terme una sèrie d'experiments amb *mus musculus* i la vinclozolina (un fungicida), en que després de la exposició durant el procés de determinació sexual, causa una sèrie d'anomalies en els descendents. S'ha pogut comprovar que els efectes, perduren per línia masculina durant 3 generacions com a mínim. A això, si afegim que la proporció dels mascles afectats era de 9 de cada 10 i que en les línies femenines hi havia absència total dels efectes, suscita que es tracti d'un fenomen d'herència epigenètica gamètica.

Aquest conjunt de característiques, van poder ser descobertes, degut a l'alt nivell de metilació del DNA i l'observació d'estranyos patrons de metilació (va aparèixer un patró anòmal de metilació, molt diferent dels marges esperats) que posseïen els espermatozoides afectats pel fungicida van ser heretats pels descendents d'aquests.

No obstant, tot i que el cas va ser estudiat a fons, encara queden diversos interrogants: com és que les modificacions passaven a través de les línies femenines sense produir-se cap canvi?

Els canvis radicals en el patró de metilació, com es van poder arribar a produir? I aquests canvis epigenètics, podrien arribar a esdevenir canvis en els cromosomes?

3.3.2 En humans:

La gran majoria dels casos clínics que s'han donat de l'herència epigenètica transgeneracional, tenen a veure amb l'ús de fàrmacs.

Aquest camp, és un dels més estudiats, degut a l'incidència directe que suposa pel gènere humà.

Un exemple n'és l'estudi fet amb l'estrògen sintètic (DES) que s'usa per prevenir els avortaments involuntaris en dones embarassades.

Les dones que han estat exposades a aquest fàrmac, tenen més possibilitats de patir un adenocarcinoma vaginal (càncer de vagina).

Una sèrie d'experiments amb animals, va demostrar que la segona generació, efectivament té més percentatge de possibilitats de patir aquesta malaltia. Això, és degut a que DES, produeix un gran nombre de canvis en l'expressió gènica i una sèrie de metilacions del DNA.

Tot i això, aquest fet pot ser explicat per altres vies a part de l'epigenètica transgeneracional.

En aquest cas, el DES, pot provocar danys estructurals greus en el DNA, de manera que l'efecte transgeneracional, pot venir induït pels tumors i per tant no es tractaria d'epigenètica.

Altres exemples, són els relacionats amb el càncer, que ens aporten grans quantitat de informació.

Un exemple, n'és el d'un individu amb càncer colorectal sense poliposi. El subjecte, presentava una metilació anòmala del DNA i el silenciament d'un gen supressor de tumors. Posteriorment, es va identificar la regió en qüestió i es va comparar amb la dels germans del subjecte (tots sans). La regió que el subjecte tenia metilada, no estava metilada en els seus germans.

Gràcies a això, es posseeixen arguments a favor de diferenciar la mutació de l'epimutació (existeix una teoria que diu que l'epimutació, no és res més que una conseqüència d'una mutació).

En resum, tot i que cada vegada, es té un coneixement més gran sobre els efectes transgeneracionals de l'epigenètica (proves moleculars, dades d'observació i anàlisi, etc); no es té tanta informació sobre l'herència dels dit caràcters esmentats.

No obstant, les noves tecnologies i l'interès creixent que suscita aquesta ciència, permet aventurar-nos a pensar, que en un futur breu, hi podrem tenir accés.

4.PRÀCTIQUES

Aquest treball, consta d'una part pràctica, en la qual es troben tres entrevistes/enquestes, realitzades a diverses personalitats de l'àmbit científic i tècnic, i una pràctica/tutoria al laboratori d'Ictiologia genètica de la UdG (Universitat de Girona) degut a que sóc beneficiari d'una de les beques Botet i Sisó 2010 de la UdG.

En aquesta part del treball es pretén aprendre els procediments bàsics de qualsevol laboratori de genètica, una sèrie d'orientacions per part del personal de la UdG i en les entrevistes es pretén descobrir l'existència, les tasques i les opinions de diferents científics de diferents àmbits (relacionats amb aquest treball).

Primerament, vaig dur a terme, des del més d'abril fins al octubre, una sèrie de tutories a la UdG amb el Dr. Jordi Viñas (departament d'Ictiologia genètica), el qual em va orientar sobre les possibilitats de les meves idees i l'aportació de molts conceptes nous. Un d'aquests conceptes va ser l'epigenètica. A partir d'aquell moment, es van dur a terme una sèrie de trobades per concretar el tema (fins arribar als efectes transgeneracionals de l'epigenètica) degut a què l'epigenètica és una ciència molt àmplia. A més a més de l'aportació de gran quantitat de material bibliogràfic i articles de distribució única entre universitats, vaig poder dur a terme unes sessions pràctiques al laboratori d'Ictiologia genètica.

Aquestes sessions pràctiques van ser portades a terme al mes de octubre (dies 13 i 14) i unes sessions posteriors que sortiran del termini d'aquest treball (mes de desembre).

L'objectiu d'aquestes pràctiques, consistien en l'aprenentatge dels protocols bàsics de qualsevol laboratori genètic (seguretat, contaminació de mostres, etc) i els processos bàsics de qualsevol laboratori (fixació de mostres).

En aquest cas, els protocols i processos bàsics, estaven enfocats, cap a l'extracció del DNA d'una mostra conservada en cloroform o formol (un dels processos més bàsics d'un laboratori de genètica, degut a que serveix per proporcionar mostres per a qualsevol tipus de prova o estudi que es vulgui fer sobre el DNA).

En aquesta pràctica, l'objectiu era extreure i fixar el DNA de 12 mostres de l'espècie *Auxis Rochei* (comunament anomenada melva) i permetre la seva conservació indefinida a -20°C pel seu estudi posterior. Aquesta pràctica forma part d'una investigació en curs, conjunta entre al UdG i centres diversos de Mèxic, Turquia i Equador; per determinar la distribució i quantitat del gen estudiat d' *Auxis Rochei*, en els diversos mars (*genètica de poblacions*).

La pràctica es divideix en 2 dies (degut a que existeix un pas intermedi que impossibilita fer el procediment en un sol dia) i explica detalladament cada pas que es fa (degut a que és una modificació del protocol original) per obtenir les 12 mostres.

En el protocol, també es troba implícit, els procediments de protecció de mostres, reactius i molts termes de seguretat al laboratori.

He realitzat diverses fotografies del procés, per il·lustrar el material utilitzat (es troben just després del protocol modificat d'extracció del DNA d' *Auxis Rochei*).

El protocol original, es troba a l'Annex (Pàgina 44).

EXTRACCIÓ TOTAL DEL DNA D'AUXIS ROCHEI (PRÀCTIQUES)

(protocol pel fenol i cloroform)

Material usat:

- Eppendorfs (1'5mL) més el seu suport pertinent.
- Pinces.
- Bisturí.
- 2 vasos de precipitats.
- Placa de treball.
- Aigua destil·lada.
- Alcohol etílic.
- Micropipetes de 20µL, 100µL i 200µL més puntes intercanviables conseqüents.
- Paper absorbent.
- “Timer”.

Aparells de laboratoris:

- VORTEMP.
- Vitrina de gasos.
- Centrifugadora.
- Estufa.

Reactius i mostres:

- TENS buffer (lys buffer) (solució tampó) (preparat).
- Proteinasa K (10mg/ml a -20°C) (degradador de proteïnes però no del DNA que és capaç de degradar-se ell mateix).
- 6 mostres de *Auxis Rochei* (estat larvari), melva.
- Fenol a 25M
- Solució Cloroform i Alcohol Isoamyl 25 M (preparat).
- Etanol 100% a -20°C.
- Etanol 70% a -20°C.
- Aigua estèril.

PROCEDIMENTS:

DIA 1:

1. Primerament, seguirem el protocol de seguretat de manipulació, usant bata blanca, pantalons llargs, sabata tancada i guants de làtex.
2. Anem a buscar les mostres marcades (en aquest cas les CACO1 St.42, conservades en formol) i netegem les pinces, bisturí i placa de treball usant primer l'alcohol etílic i després l'aigua (els vasos són per netejar el bisturí i les pinces) i després ho assequem amb el paper.
3. Agafem 12 eppendorfs i els retolem amb el nom de l'espècie i el número identificador: 1a, 1b, 2a, 2b ...6a, 6b; i els desem en el suport.
4. Afegim 200µL de TENS buffer a cada eppendorf amb la micropipeta de 200 (és important evitar que entri aire dins la pipeta).
5. Seccionem cada mostra (de la melva) en cap i tronc (dins la placa de treball), i col·loquem el cap en els eppendorfs "a" i les cues en les "b", respectant el número de mostra (és a dir, en 1a anirà el cap de la mostra 1 i a 1b la cua de la mostra 1).

Netegem el material després de cada mostra, per evitar contaminació del DNA entre les mostres (NOTA: els resultats són notòriament millors si quan posem la mostra a dins l' eppendorf, l'esclafem i trossegem).

6. Afegim 30 μ L de Proteïna K a cada mostra, canviant les puntes intercanviables de la micropipeta en cada mostra per evitar contaminació.
7. Sacsegem, per mesclar bé el Tissue, la Proteïna K i la mostra i la deixem a "VORTEMP" ("Shacking Incubator") a 55°C a 120 RPM O/N ("overnight") (de les 01:15 PM a les 10:05 AM).

DIA 2:

1. Repetim el procés de seguretat del primer dia, treiem les mostres de la "VORTEMP", les mostres s'han degradat; preparem la vitrina de gasos (degut a les emanacions tòxiques del fenol) i preparem el fenol (25M). Afegim 220 μ L de fenol a cada mostra (seguint les regles de no contaminació de mostres) i centrifuguem en una centrifugadora convencional durant 10 min (usant el Timer) a 13'0 RPM.
2. Mentre passen els 10 min, agafem 12 eppendorfs més i els retolem igual que els anteriors.
3. Passats els 10 min, observarem que a cada eppendorf s'han produït dues fases. Separem l'aquosa (superior), que són 220 μ L i els transvassem als eppendorfs preparats al pas 2 (Seguint la regla de les puntes intercanviables). Rebutgem la resta en el contenidor de residus biològics.
4. Afegim 220 μ L de la solució cloroform i alcohol isoalmyl (25M) i tornem a centrifugar durant 10 min a 13'0 RPM (usant el Timer).
5. Ídem pas 2.
6. Passats els 10 min, observarem que a cada eppendorf s'han produït dos fases. Separem l'aquosa (superior), que són 220 μ L i els transvassem als eppendorfs preparats al pas 5 (Seguint la regla de les puntes intercanviables). Rebutgem la resta en el contenidor de residus biològics.
7. Afegim 1/10 del volum d'acetat sòdic 3M (22 μ L), afegim 2 volums de alcohol etílic 100% a -20°C (440 μ L) .
8. Sacsegem i afegim 500 μ L d' etanol 70% a -20°C.
9. Centrifuguem la solució durant 5min a 13'0 RPM (usant el TMER)

10. Passats 5min, ho treiem, ho sacsegem (observem que és una solució aquosa blanquinosa) i deixarem la mostra a l'estufa (o forn específic) durant 10min a 70°C.
11. Passats els 10 min observem que la solució aquosa s'ha evaporat (el DNA es troba a les parets de l' eppendorf, retolem els eppendorfs amb les dades pertinents (en aquest cas: *Auxis Rochei*, CACO1 st.42, N° de mostra, data, extracció de DNA).
12. Afegir 50 µL d'aigua estèril (aigua amb dos destil·lacions successives, a gran temperatura i gran pressió).
13. La mostra es pot guardar indefinidament a -20°C.

NOTA: El procés següent, seria la comprovació (si efectivament és *Auxis Rochei*), i el control de qualitat i puresa del DNA; procés el qual es fa amb la prova del *gel d'agarosa* (un *procés electroforètic*). I finalment, si la mostra ha passat el control, es seqüenciarà i amplificarà pel procés PCR, pel posterior estudi del gen o grups de gens determinats.



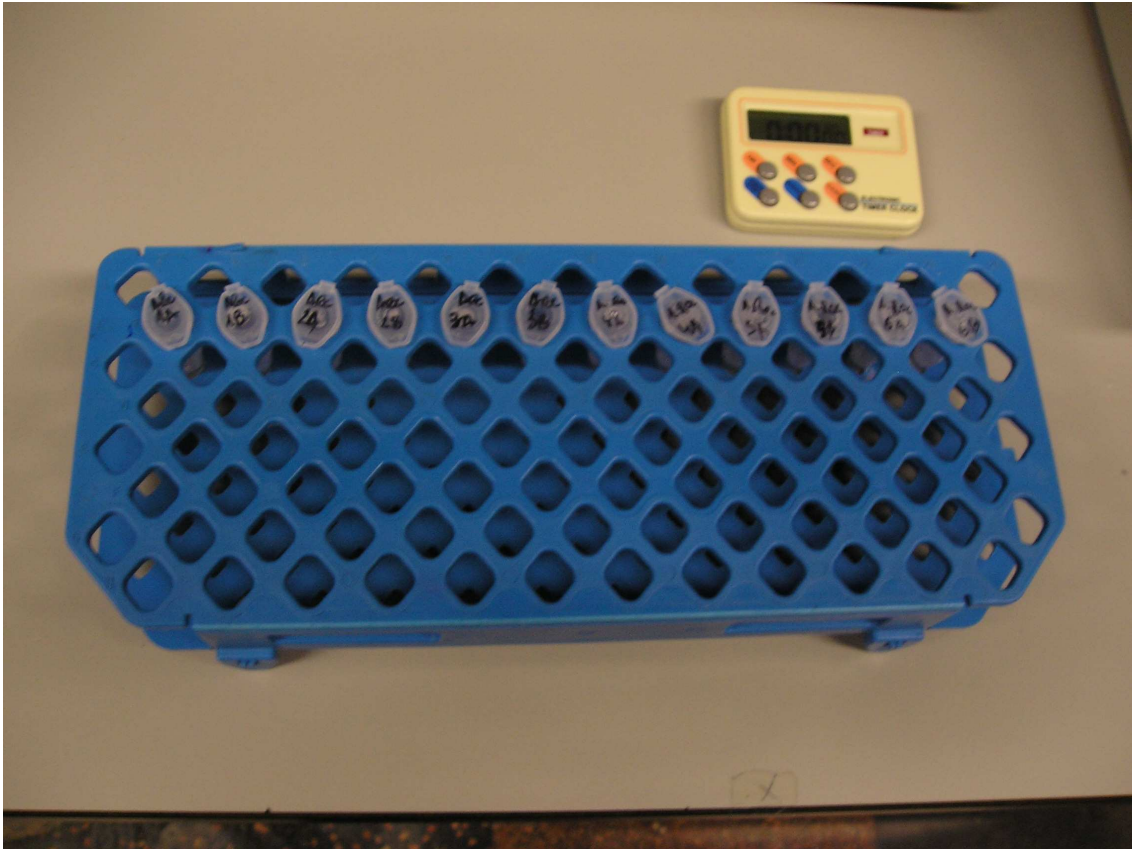
VORTEMP (“Shaking Incubator”)



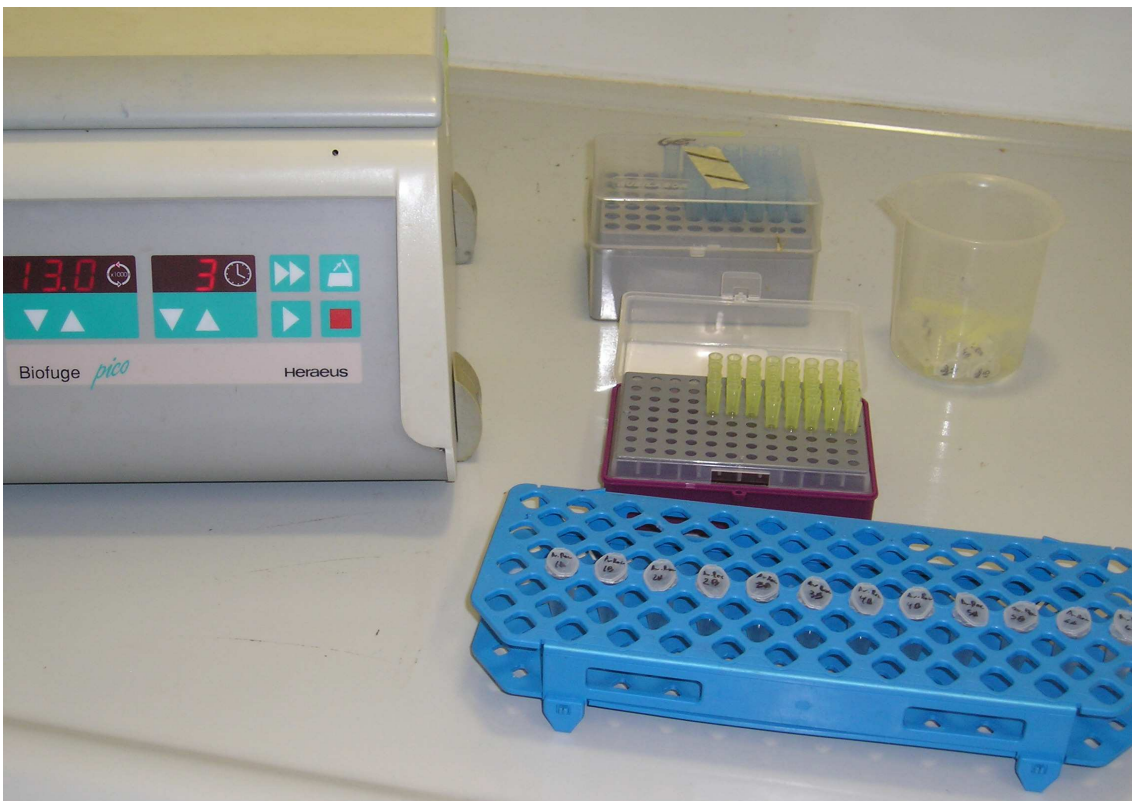
Micropipetes



Reactius a -20°C



Eppendorfs, suport i Timer.



Dins de la campana de gasos: centrifugadora, puntes, eppendorfs i suport.

Paral·lelament, durant les vacances d'estiu (gràcies a la coneixença del món científic dels meus dos tutors) vaig poder contactar amb tres gran científics d'aquí Catalunya: Francesc Piferrer, Luciano Di Croce i Juan Antonio Subirana. Cada científic, va ser escollit per la seva gran experiència i trajectòria en els seus diversos camps.

Francesc Piferrer, va ser escollit, pels seus recents treballs en epigenètica i diferenciació sexual en les poblacions de peixos (com ara els llobarros).

Luciano Di Croce, va ser escollit com a epigenetista entès en la gran majoria de processos epigenètics i especialitzat en les vies del càncer.

Juan Antonio Subirana, a part de prestar-me material didàctic imprescindible, va ser escollit pels seus amples coneixements sobre biologia molecular i genòmica (del DNA).

Tot i així, com he comentat, les entrevistes serveixen primordialment per donar a conèixer part de l'èlit d'investigadors que tenim a Catalunya (capdavanters en bona part dels camps i estrets col·laboradors amb universitats de prestigi estrangeres).

Durant l'inici del curs escolar, he anat diverses vegades, a Barcelona per entrevistar-me amb els científics esmentats (Pàgina 46) i veure les seves instal·lacions, comentar els seus darrers treballs, preguntar sobre l'epigenètica en general i els seus efectes transgeneracionals i les seves postures personals sobre el món científic.

5. CONCLUSIONS:

- Tot i que la idea que porta implícita l'epigenètica és un concepte relativament antic dins el món de la ciència, no és fins els anys 80 on experimenta un ressorgiment.
- L'epigenètica explica gran part dels “buits” de les hipòtesis de la genètica clàssica i vicerversa; per la qual cosa, una combinació entre les dues, pot portar a una hipòtesi que s'adeqüi més a la realitat.
- Em l'epigenètica, l'ambióma és el factor més important, sense la seva interacció amb els organismes, no existiren la majoria dels trets distintius.
- L'epigènesi, no només són canvis negatius en l'organisme, sinó que gràcies a molts dels seus processos, les informacions genètiques que posseïm no intercedeixen unes amb les altres, usant processos d'“Imprinting”. Per exemple si el gen X té informació per sintetitzar la proteïna Y. El gen provinent de la mare, té com al·lel dominant sintetitzar la proteïna Y a partir de G, i el gen, té com al·lel dominant provinent del pare, a partir de H. G i H no poden trobar-se ni interaccionar mai. És necessari “silenciar” un dels dos gen, degut a que la informació entre ells no pot coexistir ni tampoc tenen una relació dominant/recessiu.
- Els canvis epigenètics, no són permanents, tenen un component temporal (a diferència del canvis genètics). Tot i així poden passar d'una generació a una altra (tot i que el seu efecte és atenuat).
- En l'àmbit dels efectes transgeneracionals, podem concloure que l'etapa més delicada és la del desenvolupament fetal (normalment el període previ a la diferenciació sexual) i els primers dies de vida (quan l'expressió dels gens no està encara del tot ben definida).
- Els factors de l'ambióma més rellevants són: l'aliment, els depredadors, les radiacions ionitzants, els productes químics i els transgens (que poden venir fins hi tot d'origen víric).

- L'estudi dels mecanismes epigenètics es troba molt avançat, no obstant, l'estudi dels seus efectes en les generacions, com afecten a aquestes i les seves causes i conseqüències, és una àrea que millorarà amb el temps.
- En el terreny pràctic, els procediments genètics, són senzills, però requereixen gran concentració i meticulositat, degut a que el factor més important perquè un experiment sigui concloent, és la seva puresa (que no hagi estat contaminat o modificat).
- A Catalunya, tenim grans científics relacionats amb els àmbits genètics i moleculars. També posseïm grans projectes i instal·lacions. Cal considerar Catalunya com una de les capitals científiques més actives del món desenvolupat.
- L'epigenèsi, pot representar, més a curt termini que la genètica, una solució viable per molts dels problemes (generalment malalties de component genètic o de predisposició genètica) de la nostra societat. L'epigenèsi, en aquest sentit, és relativament més segura (per l'individu seleccionat) que la genètica, degut a la seva temporalitat.
- Personalment, l'epigenètica, em sembla una de les ciències emergents més interessants que avui dia podem trobar. Realment, dins el meu àmbit personal, seria una bona experiència fer algun altre treball sobre el tema o ampliar més els meus coneixements i aplicar-los en aquest treball.

6.BIBLIOGRAFIA:

RECURSOS WEB:

[02/08/10 a les 19:47]

(1)*Enginyeria genètica* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://ca.wikipedia.org/wiki/Enginyeria_gen%C3%A8tica

(2)*Genetic engineering* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_engineering

(3)*Ingeniería genética* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/Ingenier%C3%ADa_gen%C3%A9tica

[04/08/10 a les 23:27]

(4)*Enginyeria genètica* (en línia). Laura, Carla, Maria i Diana (grup de treball). Blogspot.com.

<http://enginyeriageneticaa.blogspot.com/>

[23/08/10 a les 18:57]

(5)*Reacción en cadena de la polimerasa* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa#Fundamento_e_importancia

(6)*C. H. Waddington* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/C._H._Waddington

[26/08/10 a les 18:03]

(7)*ABC de la epigenética* (en línia). Epigenetica.org.

http://www.epigenetica.org/?page_id=150

[31/08/10 a les 20:49]

(8)*Methylation* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methylation>

(9)*CpG* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://en.wikipedia.org/wiki/CpG_site

(10)*Epigenetic mechanisms* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Epigenetics#Mechanisms>

(11)*Prió* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Pri%C3%B3>

(12) *Epigenetcia* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Epigen%C3%A9tica>

[01/09/10 a les 13:33]

(13) *Acetilación de la histona* (en línia). Molecular Station.

<http://www.molecularstation.com/es/dna/histone-acetylation/>

[01/09/10 a les 18:33]

(14) *siRNA* (en línia). Fundació Wikipedia.

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

(15) *miRNA* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://es.wikipedia.org/wiki/MiRNA#Definici.C3.B3n>

(16) *ARNs asociados a PIWI* (en línia). Fundació Wikipedia.

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

(17) *Silenciamiento génico* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/Silenciamiento_g%C3%A9nico

[17/09/10 a les 18:27]

(18) *Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors*
(en línia). The Endocrine Society.

<http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/147/6/s43>

[21/09/10 a les 19 :03]

(19) *Síndrome de Prader-Willi* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADndrome_de_Prader-Willi

(20) *Síndrome de Angelman* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADndrome_de_Angelman

(21) *hypothalamic-pituitary-adrenal axis* (en línia). Fundació Wikipedia.

http://en.wikipedia.org/wiki/Hypothalamic%E2%80%93pituitary%E2%80%93adrenal_axis

(22) *Germline* (en línia). Fundació Wikipedia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Germline>

(23) *Seretonina* (en línia). Fundació Wikipedia.

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

[14/10/ 10 a les 15 :19]

(24) *Electroforesis en gel* (en línia). Fundació Wikipedia.

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

(25)Agarosa (en línia). Fundació Wikipedia.

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

RECURSOS FÍSICS:

- LLIBRES:**
- (27)Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M. L. *Epigenetics*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2007).
 - (28)Ringo, John. *Genética Fundamental*. Zaragoza : Ed. ACRIBA, S.A (2004).
 - (29)Jimeno, A., Ugedo, L. *Biología 1* batxillerat. Barcelona: Grup Promotor Santillana (2008).
 - (30)Jimeno, A., Ballesteros, M. *Biología 2* batxillerat. Barcelona: Grup Promotor Santillana (2009).
- ARTICLES:**
- (31)Akst, Jef, <<Mapping Methilation>>. The Scientist (03/02/2010).
 - (32)Subirana, Juan A. <<Una ullada a les transformacions epigenètiques del DNA en la reproducció>>. Treballs de la SCB. Vol. 59 (09/12/2008).
 - (33)Youngson, N.A, Whitelaw, E. <<Transgenerational Epigenetic Effects>>. Annual Review of Genomics and Human Genetics (03/06/2008).

7.ANNEXES

7.1. GLOSSARI:

· Al·lel: Cada una de les informacions genètiques (iguals o no) que té un organisme per un gen determinat. EX: els diploides, posseeixen 2 parells de gens aparellats (cromosomes homòlegs) que posseeixen en un locus determinat informació per un mateix caràcter (que pot ser igual o no).

· Ambioma: Conjunt d'elements o factors no genètics, que envolten un individu i condicionen la seva existència. EX: aliment, clima, depredadors, malalties, contaminació, etc.

· Aminoàcid: Molècules amb un extrem carboxil (COOH) i un extrem amino (NH₂) enllaçats a un carboni asimètric, amb un hidrogen i un radical lliure en els enllaços sobrants. La unió de molts aminoàcids, formen proteïnes. Existeixen 20 tipus d'aminoàcids per fer les proteïnes, els aminoàcids essencials. Es divideixen (segons la tipologia del seu radical) en polars (sense càrrega), apolar (sense càrrega), de càrrega positiva i de càrrega negativa.

· Argonauta: Família de proteïnes, relacionada amb el silenciament de gens per mitjà de la unió amb grups RNA.

· Arginina: És un dels 20 aminoàcids proteics que formen les proteïnes. La seva funció principal està relacionada amb l'immunologia i amb la síntesi de leucòcits.

· Auxis Rochei: També anomenada melva o tintorera, és un peix blau de la família de els tonyines i dels barats, que es troba a tots els mars i oceans de la terra a excepció de l'àrtic i antàrtic. És apreciat pel seu valor culinari.

· cAMP: Referència a la forma cíclica AMP (adeninosina monofosfat). És un mononucleòtid capaç d'emmagatzemar energia en els seus 2 enllaços èsters lliures (passant a ADP i ATP si en tenen ocupat 2 o 3 enllaços).

· Cèl·lula somàtica: Unitat bàsica i estructural dels teixits i els òrgans d'un ésser. Són somàtiques tot el conjunt de cèl·lules del nostre cos a excepció del es reproductives. Les cèl·lules somàtiques provenen de les cèl·lules mare durant el desenvolupament embrionari. A partir del procés de determinació i diferenciació cel·lular, es passa d'una cèl·lula mare a un somàtica.

· Cèl·lula germinal primordial: Gran cèl·lula diploide esfèrica, que es formen en el procés del desenvolupament embrionari i que és precursora de les ovogònies i espermatogònies.

- Codi genètic: Conjunt de normes per que es codifica l' informació genètica (ja sigui RNA o DNA). En el codi genètic existeixen 5 bases nitrogenades diferents: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) i Guanina (G) en el DNA i Adenina, Uracil (U), Citosina i Guanina, en el RNA. Dites bases s'aparellen A-T / A-U / C-G. Cada tres bases nitrogenades, s'anomena codó, i és capaç de codificar per mitja del RNAm i RNAt un aminoàcid d'una proteïna.
- CpG: Abreviació per anomenar un fragment d'àcid nucleic en que es trobin una citosina i una guanina contigües, enllaçades per un àcid fosfòric.
- Cromatina: Conjunt de DNA, histones i proteïnes no històniques que es troba al nucli de les cèl·lules eucariotes. És on es troba l' informació genètica. La cromatina, pot posseir diversos estats de plegament i complexitat (ordenats de menor a major): hebra en doble hèlix, hebra en forma de "collar de perles" , cromatina en profase i cromosoma. Existeixen 2 tipus de cromatina, l' heterocromatina (quan la cromatina es troba condensada i no es pot dur a terme la transcripció) i l'eucromatina (quan la cromatina es troba menys condensada i es pot dur a terme al transcripció).
- Desoxiribosa: Monosacàrid (glúcid) de cinc àtoms de carboni amb la pèrdua d'una àtom d'oxigen en al posició 2. És el glúcid estructural del DNA.
- Diploide: Dit dels éssers o de les seves cèl·lules que posseeixen 2 dotacions cromosòmiques, normalment, una de cada progenitor.
- DNA: Àcid desoxiribonucleic. Té la funció de contenir tota l' informació genètica d'un organisme. Està compost per les bases nitrogenades, per àcid fosfòric i per desoxiriboses.
- DNA recombinant: És creat per mitjà artificial, unint DNA específic a un organisme amb DNA propi. Aquesta pràctica se sol dur a terme en medis d'investigació pe dotar a organismes amb característiques foranes. També es pot usar per crear proteïnes o hormones recombinats (normalment a partir de bacteris) com la insulina recombinant.
- Eix hypothalamic-pituary-adrenal: Eix constituït per l' hipotàlem, la glàndula pituïtària i la glàndula adrenal que és la base del sistema neuroendocrí.
- Electroforesis: Tècnica de separació de molècules que usa la diferència de mobilitat en un camp elèctric de dites molècules. És un dels sistemes més usats en el món científic, sobretot en totes les branques de la biologia. Com a suport, es pot usar una superfície sòlida o en forma de gel.
- Enzims de restricció: Enzims, amb al capacitat de tallar les hebres de DNA per llocs específics. Degut a aquest propietat, són molt usats en el camps de la biologia genètica. Els

enzim de restricció, són propis dels éssers procariotes, i els usen com a funció defensiva (evitant que material genètic extern no desitjat, interfereixi en propi).

· Epial·lel: Són aquells al·lels, que es diferencien entre ells pel seu grau de metilació.

· Epiblast: Una de les cèl·lules presents en el moment de la gastrulació, del desenvolupament embrionari. En un futur donarà lloc al ectoderma i mesoderma.

· Fenotip: És l'expressió d'un genotip en un determinant ambient.

· Gastrulació: Fase inicial del desenvolupament embrionari, on es formen l'endoderma, mesoderma (només ne algunes espècies) i exoderma. Després, esdevé el procés de organogènesi (formació d'òrgans).

· Gel d'agarosa: Gel format pel polisacàrid de galactoses alfa i beta, que conformen l'agarosa. Aquest gel es pot obtenir en síntesi artificial o de l'extracció d'algun tipus d'algues (és extret del agar-agar). Aquest gel, és utilitzat com a base per a un procés electroforètic que combinat amb el bromur d'etidi, ens permet observar si determinades mostres de DNA es troben en bon estat com per aplicar-hi processos de PCR.

· Genètica clàssica: Aproximació a la genètica, que no utilitza la biologia molecular com a medi d'explicació, sinó usen l'anàlisi i la probabilitat. Les lleis de Mendel entren dins d'aquest camp.

· Genètica mendeliana: sin. Genètica clàssica.

· Genotip: És el contingut de tota l'informació genètica d'un individu. EL genotip o informació genètica, junta, ment amb l'ambient, forma el fenotip (característiques observables).

· Germlines: sin, Línies germinals.

· Glucocorticoides: Hormona d'acció contrària a l'insulina en el reg sanguini, és a dir, dificulta l'accés de glucosa dins de les cèl·lules. També ajuda en el procés metabòlics dels lípids i proteïnes. El cos humà forma 3 glucocorticoides diferents: el cortisol, la cortisona i la corticosterona.

· Haploide: Dit de les cèl·lules o organismes amb una sola dotació cromosòmica. Provenent exclusivament de la progenitora.

· Herència mendeliana: sin. Hard inheritance.

· Herència no mendeliana: sin. Soft inheritance.

· Hipocamp: Part o zona cerebral que està íntimament relacionat amb la memòria, la percepció espacial i la inhibició de conductes.

- Hipòtesi semi conservadora: *Hipòtesi formada per Watson i Crick sobre la replicació del DNA. Aquesta anuncia que a l'hora de duplicar-se el DNA, es separen les dos hebrees i els nucleòtids del medi, formen els brins complementaris, formant d'una cadena de DNA, dues cadenes de DNA en que cada una té un bri de DNA "vell" u un de "nou".*
- Hormona del creixement: *Hormona molt complexa llur informació ve de 5 gens diferents del cromosoma 17. Només s'expressa a la pituïtària i és controlada per un estímul. L'hormona del creixement, permet el creixement exponencial donat a l'etapa infantil i adolescent. A la maduresa segueix essent de gran importància.*
- Línies germinals: *Línia cel·lular, en que es formen les cèl·lules sexuals (gàmetes) per mitjà de la meiosi. Només es produeix en els éssers amb reproducció sexual.*
- Línies Somàtiques: *Línia cel·lular, que forma els teixits i òrgans dels éssers vius, procedents de cèl·lules mare formades durant el procés de desenvolupament embrionari.*
- Lisina: *Un dels 20 aminoàcids proteics que formen les proteïnes. Té una gran funció com a fixador del calci, per la qual cosa ajuda a refer estructures danyades i a més, té una gran importància en al síntesi d'hormones, anticòssos i enzims.*
- Locus/ Loci: *Posició o lloc fix d'un cromosoma.*
- Meiosi: *Una de les dos vies de reproducció cel·lular. En aquesta, es passa d'una cèl·lula diploides (2n) a 4 cèl·lules haploides (n), per mitjà de dues divisions consecutives. És un procés continu però per estudiar-lo el dividim en: Profase I, Metafase I, Anafase I, Telofase I, Profase II, Metafases II. Anafase II, Telofase II i Profase II. En la Profase I es duu a terme un procés específic anomenat recombinació genètica, en que els diferents cromosomes, s'intercanvien gens, per augmentar la probabilitat de passar un gen determinat a la següent generació.*
- Mitosi: *Altre via de reproducció cel·lular. En aquesta, es passa d'una cèl·lula diploide (2n) a dos cèl·lules diploides o (2n). El procés és continu, però el dividim per a l'estudi en: Profase, Metafase, Anafase, Telofase. En aquest cas no hi ha recombinació genètica.*
- Mus musculus: *ratolí comú.*
- Omnis cellula ex cellula: *Del llatí, significa tota cèl·lula prové d'una altre cèl·lula.*
- Pan troglodytes: *Ximpanzé comú.*
- PIWI: *Conjunt de proteïnes (provinent d'un sistema de gens de nom homònim) que es troben íntimament relacionades amb la diferenciació cel·lular i amb l'estabilitat de al divisió cel·lular (concretament la meiosi).*

· Pre RNAm: En els organismes eucariotes, en el DNA, es troben zones de DNA espaiador (introns) i zones en que hi ha gens que codifiquen per proteïnes determinades (exons). El pre RNAm ha fet un “motlle” d’introns i exons, però és necessari que faci un procés de maduració cap a RNAm i que perdi els introns.

· Prió: Glicoproteïnes patògenes, que solen transmetre patologies del sistema nerviós central. Els prions, igual que els virus, no es consideren éssers vius. L’infecció, ve per la ingesta. Els prions provoquen els seus símptomes, acumulant-se i desnaturalitzant-se en les zones del Sistema Nerviós Central.

· Projecte Genoma Humà: Projecte internacional, impulsat per Craig Venter, amb l’ambició de seqüenciar totes les bases nitrogenades del DNA humà, determinar-ne tots els gens i anar trobant les seves funcions. L’any 2000, es van acabar el primer procés; actualment es fan avanços sobre el segon i tercer.

· Radiació ionitzant: Totes aquelles radiacions amb la capacitat d’alliberar els electrons de la matèria radiada (ionitzar-la). Exemples en són les partícules alfa, beta, els raigs X i els gamma. Són altament energètics, per la qual cosa, en certes quantitats són nocives pels éssers vius.

· Ribosa: Monosacàrid de cinc àtoms de carboni que forma part estructural del RNA. A més també contribueix en la síntesi d’altres elements, com els nucleòtids: ATP, GTP, ADP, AMP, etc.

· RNA: Present en cèl·lules eucariotes i procariotes, pot fer la funció de contenir la informació genètica, però el més ocurrent és que faci funcions relacionades amb la síntesi de proteïnes. Està constituït per nucleòtids (formats de el sucre ribosa, àcid fosfòric i les bases nitrogenades pertinents). Existeixen diversos tipus d’RNA, que es diferencien en estructura i per tant en funció.

· RNAases III: Enzím relacionat amb la síntesi d’ RNA.

· RNAm: Tipus d’ RNA, encarregat del procés de transcripció. Quan el DNA és separat per la DNA-polimerasa, es forma el pre RNAm o directament l’ RNAm adherint-se al DNA i formant codons codificants (triplets de bases). Després el RNAm es situa entre les dues subunitats dels ribosomes i allà, juntament amb el RNAt, descriuen l’ordre i posició dels aminoàcids de la proteïna determinada (procés de traducció). El codi genètic posa en relació el triplet de bases del DNA i l’aminoàcid resultant.

· RNA_t: Tipus de RNA (en forma de fulla de trèvol), encarregat de captar un aminoàcid i col·locar-se al ribosoma tal com indica la relació entre el seu anticodó (triplet de bases complementari al codó) i el codó del RNAm.

· Serotonina: Monoamina neurotransmissora. Aquest neurotransmissor, fa la funció d'inhibició de les conductes següents: ira, agressió, vòmit, son, temperatura corporal, sexualitat i gana. La serotonina és segregada majoritàriament al sistema nerviós central.

· Síndrome d'Angelman: Malaltia causada per la deleció del cromosoma 15, que causa un retràs en el desenvolupament, dificulta la parla, problemes de coordinació i equilibri, i és característic un estat permanent d'alegria (o aparença d'aquesta, degut a que sempre estan somrient o rient). Els pacients són fàcilment alterables.

· Síndrome de Prader-Willi: S'origina per diverses lesions del cromosoma 15 d'origen patern, i causa o dona propensió a la obesitat, a l'estatura baixa, alteracions en la parla i en la formació i maduració de cèl·lules sexuals.

· Transgen: Dit que qualsevol gen no original d'un ésser. Aquesta migració pot ser a de causes naturals o artificials.

7.2. PROTOCOL ORIGINAL DE L'EXTRACCIÓ DEL DNA D'UNA MOSTRA CONSERVADA EN FENOL O CLOROFORM:

Total DNA isolation from animal tissue

Phenol / Chloroform / isoamyl alcohol protocol

General Material needed

Gloves
Sterile water
Sterile microcentrifuge tubes, 1.5 ml
Sterile tips.
Microcentrifuge tube racks
Ice and Ice cubet
Timer
Permanent marker
Lab notes
Waste disposal
Vortex
Microcentrifuge, refrigerated
Parafi

Specific material

<i>Disruption and homogenization</i>	<i>from</i>	<i>conditions</i>
Homogenizer pestle		
TENS buffer (Lysis buffer)	To be prepared	RT
Proteinase K	To be prepared	10 mg/ml (-20°C)
Incubator or water bath		50°C
<i>Isolation of total DNA</i>	<i>from</i>	<i>Storage conditions</i>
25:24:1 (v/v/v) phenol/choloroform/ isoamyl alcohol		4°C

absolute EtOH	-20°C
3M sodium acetate (pH 5.2)	RT
70% EtOH	-20°C

Key points:

- The starting tissue can be either ethanol or frozen preserved. Good DNA has also been successfully extracted from dried tissue (e.g. dried fin clips)
- O/N lyses step is recommended. Be Prepared accordingly.

PROTOCOL

Disruption and homogenization of the tissue

1. Warm the thermoblock at 55°C
2. Place the tissue on Ice, and in a 1.5 ml eppendorf add 600 µl of lysis buffer for with 100 mgr of tissue.
3. Homogenize for 1 min with the *Polytron* or pestle until the sample is uniformly homogeneous

Note *to avoid sample loss, the homogenization of small volume samples is better done using the “pestle” in 1.5ml eppendorfs. On the other hand, better homogenization is done in 15ml tube with round bottom*

4. Add 20 -30 µl of Proteinase K and incubate the sample O/N at 55°C.

Note *Better results are obtained with gentle shaking. Use the shaker and incubator. Amount of Prot K depends of the tissue hardness.*

Isolation of Total DNA

5. Add an equal volume of phenol/choloroform/isoamyl alcohol. Invert tube several times.

6. Centrifuge 10 min at maximum speed (14 – 17 000 g).
7. Transfer the aqueous (top) layer to a new tub. Determine its volume and add 1/10 volume of 3M sodium acetate and 2 volumes of 100% ethanol (cold, –20°C).
8. Centrifuge 10 min at maximum speed (14 – 17 000 g).
9. Rinse the pellet with 70%. Decant ethanol and air dry the pellet
10. Resuspend DNA with sterile water. Shake gently at room temperature or at 65°C for several hours to facilitate solubilization.
11. Store indefinitely at -20°C

Note the purity and quantity of the DNA can be checked by both spectrophotometer and agarose gel

TENS buffer (lysis buffer)

Source: Current protocols of Molecular Biology. Page 2.2.2

Use: Lysis buffer for DNA extraction

Final volume 100 ml (adjust quantities for other volumes)

	<i>100 ml</i>	<i>Final concentration</i>
NaCl 5M	20 ml	100 mM of NaCl
Tris-HCl 1M (pH 7.5)	1 ml	10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
EDTA 0. 5M (pH 8)	5 ml	25 mM EDTA (pH 8)
SDS	0.5 g	0.5% SDS

Add deionized H₂O to a final volume of 100 ml

Tuesday, February 07, 2006.

7.3. ENTREVISTES:

7.3.1. Entrevista al Dr. Francesc Piferrer , Institut de Ciències del Mar (ICM) (16/09/2010) Adaptació:



· Què és el que el va engrescar a treballar en l'epigenètica? *Més que endinsar-nos en la epigenètica expressament, va sorgir com una de les possibles respostes al nostre projecte. Teníem una sèrie de problemes en la nostre teoria, i d'un "stage" que vam fer al Montseny; en va sortir com a una de les solucions (que per el moment ens ha portat a bon port). Aquest projecte relacionava els peixos i la seva diferenciació sexual (més endavant si vols en parlarem).*

· Quina ha estat la seva trajectòria professional? *Vaig llicenciar-me en Biologia per la Universitat de Barcelona, fer la tesi a Canadà i després de dues estancies postdocorals a EE.UU. vaig entrar al CSIC. Actualment sóc Professor Consell Superior d'Investigacions Científiques a l'Institut de Ciències del Mar (Barcelona), cap del Grup de Biologia de la Reproducció i coordinador del Grup de Recerca Consolidat de la Generalitat de Catalunya anomenat "Grup de Fisiologia i Genòmica de Peixos". Doctor en Biologia i Tècnic Superior en Aqüicultura, també sóc Membre del Consell Directiu de la Societat Catalana de Biologia, filial de l'Institut d'Estudis Catalans.*

· Quins són els seus darrers treballs? *Ara tenim alguns treballs en curs, però primer podem parlar del anteriorment parlat.*

Que fa que un animal, sigui mascle o femella (independentment de l'animal que sigui)? Són dos conceptes diferents:

**Determinació Sexual (s'estableix el gènere): És coneguda com el conjunt de processos i mecanismes que estableixen un gènere. Com per exemple la informació genètica i l'entorn (ambient). N'hi ha de dos tipus:*

**La genotípica: Determinació en la qual el gènere són definits exclusivament per la informació genètica que porta l'individu des del moment de la fecundació. En el regne animal, hi pertanyen tots els mamífers, totes les aus (animals de sang calenta, el que*

els representa una independència del clima del ambient), alguns rèptils, la majoria d'amfibis i la majoria de peixos.

**L' ambiental: Determinació en la qual els gèneres són definits exclusivament per d'interacció de l' ambient amb l'organisme. La gran majoria de rèptils, alguns peixos i amfibis usen aquest tipus de determinació.*

**Mixte: A més, la determinació també pot venir estipulada pels dos mecanismes a la vegada, en més o menys intensitat. En aquest bloc hi entrarien molts rèptils, alguns peixos i amfibis. En alguns casos, tot i que el sexe ja es trobi determinat, per causes de l' ambient, es pot produir un canvi en el sexe fenotípic (diferenciació sexual).*

En els humans, existeix un grup de gens (Sri), que depenen si es troben en estat de latència o activat, l'organisme acaba esdevenint femella o mascle respectivament (aquesta activació, te base en l' ambient).

**Diferenciació Sexual: És el mecanisme cel·lular que permet a éssers sense gònades (degut a la seva joventut), desenvolupar-ne i posteriorment diferenciar-se en algun dels gèneres.*

Un cop dit això, el nostre treball es basa en antecedents històrics. Als anys 80 es va demostrar que l'espècie "menidia menidia" es veia influenciada per la temperatura (un cas mixte), però encara no sabien a que es referien concretament. Durant diversos anys es va aconseguir deduir una part de les espècies (degut a que la determinació sexual és un procés únic en cada espècie, és a dir, no es poden fer generalitzacions). Avui en dia encara estem en el procés d'identificació en les diverses espècies, on estem fent la nostre contribució (realment, en al actualitat, sabem que la majoria dels peixos funcionen pel mètode mixt). Nosaltres, vam treballar amb el llobarro i actualment amb zebra.

En si mateix, si en els llobarros els afecta o no la temperatura (que els afecta), no era una cosa que desconeguéssim, el problema era que no sabíem quan, a quina temperatura els afectava, què ho regula, s'hi havia altres factors, etc.

Com a resultats del treball, em conclòs (en els llobarros) que el període sensible a la temperatura és en els primers 60 dies (després de la fertilització). Però, et preguntaràs, com vam poder saber dit efecte si la determinació no conclou (i s'aprecien els seus efectes, com ara l'aparició de l' aromatasa) fins 150 dies després de la fecundació?

Van sortir diverses opinions: intervenció d'hormones, canvis genètics... fins arribar a la epigenètica. Per el moment (que és la part del projecte que segueix en curs), estem

investigant la rel·lació entre la metilació d'una àrea concreta del gen i aquest fenomen (que creiem que actua com a interruptor del mecanisme).

Per aquest projecte usem diversos aparells i sistemes (com ara la PCR o l'E-222, que ja en parlarem més endavant) i posteriorment passem per un procés de localització i diferenciació entre els mostres (abans i després de l'ús del bisulfit sòdic).

Aquestes modificacions de la temperatura forma part d'un projecte per avaluar les diferències entre els llobarros salvatges i captius.

Altres projecte en que estem inversos són:

·Tenim un altre projecte amb el projecte Acuagenomics relacionat amb els turbots (els rangs de reproducció que posseeix); com afecta la temperatura en el seu creixement, en el cicle reproductiu (massiu ...

Per aquest projecte, estem usant el sistema "DNA-Microray" (o xip de DNA), que permet i s'usa per analitzar els gens (al voltant d'uns 15.000 gens a la vegada) i la seva expressió (ja que es pot analitzar gairebé la totalitat del genoma a la vegada).

·Un projecte que tenim en ment, tracta sobre els diferències epigenètiques d' "animals cultivats" (per psifactories, en el nostre cas) amb salvatges.

· Per a vostè, que és la biologia? Per mi la biologia és la meva passió, des de ben petit. De petit, em vaig trencar el braç a l'escola, i quan em van fer la radiografia, vaig quedar tant impressionat que vola ser metge. Però, gràcies a un professor de biologia, de nivell post obligatori, em vaig adonar que el que realment m'agradava era la biologia. Però no tota la biologia, aviat vaig tenir clar que no volia ser un professor, volia estar amb l'acció, volia ser investigador. De la biologia, el tret que m'agrada més, és que trenca els esquemes; una cosa que podia ser veritat fa 4 anys, ara no ho és, està en canvi constant.

A més, ara ens trobem dins la època d'or de a biologia (que continuarà encara un bon temps més), tal i com els segles XVIII i XIX ho van ser de la química, i el XIX i XX de la física. És un repte intel·lectual constant.

· I la genètica? La genètica, és una banca de la biologia especialment interessant, ja que ens permet conèixer molts detalls de "com són realment" molt éssers, incloent-hi, l'ésser humà.

· I l'enginyeria genètica? Bé, no entenc com és que hi ha un sector tant gran de la població que n'està en contra.

En temes legals? el principal problema són les restriccions mediambientals (per llençar al mercat producte modificats, cal que passin unes probes que mostrin que sigui totalment innocu per l'ecosistema, però per fer els estudis, sovint és necessari provar-ho "in situ", per tant efectuant un dany... és una mica una paradoxa...), degut a l' intent de protegir la biodiversitat que queda. Per exemple els peixos transgènics són nutricionalment segurs els cent per cent, i la "llegenda urbana" que diu que els aliments transgènics tenen diferent gust és totalment falsa (pel fet de ser transgènics, pots produir el sabor que més et convingui, i normalment el que es busca és el paregut amb la realitat).

· I l'epigenètica? Jo la definiria com a la ciència que estudia els canvis, mecanismes i herències que influeixen en el fenotip però que no venen donades per canvis en el genotip (és a dir, no hi ha modificació de bases nitrogenades, per entendre'ns). L'epigenètica, pot explicar bona part dels "buits" dins moltes teories biològiques.

· Fan servir el tint E-222 (bisulfit de sodi) per tintar les citosines dins el projecte amb els llobarros i zebrafish? Com funciona el procés? Si efectivament, és el procés pel que normalment, es sol observar "comparativament", l'abast de les metilacions en determinades seqüències. A part que és molt difícil concretar al zona en que ha de ser usada el bisulfit, també és una tècnica complexa, perquè en el procés, el bisulfit degrada molt el DNA (sobre un 90% del que fem servir) degut a les seves naturalesa agressiva. Així doncs, és útil però requereix una gran perícia.

· Estic realitzant el treball de recerca sobre els efectes transgeneracionals de l'epigenètica en humans, què em podria dir sobre aquest tema? Com he dit no sóc un expert en l'epigenètica, i menys encara dels seus efectes transgeneracionals. Recentment, Michael K. Skinner, juntament amb altres científics estan estudiant els efectes epigenètics transgeneracionals amb tòxics (Disruptors endocrins) en rates, en al que postulen que moltes d'aquestes efectes perduren 5 o 6 generacions (el que dóna a pensar quin abast posseiran els mateixos tòxics amb els humans). Això ens porta a pensar si les accions preses pels nostres avantpassats immediats influeixen en nosaltres i si les nostres accions influenciaran als nostres descendents. Un antecedent històric interessant pel teu treball, potser Paul Kammerer; un biòleg austríac, de principis de segle XX, que va trobar efectes ambientals inexplicables per al teoria de Darwin.

· Quins elements té en un laboratori per treballar l'epigenètica? Els estris o sistemes que s'usin, depenen molt cap a on estigui enfocat el treball (càncer, reproducció...), però a trets

generals hi trobarem el mateix que en qualsevol laboratori de genètica: PCR's, seqüenciadors de DNA variis, DNA-Microray (si es te pressupost) etc.

· Podem veure les instal·lacions? Sí, podem anar-ho a veure; veurem un parell de laboratoris que fem servir i els “aquaris” on tenim els espècimens.



Seqüenciadores PCR



Taula estàndar/laboratori genètica



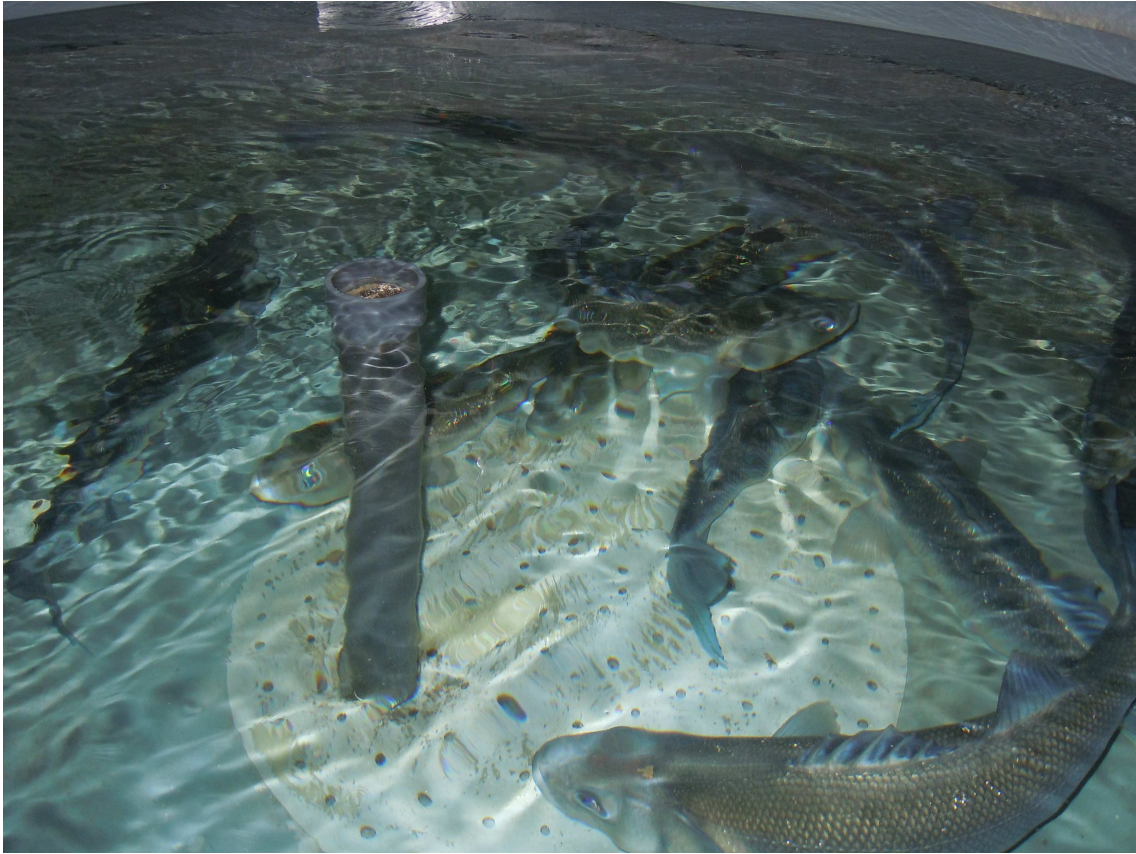
Sala de mostres en refrigeració/tècnic



<<Turbocentrifugadora>>



Peixera/Estadi creixement 2



Peixera/Estadi creixement 3 <<pares>>



Peixera/Estadi creixement 1

7.3.2. Entrevista amb el Dr. Luciano Di Croce, Dr. al Centre de Recerca Genòmica de Barcelona(CRG) [23/09/2010]:



· Què és el que li va engrescar a treballar en l'epigenètica? Més que engrescar-me a treballar-hi, se'ns va presentar com a solució a les incògnites que se'ns formaven; això sumat a la meva experiència en dit camp, ens hi va portar de dret.

· Quina ha estat la seva trajectòria professional? Els meus estudis superiors, si és al que et refereixes, els vaig fer la universitat de Roma (llicenciatura en biologia), vaig fer una especialització allà mateix i un post grau de 5 anys a Alemanya. Després, Vaig fer un segon post grau a Milà i al acabar-lo, em van oferir fer de cap de grups, aquí al CRG (2003), degut a les meves especialitzacions i experiència (en càncer i en epigenètica).

· Quins són els teus darrers treballs? Tècnicament, jo ja no faig treballs, més aviat, els superviso (a l'hora de la veritat, és com si estigués col·laborant amb tots ells). Actualment, superviso 14 treballs diferents (els quals seran 14 publicacions). La meva feina, consisteix en comentar, revisar, explicar i ajudar a les diferents persones que tinc a càrrec meu (alguns estan fent llicenciatura, altres ja són pel doctorat i altres fan postgrau).

Per exemple, un treball, consisteix en l'estudi de les dues rutes de diferenciació cel·lular:

·Àcid retinoic, que és usat durant la transcripció i és encarregat entre altres funcions activar alguns grups de gens.

·Myc (proteïna), que és encarregada de regular la proliferació cel·lular.

Les 2 vies, s'entrecreuen. La via (de forma simplificada diu així): l'àcid retinoic, s'acobla al receptor de l'àcid retinoic (un factor transcripcional). Un cop adherit, pot regular alguns grups de gens per una banda, i per l'altre, es pot adherir al grup proteic Myc, i duu a terme altres funcions.

L'àcid retinoic, en pot regular uns 50 gens, i el Myc uns 50 més (aproximadament); però el complex retinoic+Myc, pot regular els 50 de cada banda més 100 gens extres (part dels gens està íntimament relacionat amb la proliferació cel·lular i mitosi). Actualment s'està estudiant dit nou complex proteic.

Un altre projecte, és el relacionat amb la cua de les histones; concretament l'H2A, el grup més abundant. En la seva cua, té una modificació, l'adheriment de la proteïna ubiquitina (que modifica un aminoàcid de la cua de l'histona), al qual només fa 20 anys que es va descobrir. El que s'està investigant, és la funció que té aquest canvi. Segurament sortirà a la revista "Science" de desembre.

Un altre projecte en que col·laboro és amb l'estudi del complex multiproteic "polycom", que regula la transcripció. Aquest complex, es troba fet per 4 proteïnes de al mateixa família, i és responsable de la marca de al ubiquitina. No se sap com funciona, qui ho guia o si usa algun tipus de marcador. Son diversos gens, els que codifiquen per els proteïnes que formen el "polycom". A més, existeixen diverses variants de dit complex proteic, en el qual, es canvia un proteïna per una altre de la mateixa família, el complex segueix fent la mateixa funció. Com fa aquests canvis? Quan incorpora aquest canvi?

Una altre pregunta que suscita, és com aquestes marques de al ubiquitina, modifiquen el procés de diferenciació cel·lular (ja que tot el que he esmentat abans, era en la fase pre-diferenciativa de al cèl·lula).

· Per a vostè, que és la biologia? Per mi, és la ciència de la vida, jo des de petit, he estat molt curiós, m'agradava saber com funcionaven i com eren les coses, volia comprendre. Ja l'escola, m'interessava molt més a biologia i la química que la filosofia per exemple. En Biologia, la majoria dels problemes o interrogants (al voltant d'un 70%) es troben a nivell fisiològic, i ens porta a preguntar-nos, perquè passa això? Quina ruta biològica ho controla? Com deia, l'atractiu de la biologia, són els preguntes que mai para de suscitar, sempre hi haurà un perquè per formular.

· I la genètica? La genètica, com els seu nom indica, és l'estudi dels gens. En genètica molecular, per exemple, primer s'estudien les funcions dels gens coneguts i després la seqüenciació d'altres gens (actualment estem sobre uns 4000 al dia, amb els aparells que disposem); a més de tot el procés intermedi d'extrapolació i comprovació que comporta. El que ens porta a pensar dos coses:

· Com més tecnologia desenvolupem, més visió obtindrem en aquests problemes.

· Els gens, i les seves interaccions són extremadament complexes!

Com a curiositat, i per s et pot servir pel treball, et recomano les revistes "Biocell" i "Nature"; ambdós i posseïm alguns treballs publicats.

· I l'enginyeria genètica? *Més que enginyeria genètica, parlem d'enginyeria epigenètica. L'enginyeria epigenètica, tot i ser més jove que la genètica, està mostrant més resultats en menys temps, degut a que és relativament més senzill manipular un canvi epigenètic que un canvi genètic. No obstant, encara és enormement complicada, per exemple: com podem canviar el nivell de metilació de gens que volem? Com ho podem fer-ho de forma específica i sense danyar la resta de gens?*

Vet aquí, la dificultat real de l'enginyeria epigenètica, l'especificat. Encara que existeixin diversos elements adversos, la enginyeria epigenètica és una realitat, avui en dia, i en pocs anys serà molt més normal del que ens pensem (actualment, existeixen fàrmacs que varien el teu nivell de metilació en determinats gens que provoquen una major susceptibilitat davant dels càncers).

· I l'epigenètica? *És una branca relativament jove de la biologia (dels anys 80 i 90) que estudia en part, l'expressió dels gens. La epigenètica, revolucionat la teoria genètica, des de la seva aparició, permeten desfer "forats" en algunes teories i estudis.*

L'epigenètica, a més, no solsament, en aquesta àmbits, sinó que és cada cop més necessària en altres camps, com en la biologia molecular.

L'epigenètica és molt àmplia, però en un dels termes en que es sol treballar més, (nosaltres inclosos) és la diferenciació cel·lular. En aquesta, podríem dir que hi succeís una expressió de gens diferenciativa, és a dir, que l'expressió dels gens és controlada o canviada per aconseguir la diferenciació de la cèl·lula. Doncs bé, aquest fenomen, està íntimament lligat a l'epigenètica, i sobretot al codi epigenètic, arribant a casos com que una cèl·lula determinada, pel context en que es troba (el tipus de cèl·lules que l'envolten) es diferenciï d'una manera o una altre.

Abans de continuar, cal aclarir, que els cèl·lules diploides del nostre cos són idèntiques genèticament, però molt diferents epigenèticament. Això, en permet donar una solució al problema clàssic en la diferenciació (com pot ser que les cèl·lules somàtiques del nostre cos, comparteixin exactament la mateixa informació genètica i per contra tinguin funcions i aparences tant diferents).

L'epigenètica, té de particular un caràcter més temporal que la genètica, és a dir, mentre que un canvi genètic, amb el pas de generacions només es queda "diluit" a nivell poblacional (ja que el canvi serà de caire permanent en les línies successòries del gen). Per altre banda, un canvi epigenètic, a part de la "dilució" a nivell poblacional, també es produeix una

degradació en dit canvi que provoca que el seu efecte s'esmoreixi a llarg de les generacions fins arribar a desaparèixer si no és "reafirmat" en cada generació (EX: Metilació de manteniment). Aquests processos es duen a terme en una capa (o nivell) de regulació genètica.

En patologia, molts problemes són donats per causes genètiques o per no genètiques. Aquestes causes no genètiques sovint deriven en factors epigenètics (normalment, poden tenir com a origen, un canvi genètic, que hagi modificat el codi epigenètic i el funcionament dels seus processos; per exemple, un canvi genètic, modifiqui la freqüència i els "locus" en que actui la metiltransferasa i aquesta metili elements en que no ho hauria de fer).

Això ens porta a dir, que tant la genètica com la epigenètica es troben en el mateix nivell d'importància.

· Com és la biologia tumoral? La biologia tumoral (part de la biologia que estudia els tumors, el seu funcionament, causes i maneres d'eradicar-los) és una ciència realment molt complexa. No és per menystenir la resta de les branques de la biologia, però és realment complexa; la quantitat d'interaccions que es produeixen, les causes que poden tenir (tant genètiques, com ambientals, com epigenètiques, etc), com aturar o interrompre els processos que s'ho produeixen, etc.

No obstant, és realment interessant, i cada avenç que es fa té un gran valor humà. A més bona part dels descobriments que a priori no sembli que hi puguin tenir una relació, acaben per ser de gran ajuda.

· Raons per treballar amb Leucèmia? Més que tenir raons per treballar amb leucèmia, em van demanar que vingués a aquí, a Barcelona, per la meva experiència sobre el tema, per dirigir un grup de treball (que va culminar amb la presentació de "Leukemia" a la revista "Cell").

· Podem dir que hi ha relació entre l'epigenètica i els efectes de la proteïna PML-RAR de la leucèmia? Primer de tot, aclarim, que és PML-RAR. Aquesta proteïna, per entendre'ns és un error, la conseqüència de la situació en que el gens que codifica per PML i el gen que codifica per RAR (receptor de l'àcid retinoic), col·lisien. Aquesta proteïna, al ser producte d'un error, l'organisme no té tots els sistemes de control necessaris per aturar-la, el que provoca que dugui a terme la seva funció (per al qual no està preparada l'organisme). La proteïna PML-RAR crea dos efectes que ajuden molt a al aparició de la Leucèmia: un augment del cicle de mitosis (és a dir una proliferació cel·lular massiva) i la capacitat d'impedir que les cèl·lules afectades puguin diferenciar-se.

Un cop dit això, el PML-RAR, actua com a factor de transcripció (encara que erroni) i intercanvi d'enzims, però amb la capacitat d'afectar el codi epigenètic de la cèl·lula (EX: metiltransferases, la forma de al cua de les histones, etc).

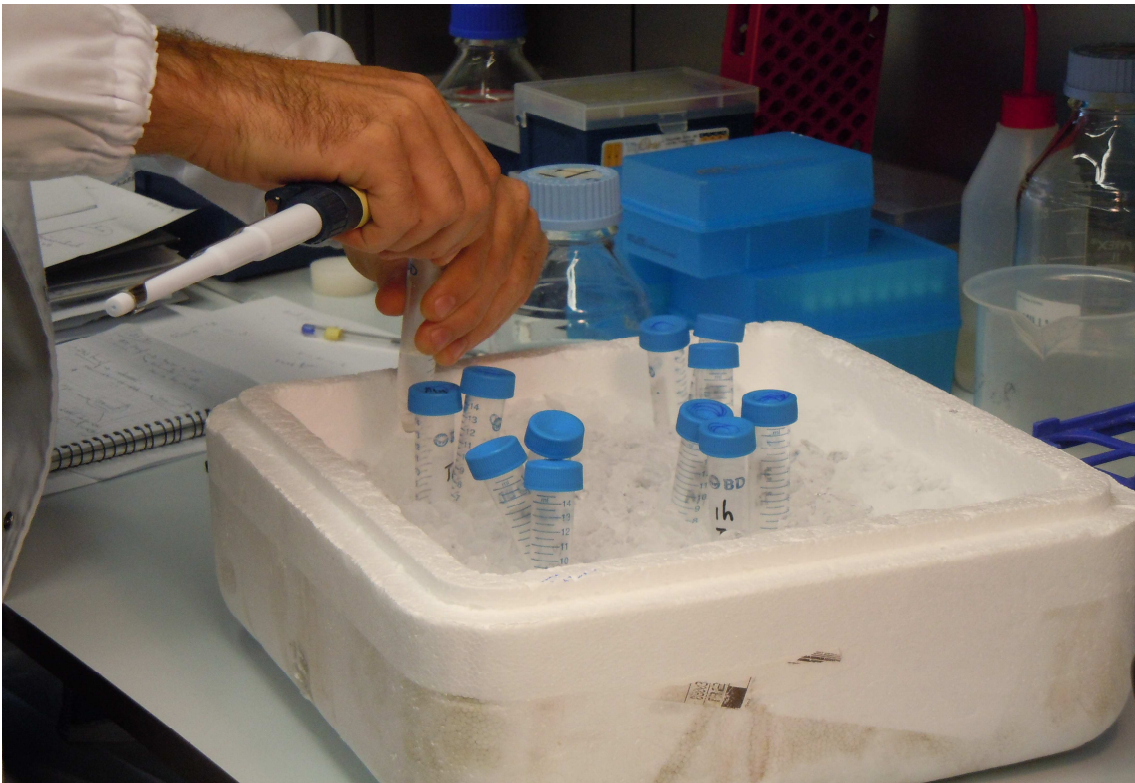
· Què en penses vostè sobre la manipulació genètica en humans? Pensa que l'epigenètica, quan coneguem millor els seus mecanismes, la podrem usar per a aquesta finalitat? Li sembla que podrem, d'alguna manera, desactivar canvis epigenètics que poden ser perjudicials per l'organisme? Pel que fa a la segona i tercera pregunta, efectivament, és una realitat, que estem usant l'epigenètica com a medi d'enginyeria genètica, fins hi tot, em sembla que existeixen fàrmacs que ho possibiliten. No obstant, per desactivar o activar depèn de quins gens, la epigenètica encara es troba en una fase massa prematura de desenvolupament, tot que no es tardarà gaire a obtenir múltiples fàrmacs per dits usos.

Pel que fa a la teva primera pregunta, la meva postura és progressista; es poden fer canvis per eliminar defectes genètics que afectin a la població. No obstant, em mostraria en desacord amb el que això pogués generar, un nou tipus de discriminació, la genètica. Desitjo que en un futur, no es discriminin els persones pels seus gens (EX: per un lloc de treball, no contractin a una persona, pel fet que, genèticament, és més probable que pateixi alzheimer precoç).

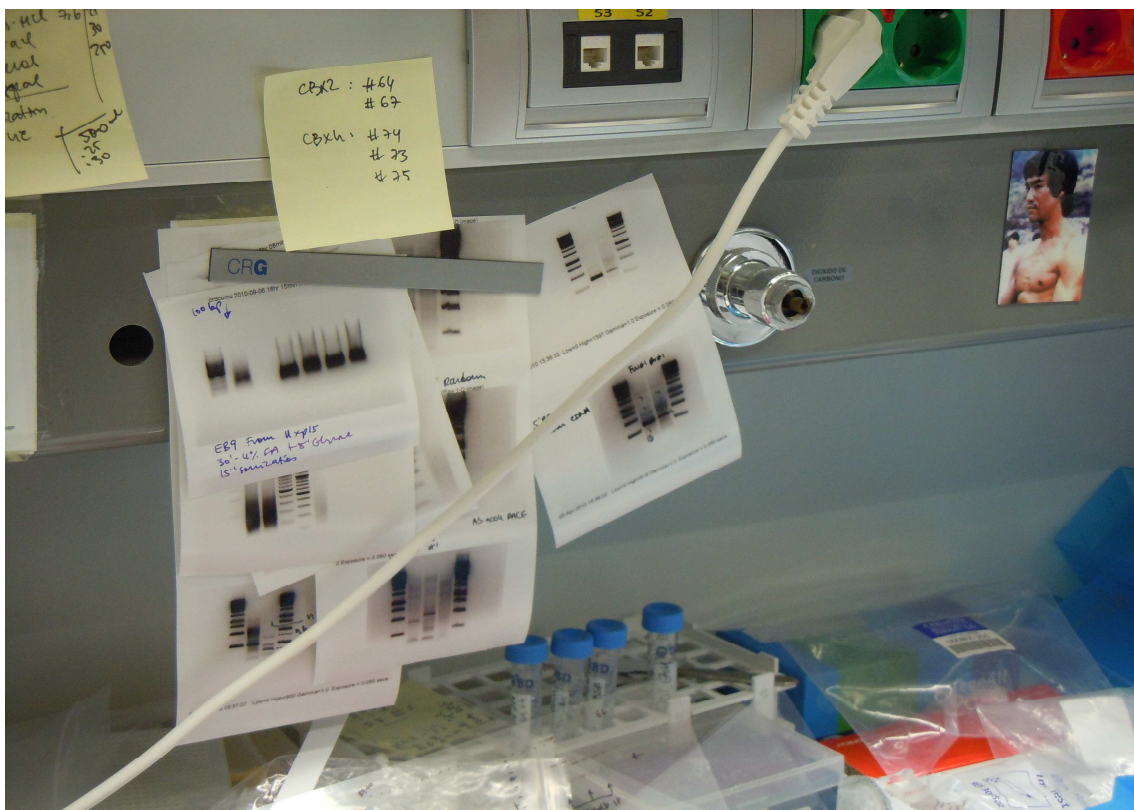
· La majoria dels mecanismes epigenètics coneguts impliquen la modificació dels components majoritaris de la cromatina, és a dir, el DNA i les histones. Aquesta modificació, entenent que també es poden donar en les cèl·lules sexuals, es transmet a les següents generacions? Efectivament, si s'aconsegueix que dita modificació (per exemple una metilació de novo), es produeixi en una cèl·lula sexual, és molt possible que passi a la descendència, el que provocaria que dita modificació, passaria de ser, una modificació puntual o de novo, en G1; a ser una modificació constitutiva o de manteniment, en G2. Aquests canvi, formaria part del que anomenem epigenètica transgeneracional. A partir del canvi en G2, cal suposar que en G3, G4, etc, el canvi es mantindrà (sempre hi quan les lleis de l'herència dels cromosomes de Mendel ho permetin) en les següents generacions, però és molt possible, que el canvi perdi part de la seva força, que es degradi.

· Quins elements té en un laboratori per treballar l'epigenètica? Més endavant, si vos, podem anar a veure els instal·lacions, però bàsicament, un laboratori epigenètic no existeix, normalment, sol ser un laboratori genètic (amb els equipaments pertinents) amb reactius diferents.

· Podem veure les instal·lacions? *Naturalment, ara anirem a veure el laboratori general i unes quantes càmeres més.*



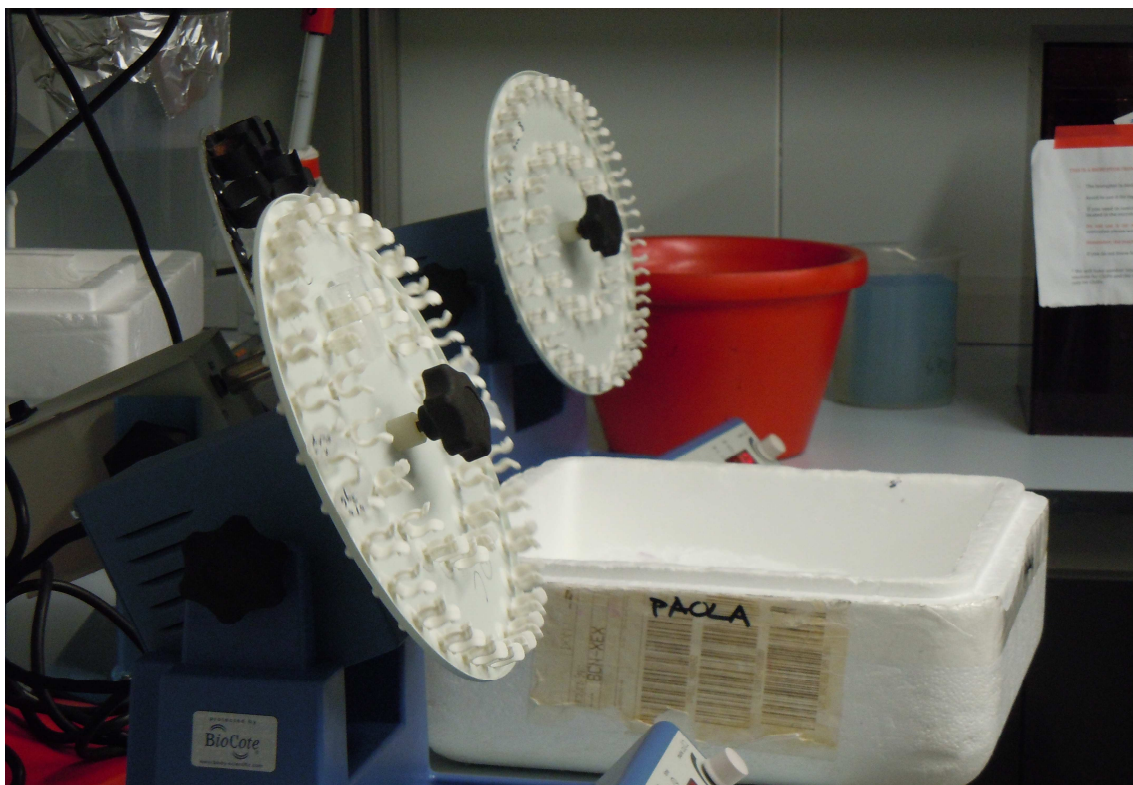
Operari amb mostres de DNA



Taula amb cariotips i mostres vaires



Taula bàsica de treball al CRG



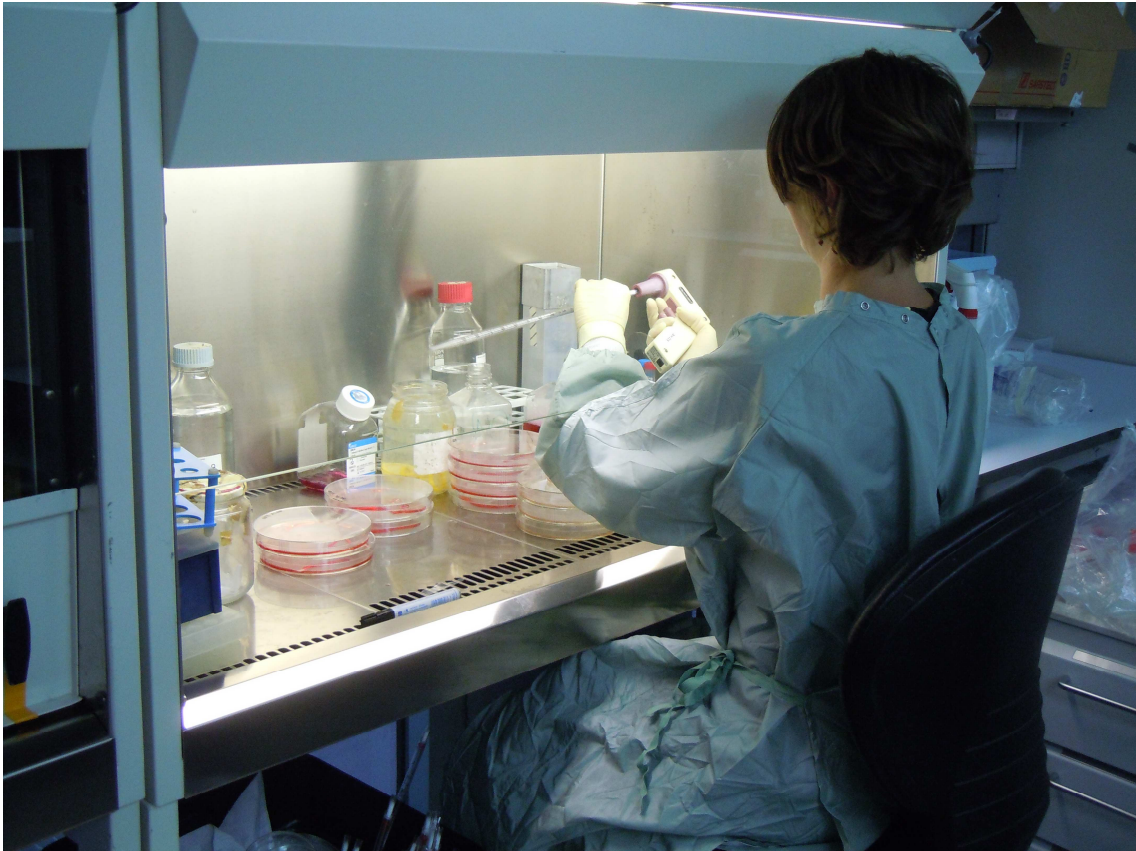
Centrifugadores



Magatzem de material



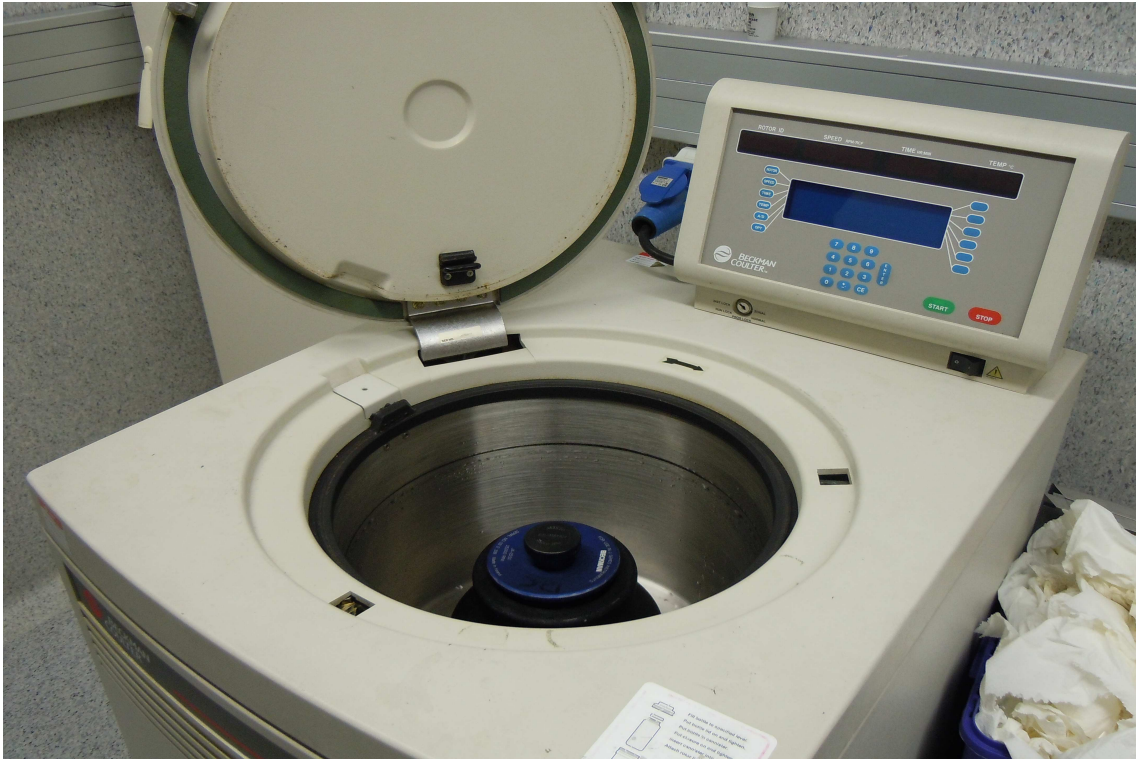
Aparell microclimàtic per a reproducció de mostres



Operaria manipulant mostres



Càmera de refrigeració (-40°C)



Turbocentrifugadora

7.3.3. Entrevista adaptada al Dr. Juan Antonio Subirana, actualment al grup de recerca MACROM de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona [14/10/2010].

· Quina ha estat la seva trajectòria professional? *Sóc doctor en ciències químiques i enginyeria industrial (que vaig cursar entre Barcelona i Madrid). Actualment sóc professor emèrit de la UPC. Abans d'adquirir la meua càtedra aquí a Barcelona (1966), vaig ser:*

·19960-61, Investigador a la Universitat de París.

·1961-1963, "Research Fellow" a la universitat de Harvard.

·1963-64, "Weizmann Fellow" al Institut Weizmann, Israel.

·1964-65 Becari post-doctoral a la universitat de Barcelona.

·1965-1966 Col·laborador científic del CSIC al Centre de genètica humana i animal i professor associat a la universitat de Houston, EEUU.

Durant tots aquests anys, he rebut diferents distincions pel meus treballs en: polímers sintètics i biològics, en difracció de raigs X, en renaturalització del DNA i en proteïnes nuclears (histones i protamines).

· Quins són els seus darrers treballs?

Recentment, ens hem estat dedicant a la "bioinformàtica", concretament en l'estudi del DNA no-codificant. Si recordem, fa un temps, es considerava el DNA no-codificant com DNA escombraries; doncs sembla que actualment té alguna funció.

Ens hem adonat que curiosament, aquests seqüències, tot hi aparentment no codificar per res en concret, es repeteixen moltíssimes vegades al llarg del DNA (cosa que ens va representar una pista a l'hora de decidir si buscar o no la seva funció).

· Quina és la que considera com la seva millor recerca o descoberta científica, al llarg de la seva història com a investigador? *Més que una descoberta, per a mi, el que ha representat més importància ha estat l'ensenyament i formació de nous doctors, els quals han posseït els seus propis mèrits personals (catedràtics, caps de grups de treball, cristal·lografs, etc). És com si els considerés els meus deixebles.*

Però, si hagués d'escollir una descoberta científica de la meua carrera, escolliria la meua recerca dels últims 10 anys: la descoberta (o ratificació si ho prefereixes) de l'aparició d'una

configuració AT anòmala dins el DNA: la timina i l'adenina, estan unides d'una forma diferent a la típica Watson-Crick.

Això està íntimament lligat al treball del Dr. Hoogsteen, el qual va demostrar que el dímer AT estan units de diferents maneres quan no formen part del DNA.

El que el meu equip i jo vam descobrir, va ser que en ocasions el tipus d'unió d' AT en el DNA pot ser com el que va descobrir Hoogsteen. Això demostra que el model Watson-Crick no es universal.

· Per a vostè, que és la biologia i la química? Ràpidament, et diria que juntament a la física i a les matemàtiques, és la resposta als curiosos. UN bon científic, independentment de l'àmbit en que treballi a de ser curiós; si tens això, ja tens molt de guanyat, la resta, és senzillament aprendre. Aquestes 4 disciplines, no són res més que medis per satisfer-la curiositat dels científics: saber el que ens envolta, com es produeix X fenomen, podrem predir X fenomen?, etc.

· Aquest segle XXI, així com ha començat a ser-ho el segle XX, diuen que serà el segle de la biologia, gràcies a tots els avenços, sobretot a partir de la descoberta del genoma humà que ha obert tot un món de possibilitats. Li sembla que queda molt camí a fer en la biologia? Quin seria un bon camí per tirar endavant una bona recerca? Naturalment! En els últims 50 anys em après molt en tots els camps científics, però és una part tant minúscula del que encara ens queda per fer, que és gairebé ridícul.

· I la biologia molecular? Primer de tot, biologia molecular, ja és un terme en desús, doncs tota la Biologia es molecular!!! (coses de la ciència, avança molt ràpid...) actualment és més correcte parlar de biologia estructural o genòmica (en cas que et centris exclusivament amb el DNA).

La biologia estructural, presenta una sèrie de problemes metodològics, degut a que depèn gairebé exclusivament de la obtenció de cristalls proteics (els qual cal fer i tractar) i de la ressonància magnètica nuclear o X-Ray (en que moltes vegades és necessari enviar mostres al Sincrotró europeu de Grenoble, però d'aquí poc, ja podrem usar l'ALBA). A més en la tècnica dels cristalls, no tot és observable; són necessaris nous mètodes més eficaços.

· La biologia molecular i la genètica coincideixen en alguns aspectes, síntesi i transformació de DNA, factors d'activació... de quina manera camps diversos de la ciència posen en comú els seus avenços, per tal d'optimitzar les investigacions? (Congressos, articles comuns..?)
Bàsicament, com ja has dit, a partir de congressos i els resultats (que són els treballs en equip); tot i que, el més important és el traspàs d'informació d'un departament a un altre, amb la col·laboració de mètodes, de material experimental, repartiment de la feina, etc. És gràcies al "companyerisme acadèmic" (amb una mica de competitivitat) el que permet que els descobriments es produeixin, sense això, no seria possible.

· I l'enginyeria genètica? *És un terme molt ambigu, però si s'entén com a organisme genèticament modificat, diria que per resoldre problemes de la nostre societat (com la manca d'aliments o de medicaments), estaria a favor de dites mesures, però caldria anar alerta. Si i entréssim en el camp de científics que volen sintetitzar organismes nous des de zero, em posicionaria en un lloc més conservador, és un procés realment complexes i no sabem els resultats que pot tenir, és molt perillós. Si parléssim de modificacions extenses en el DNA humà, diria rotundament no.*



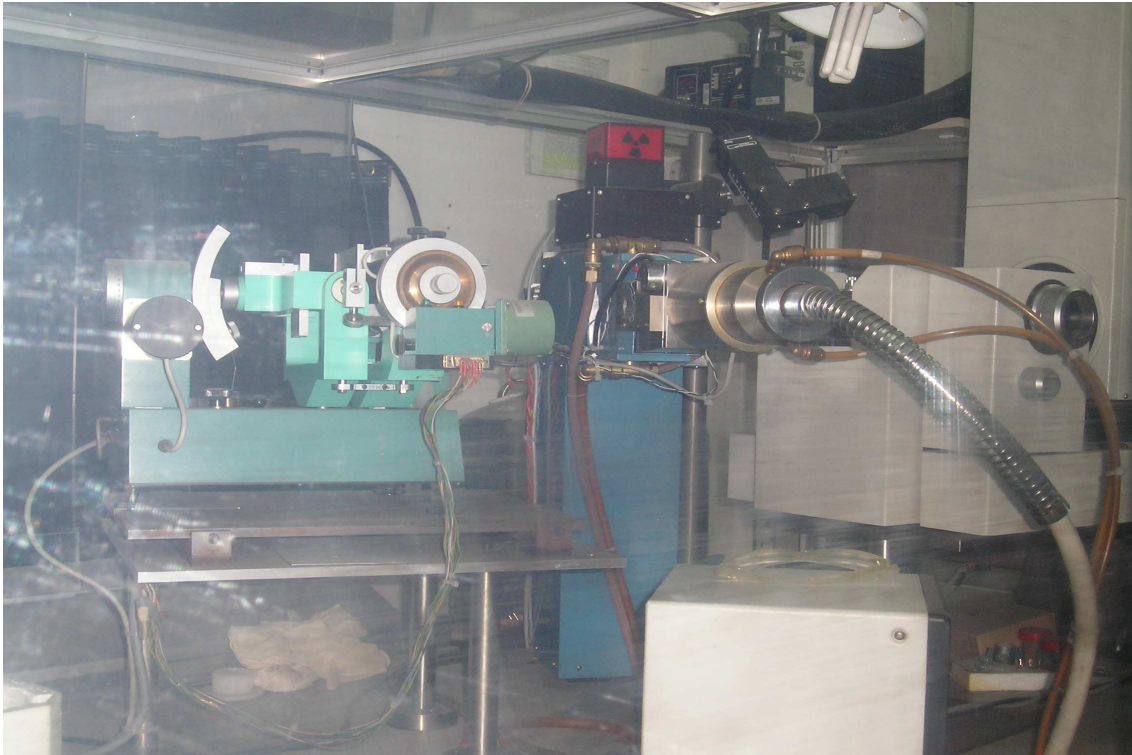
Incubadora de bacteris recombinants



Separació de la proteïna amplificada de la resta d'impureses



Cristalls proteics en refrigeració a uns 5°C



Màquina de difracció de raig X



Processant dades d'una difracció.



Dr. Subirana i associats al Sincrotró de Grenoble.

7.4. ANNEXOS MULTIMÈDIA:

En el CD adjunt es troben un seguit d'articles interessants sobre el tema (alguns de llarga extensió).

Aquests documents, no són essencials per comprendre el treball, no obstant, són una aportació interessant d'informació.

Al CD hi ha continguts 3 documents:

- Un dels documents és un repàs de les teories evolutives i el llegat de C. H. Waddington (pare de l' epigenètica); comentat per la Dr. Linda Van Speybroeck (Universitat de Ghent, Bèlgica).
- Un altre documents, és un petit article del manual del ICCAT (sobre l' *Auxis Rochei*).
- L' últim document, que tracta sobre els efectes i procediments del bisulfit sòdic (editat per EpiTect).