

EL GENOMA

FOSC

**Estudi de l'efecte dels microARNs en la
transcripció gènica**



Pseudònim: Myc

ÍNDIX

1. PRESENTACIÓ	1
2. INTRODUCCIÓ	4
2.1. EXPRESSIÓ GÈNICA	4
2.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA	9
2.2.1. Regulació gènica en cèl·lules procariotes	10
2.2.2. Regulació gènica en cèl·lules eucariotes	10
2.3. REPLICACIÓ DE L'ADN	11
2.3.1. Cicle cel·lular	11
2.3.2. Estructura de l'ADN	13
2.3.3. Model de replicació de l'ADN	18
2.4. Els microARNs	23
2.4.1. Definició	23
2.4.2. Ruta de ribointerferència	24
2.4.3. Mecanisme d'acció dels microARNs	26
2.5. DROSOPHILA MELANOGASTER:	26
2.5.1. Cicle vital de Drosophila Melanogaster	26
2.5.2. Diferència entre mascle i femella en Drosophila Melanogaster:	28
2.5.3. Genètica de Drosophila Melanogaster	29
2.5.4. Disc d'ala de Drosophila Melanogaster	30
2.5.5. Efecte del microARN en el creixement de les ales	34
2.6. EPIGENÈTICA	35
2.7. NUTRIGENÒMICA	38
2.8. ALGUNES APLICACIONS EN LA RECERCA D'EPIGENÈTICA	41
2.8.1. Càncer i epigenètica	44
3. METODOLOGIA	48
3.1. INTRODUCCIÓ	48
3.2. EFECTE DELS microARNs EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA:	49
3.3. FUNCIÓ DE Myc EN DROSOPHILA MELANOGASTER	55

3.3.1. Dissecció discs d'ala:.....	55
3.3.2. Immunotinció de discos marginals de Drosophila Melanogaster.....	56
3.4. PAPER DE MEI-P26 EN L'EXPRESSIÓ DE Myc.....	57
4. RESULTATS i ANÀLISIS.....	62
4.1. EFECTE DELS microARNs EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	62
4.2. FUNCIÓ DE Myc EN DROSOPHILA MELANOGASTER.....	69
4.3. PAPER DE MEI-P26 EN L'EXPRESSIÓ DE Myc.....	71
5. CONCLUSIONS:.....	75
6. BIBLIOGRAFIA.....	79

1. PRESENTACIÓ

En aquest treball de recerca s'ha posat èmfasi a aprofundir en la genètica molecular a partir dels processos d'expressió gènica investigant el seu mecanisme de regulació. També s'ha entrat en matèria sobre el procés de replicació de l'ADN, una fase fonamental per al procés d'expressió de la informació genètica. Un dels altres objectius principals ha estat conèixer el concepte d'epigenètica i veure les possibles aplicacions en el camp de medicina i la nutrigenòmica.

Per tal de demostrar la presència de processos de regulació de l'expressió gènica en la mosca *Drosophila Melanogaster* s'ha portat a terme diferents experiments, ja que l'estudi d'aquests processos pot representar el punt de partida en una possible investigació en teixits humans que podria tenir aplicacions en la medicina. Els principals objectius pràctics per a dur a terme la demostració han estat:

- Determinar quina funció compleix la maquinària de microARNs en el creixement de l'ala de la *Drosophila Melanogaster*, per tal de veure si aquesta maquinària és realment un factor regulador de l'expressió gènica.
- Identificar el gen responsable del creixement de l'ala sotmès a la regulació per microARNs, per a comprovar el procés d'expressió gènica i conèixer alguns factors reguladors d'aquest.
- Determinar quina proteïna es troba regulada per microARNs i promou la degradació del gen responsable del creixement de l'ala en les mosques *Drosophila Melanogaster*. D'aquesta manera, es podria afirmar la presència de factors reguladors i d'expressió genètica en els organismes vius, fenòmens que poden aportar moltes aplicacions en la medicina present a l'any actual (2016) pel fet de tenir la capacitat de modificar l'expressió de la informació genètica.

S'ha concebut aquest tema pel treball de recerca a partir dels assessoraments rebuts per part de diferents professionals de l'àmbit de la ciència i a partir de la bibliografia consultada fruit del meu interès personal per aquest camp temàtic.

Més concretament, la llavor d'aquest treball va començar en una discussió amb una professional del sector biomèdic que va esmentar el concepte d'epigenètica, és a dir, l'estudi de com l'ambient i l'experiència dels individus poden influir en l'expressió dels gens i la transmissió dels caràcters adquirits d'una generació a la següent. Després de rebre informació de les diferents propostes que el professorat de l'escola havia suggerit pels treballs de recerca, va néixer interès per "L'alimentació i les emocions", amb l'objectiu d'investigar la relació que hi ha entre la dieta i l'estat emocional de la persona. Finalment, es va intentar relacionar l'epigenètica amb el tema proposat pels professors, i en va resultar la nutrigenòmica.

Durant la participació a un curs científic, es va desviar l'atenció del projecte en realitzar una sèrie d'investigacions per demostrar la presència de processos de regulació de l'expressió gènica (epigenètica). A més, per tal de donar a conèixer la importància d'aquest procés s'ha buscat quines són les seves aplicacions i altres temes relacionats.

De seguida em vaig sentir atreta pel tema ja que en tenia bons coneixements, i a més, sento molt afecte pels laboratoris i la recerca. Certament, m'agradaria dedicar-me a l'experimentació per tal de conèixer com tractar malalties o alteracions. També penso que la nutrició és un factor molt important a tenir en compte per tal de gaudir d'una bona salut, així que he relacionat el treball amb la nutrigenòmica.

Per donar resposta als objectius plantejats, es va buscar bibliografia per recollir formació suficient per tal de realitzar la part experimental del projecte al laboratori. Així doncs, es pot considerar que la recerca ha estat fonamentalment, bibliogràfica i experimental.

Quan es van haver finalitzat les sessions pràctiques i se'n van haver obtingut resultats, es va procedir a redactar informes amb la descripció de la metodologia dels experiments i dels resultats, i el seu anàlisi. Tot seguit, es va elaborar la descripció teòrica que aporta el coneixement necessari per poder entendre la finalitat d'aquesta experimentació i les conclusions obtingudes a partir dels resultats. Seguidament, es va acabar d'escriure la presentació amb els objectius, les motivacions, la metodologia, la descripció d'algunes dificultats a l'hora de fer el treball i els agraïments. També es va elaborar un índex, es va dissenyar una portada pel treball i es va introduir totes les fonts bibliogràfiques consultades per a la realització del treball. Per acabar, es va estructurar el projecte tot seguint l'ordre establert a l'índex i es va donar el treball per finalitzat després d'un acurat repàs.

Al llarg de l'elaboració del treball de recerca han sorgit petites controvèrsies o dificultats a la part experimental i a l'hora de redactar el marc teòric ja que és un tema molt complex. Una de les dificultats experimentals es tracta d'un error lamentablement repetitiu degut a l'ús d'un ARN d'interferència que no era prou potent per a dur a terme la seva funció reguladora en l'expressió gènica, com a conseqüència, a més d'una despesa econòmica degut a l'ús de material no útil, els resultats obtinguts no variaven respecte les condicions inicials ja que la maquinària utilitzada no produïa cap efecte.

Per altra banda, la principal dificultat a l'hora de redactar el marc teòric ha estat limitar el treball ja que és un tema molt obert i de seguida sorgeixen noves branques de recerca. A més, per tal d'elaborar una descripció teòrica s'ha hagut d'utilitzar un vocabulari científic i a vegades difícil de comprendre, però sempre s'ha intentat incloure explicacions per la majoria de tecnicismes. Pel fet de ser un projecte tan específic, alguns cops ha sigut difícil trobar algun tipus d'informació detallada per a poder donar explicació a alguns fenòmens, però tot consultant a la bibliografia recomanada o consultant als experts s'han acabat trobant les respostes.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. EXPRESSIÓ GÈNICA

L'expressió d'un gen fa referència al fet que aquest sigui transcrit, traduït i que la proteïna resultant sigui funcional. Per tal de poder comprendre el concepte de regulació de l'expressió gènica, cal conèixer el **dogma de la genètica molecular**¹, és a dir, una hipòtesi suggerida al 1958 per Francis Crick que constata el flux de la informació genètica segueix exclusivament des de l'ADN passant per l'ARN fins a la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes. Es tracta d'un coneixement fonamental basat en la genètica posterior al descobriment que els caràcters hereditaris o gens es troben als cromosomes o molècules d'ADN. A més, la genètica molecular no només explica on es troba la informació genètica a nivell molecular, sinó que també dóna explicacions per a l'expressió d'aquesta, i per altra banda, elabora una definició diferent pel concepte de gen respecte a la genètica clàssica, tot explicant que un gen consisteix en un fragment d'ADN que conté informació per a la síntesi d'una proteïna.

DOGMA DE LA GENÈTICA MOLECULAR:

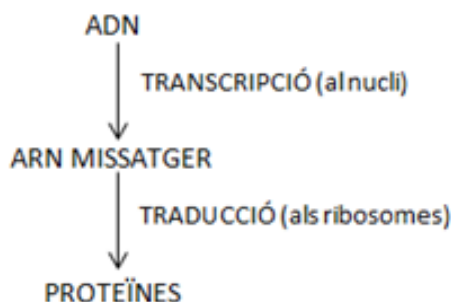


Figura 1: Esquema del dogma de la genètica molecular

¹ WIKIPEDIA. (2016). *Dogma central*. [en línia]. [Consultat: 10 agost 2016]. Disponible a Internet: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Dogma_central>

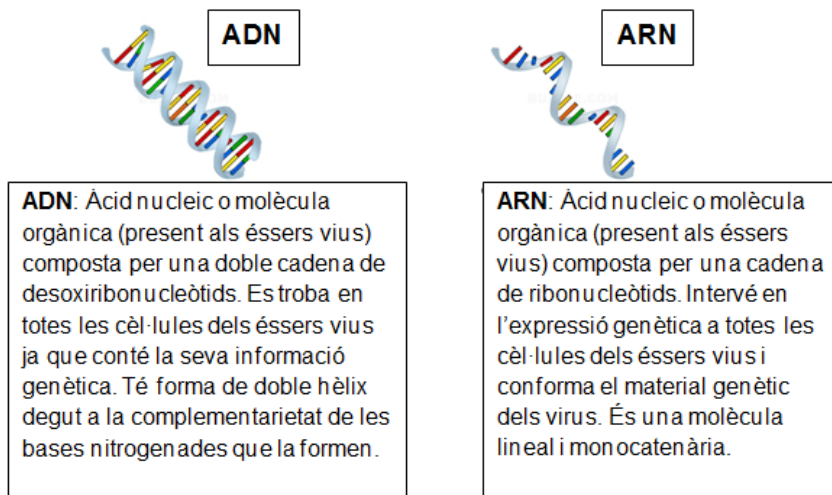


Figura 2: Descripció de la definició d'ADN i ARN

L'ADN està estructurat en diferents fragments que ens aporten informació genètica i s'anomenen **gens**.

L'ARN representa una còpia complementària d'un fragment d'ADN o gen. Aquesta complementarietat s'estableix entre les bases nitrogenades, és a dir, uns components dels nucleòtids o monòmers que componen l'ARN i l'ADN. Hi ha dos tipus de **nucleòtids** segons la molècula on es troben:

- **Desoxiribonucleòtids:** Es troben a l'ADN, molècula que conté la informació genètica dels éssers vius. Un desoxiribonucleòtid està compost per una de les quatre bases nitrogenades següents: adenina (A), timina (T) citosina (C) i guanina (G), unida a un sucre reductor que en el cas de l'ADN es tracta de la desoxiribosa, que alhora es troba unida a un grup fosfat.²
- **Ribonucleòtids:** Es troben a l'ARN, molècula que intervé en l'expressió de la informació genètica dels éssers vius. Cadascun d'aquests està compost per una de les quatre bases nitrogenades següents: adenina (A), uracil (U), citosina (C) i guanina (G), unida a un sucre reductor que en el cas de l'ARN es tracta de la ribosa, que alhora es troba unida a un grup fosfat.

² NELSON, DAVID. «Nucleotides and Nucleic Acids». A: Lehninger's Principles of Biochemistry. W.H.Freeman, 2004. 0716743396.

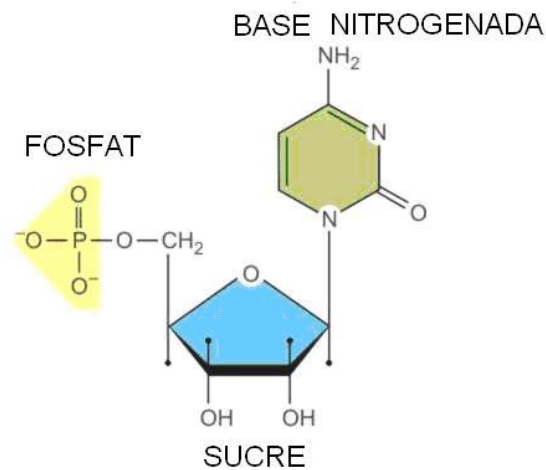


Figura 3: Imatge dels components d'un nucleòtid
Font: Xtec

Hi ha tres tipus d'ARN diferents³:

- **ARN missatger:** És sintetitzat al nucli de les cèl·lules eucariotes o a la regió nuclear de les procariotes. La seva seqüència de bases és complementària a la d'un fragment d'una de les cadenes d'ADN, amb la particularitat que allà on l'ADN tingui una A (amina), l'ARN copiat tindrà un U (uracil) en comptes d'una T (timina)⁴. Un cop sintetitzat, a les cèl·lules eucariotes surt al citoplasma on s'associa als ribosomes⁵ i actua com a matriu sobre la qual s'aniran col·locant, en l'ordre dictat per la seqüència de bases, els aminoàcids que formaran la proteïna.⁶
- **ARN transferidor:** Responsable de transportar aminoàcids, els components de les proteïnes, cap als ribosomes. Cada aminoàcid té un ARNt i aquest reconeix on l'ha de col·locar segons la informació que aporta la seqüència d'ARN missatger quan s'està produint la síntesi de la proteïna.

³ WIKIPEDIA. (2016). *Ribosoma*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>>

⁴ Veure figura 6

⁵ WIKIPEDIA. (2016). *Ribosoma*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>>

⁶ AULA3. (2011). *Estructura dels ARNs*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<http://aulatres.wikispaces.com/Estructura+dels+ARNs>>

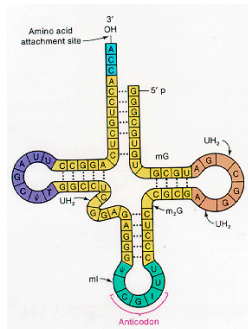


Figura 4: Imatge d'ARN transferidor

Font: <http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap05/Chapter05.html>

- **ARN ribosòmic:** Part constitutiva dels ribosomes⁷, únicament té funció estructural. És el més abundant a les cèl·lules.

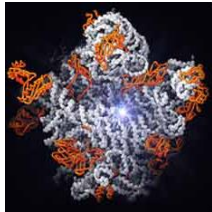


Figura 5: Imatge d'ARN ribosòmic

Font: Wikipedia

Aquesta còpia d'ADN anomenada ARN es sintetitza al nucli mitjançant el procés de **transcripció** que consisteix en transformar un fragment d'ADN en ARN per tal que es pugui expressar la informació genètica. Durant aquest procés simplement es produeixen alguns canvis de lletres (bases nitrogenades) ja que l'ADN conté timina però no uracil, i l'ARN a la inversa.

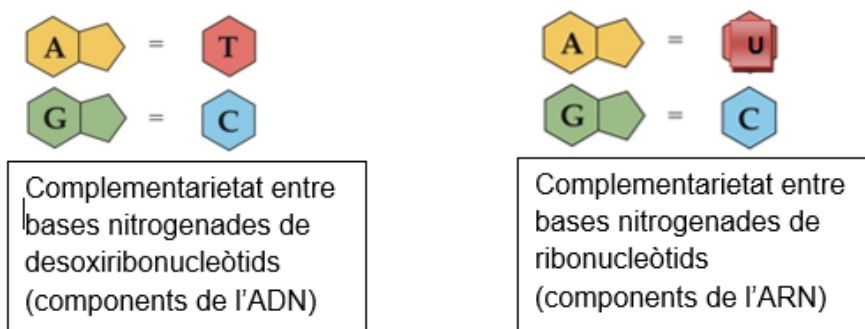


Figura 6: Esquema de la complementarietat entre bases nitrogenades d'ADN i ARN

Font: <http://timerime.com/es/evento/1958920/Disposicin+de+las+bases+nitrogenadas/>

⁷ WIKIPEDIA. (2016). *Ribosoma*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>>

Un cop s'ha produït el procés de transcripció es passa a la següent fase que s'anomena **traducció**, on l'ARN missatger que ha estat sintetitzat al nucli arriba als ribosomes i es fabriquen proteïnes a partir de la informació genètica que aporta l'ARN missatger. Aquest fet proporciona la possibilitat de l'expressió genètica. Durant la traducció, es produeix un canvi de llenguatge de nucleòtids (components ADN i ARN) a aminoàcids (components proteïnes) mitjançant un codi genètic.

Primera base (extremo 5')	Segunda Base								Tercera base (extremo 3')
	U		C		A		G		
U	UUU	fenil-alanina	UCU	serina	UAU	tirosina	UGU	cisteïna	U C A G
	UUC		UCC		UAC		UGC		
	UUA	leucina	UCA		UAA	stop	UGA	stop	
	UUG		UCG		UAG		UGG	triptòfano	
C	CUU	leucina	CCU	prolina	CAU	histidina	CGU	arginina	U C A G
	CUC		CCC		CAC		CGC		
	CUA		CCA		CAA	glutamina	CGA		
	CUG		CCG		CAG		CGG		
A	AUU	isoleucina	ACU	treonina	AAU	asparagina	AGU	serina	U C A G
	AUC		ACC		AAC		AGC		
	AUA	metionina	ACA		AAA	lisina	AGA	arginina	
	AUG		ACG		AAG		AGG		
G	GUU	valina	GCU	alanina	GAU	àcido aspàrtico	GGU	glicina	U C A G
	GUC		GCC		GAC		GGC		
	GUA		GCA		GAA	àcido glutàmic	GGG		
	GUG		GCG		GAG		GGG		

Figura 7: Esquema del codi genètic

Font: <https://llunadeneu.wordpress.com/2008/10/19/codi-genetic/>

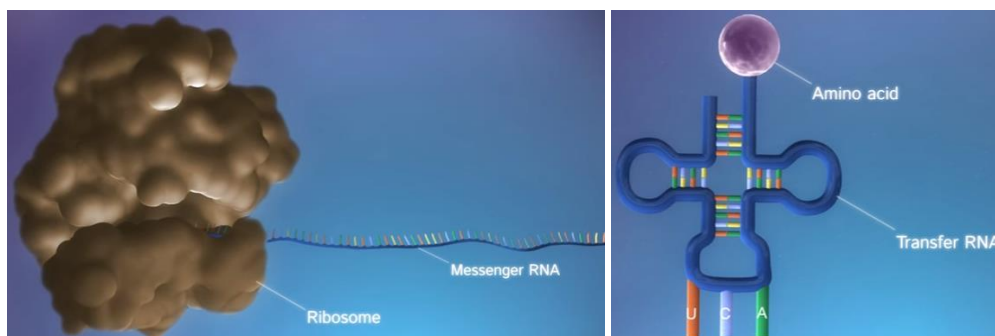




Figura 8: Vídeo del procés de transformació d'ADN a proteïnes
 Font: <https://www.youtube.com/watch?v=gG7uCskUOrA>

Proteïnes⁸: Molècules formades per la unió lineal d'aminoàcids, dels quals n'hi ha 20 diferents, que s'uneixen mitjançant enllaços peptídics.

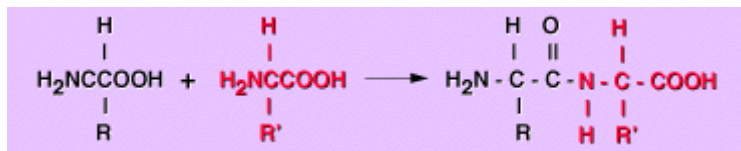


Figura 9: Enllaç peptídic
 Font: <http://www.geocities.ws/terrabis2002/bioquimica/prenlace.gif>

Si una cèl·lula no té una informació és incapaç de construir una proteïna amb una seqüència determinada, així doncs, la seqüència de bases nitrogenades de l'ARN missatger aporta informació per tal de sintetitzar una seqüència d'aminoàcids que compon les proteïnes.

Per tal que la proteïna funcioni la seva seqüència sovint es troba replegada d'una determinada manera, per consegüent, les funcions d'una proteïna depenen de la seva estructura.

2.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

L'expressió d'un gen fa referència al fet que un gen sigui transcrit, traduït i que la proteïna resultant sigui funcional, és a dir, el conjunt de mecanismes que permeten l'expressió diferencial dels gens.

⁸ WIKIPEDIA. (2016). *Ribosoma*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>>

Totes les cèl·lules d'un organisme eucariota tenen la mateixa informació genètica però les grans diferències estructurals i funcionals que presenten són degudes a que cada cèl·lula expressa només uns gens determinats.

2.2.1. Regulació gènica en cèl·lules procariotes

La regulació es produeix durant la transcripció. Els gens que codifiquen pels enzims (proteïnes) es troben junts formant un complex anomenat **OPERÓ**, que consta de diverses parts:

- **Gens estructurals:** Codifiquen pels enzims, es transcriuen sempre.
- **Promotor:** Lloc on s'inicia la transcripció del gen.
- **Operador:** Situat entre el promotor i els gens. En aquest lloc s'hi pot unir una proteïna que actua com a repressor que bloqueja la transcripció.

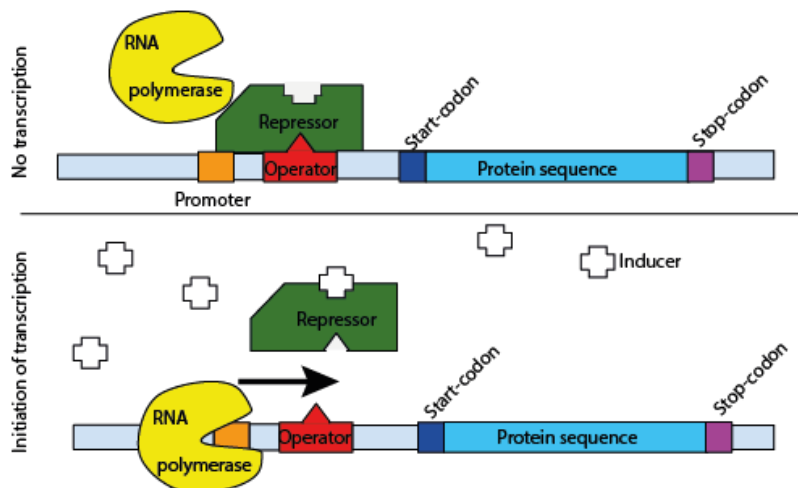


Figura 10: Parts d'un gen estructural

Font: <http://www.dnacoil.com/wp-content/uploads/2013/06/promook.png>

2.2.2. Regulació gènica en cèl·lules eucariotes

El control de l'expressió gènica en eucariotes és més complex que en procariotes degut a les causes següents:

- Els eucariotes tenen molts més gens repartits en molècules d'ADN.
- L'ADN es troba associat a les histones formant la cromatina.
- Hi ha una separació física entre la transcripció que té lloc al nucli i la traducció que té lloc al citoplasma (ribosomes).

És per això que la regulació gènica es dona a diferents nivells:

- **Regulació transcripcional (fase transcripció):** Control del grau de condensació de la cromatina (ADN) i presència de proteïnes que regulen l'expressió dels gens i que s'acoblen al grup promotor activant o no la transcripció del gen que precedeix.
- **Regulació post-transcripcional:** Diferents mecanismes referents a aquest tipus de regulació. Cal destacar **l'empalmament alternatiu** pel qual els diferents ARN missatgers resultants de la transcripció d'un gen poden traduir-se de diferents maneres, per tant, un sol gen pot codificar per a múltiples proteïnes.
- **Regulació de la traducció:** Diversos mecanismes que impedeixen la traducció d'un ARN missatger, entre ells, els microARN.

2.3. REPLICACIÓ DE L'ADN

Consisteix en el procés de duplicació o síntesi de noves molècules d'ADN que té lloc a cada generació cel·lular. En el cas de les cèl·lules eucariotes la replicació té lloc durant la fase S de la interfase.

2.3.1. Cicle cel·lular

Consisteix en els processos de divisió i proliferació, així com els punts de control de pas a cada fase del cicle de les cèl·lules. Tota cèl·lula prové de la divisió d'una altra cèl·lula preexistent (*Omnis cellula e cellula*). Entre una divisió i la següent, la cèl·lula travessa una sèrie d'etapes que formen el seu cicle cel·lular. Es pot distingir entre un període de repòs o interfase, i un període de divisió cel·lular. Durant la interfase el nucli aparentment no presenta cap activitat, mentre que al període de divisió pateix una sèrie de transformacions fàcilment observables amb el microscopi òptic:

- **Mitosi:** Les cèl·lules es divideixen i reparteixen equitativament el seu contingut nuclear i citoplasmàtic entre les dues cèl·lules filles. En primer lloc la cromatina (ADN) que ha estat duplicada en la fase S es condensa i forma unes estructures anomenades cromosomes que seran alineats,

separats i desplaçats cap als extrems de la cèl·lula. En segon lloc, el citoplasma es divideix assegurant que cada cèl·lula filla obtingui no solament un conjunt complet de cromosomes, sinó també els elements i orgànuls citoplasmàtics.⁹

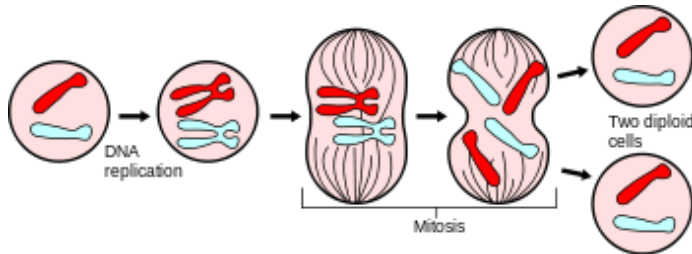


Figura 11: Parts d'un gen estructural

Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e0/Major_events_in_mitosis.svg/350px-Major_events_in_mitosis.svg.png

- **Interfase:** La cèl·lula es prepara per la divisió cel·lular, per tant, la informació genètica està en forma de cromatina. Aquesta fase es troba dividida en tres etapes⁹:
 - **G1:** És una fase de creixement que s'inicia immediatament després de la divisió cel·lular. Consisteix en una etapa d'intensa activitat metabòlica on els gens es transcriuen i es tradueixen per sintetitzar les proteïnes necessàries per al creixement cel·lular. Acostuma a durar aproximadament 11 hores, no obstant, fins que la cèl·lula no assoleix una determinada mida no pot passar a la fase següent.
 - **S:** Quan la cèl·lula assoleix unes determinades dimensions, s'ha de preparar per a la seva divisió; per això duplica prèviament el seu contingut genètic amb la finalitat que cada cèl·lula filla contingui una còpia idèntica del genoma (conjunt d'ADN de la cèl·lula). Aquesta és una fase de síntesi i replicació de l'ADN i finalitza quan el contingut d'ADN del nucli s'ha duplicat. Té una durada aproximada de 8 hores.

⁹ WIKIPEDIA. (2016). *Cicle cel·lular*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cicle_cel%C2%B7lular#Fase_M>

- **G2:** En aquesta etapa, preparatòria per a la mitosi, es transcriuen i es tradueixen certs gens responsables de l'aparició de les proteïnes necessàries per a la divisió cel·lular. Té una durada aproximada de 4 hores.

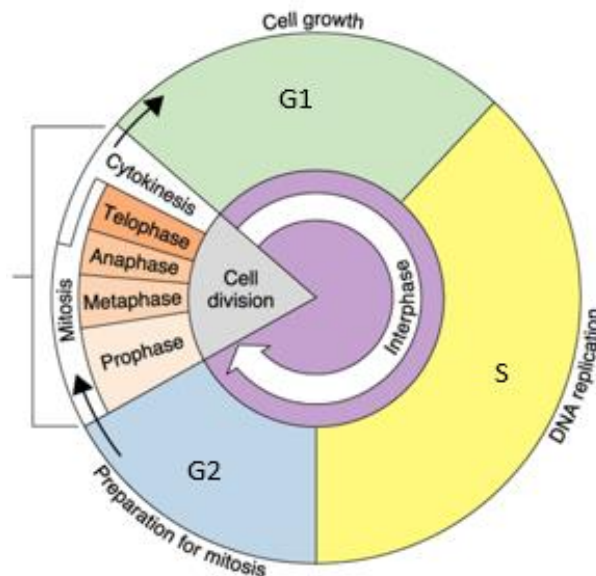


Figura 12: Cicle de divisió cel·lular

Font: http://images.slideplayer.com/36/10556125/slides/slide_7.jpg

2.3.2. Estructura de l'ADN

La **cromatina** és la substància que es troba a l'interior del nucli, formada per dos components ADN i proteïnes, ja que per tal de poder encabir tot l'ADN a l'interior del nucli, aquest s'associa amb unes proteïnes anomenades **histones**.

- Quan l'ADN està en forma de collaret de perles (estructura poc condensada - cromatina) es poden expressar els seus gens, és a dir, es poden transcriure.

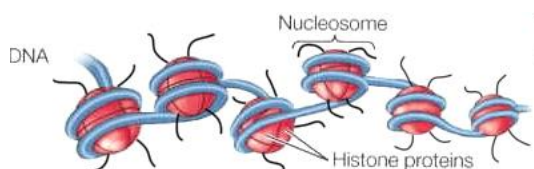


Figura 13: Estructura de collaret de perles o cromatina

Font: <http://cfile6.uf.tistory.com/image/1752EC594D71325F124EB2>

L'ADN es troba dividit en molècules. Una espècie té tantes molècules d'ADN com cromosomes.

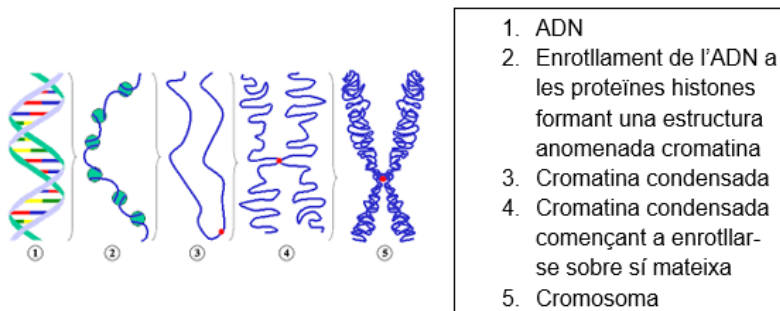


Figura 14: Procés de condensació de cromatina a cromosomes

Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/79/Chromatin_chromosome.png/300px-Chromatin_chromosome.png

Quan es dona la divisió cel·lular, l'ADN es troba en forma de **cromosomes**, una estructura molt condensada d'ADN, mentre que quan no es troba en procés de divisió cel·lular l'ADN es troba en forma de **cromatina**, una estructura poc condensada d'ADN. La cromatina pot estar poc condensada o molt condensada, però mai arribarà a tenir la condensació d'un cromosoma. La **condensació** és aquella propietat de l'ADN de cargolar-se per tal d'ocupar menys espai.

Si s'observa la imatge del nucli en un microscopi, es poden distingir zones més clares on la cromatina es troba poc condensada i zones més fosques on la cromatina es troba més condensada.

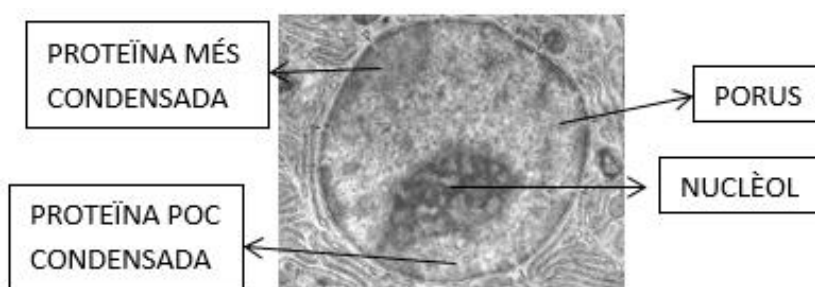


Figura 15: Nucli

Font: <http://img.webme.com/pic/b/biologiaiedcostarica/nucleoyucleolo.gif>

Segons el grau de condensació de la cromatina es pot distingir entre:

- **Eucromatina:** Cromatina poc condensada de manera que els seus gens es poden expressar, és a dir, són sotmesos als processos de transcripció i traducció.

- **Heterocromatina:** Cromatina molt condensada.
 - ✓ **Heterocromatina constitutiva:** ADN que no s'expressa mai en cap cèl·lula.
EXEMPLE: Al centròmer, una zona dels cromosomes on l'ADN fa de nexa.



Figura 16: Cromosoma: Centròmer

Font: <http://2.bp.blogspot.com/--pq2YvncHHw/UJvNvHtJyjl/AAAAAAAAACQc/ZQaOMkmQD-Q/s1600/cromosoma-cromatina-nucleosomas.jpg>

- ✓ **Heterocromatina facultativa:** Els gens de l'ADN no s'expressen, però pot variar en funció del tipus de cèl·lula.
EXEMPLE: El gen que codifica per a proteïnes pel creixement de cabells s'expressa en les cèl·lules que estan als cabells, però no a totes les cèl·lules del cos.

Al 1953 James Watson i Francis Crick proposen un **model estructural per a la molècula de l'ADN** basant-se en perquè té la capacitat d'emmagatzemar informació genètica i la seva funció.

Aquest model exposa que l'ADN és una molècula formada per dues cadenes de nucleòtids enllaçats mitjançant enllaços fosfodièster, és a dir, enllaços que uneixen el fòsfor d'un grup fosfat d'un nucleòtid, amb la desoxiribosa (sucre) del nucleòtid següent.

Les **dues cadenes** són **complementàries**, és a dir, estan formades per una seqüència de nucleòtids que només els hi varia la base nitrogenada, d'aquí en sorgeix el motiu de la seva representació visual mitjançant lletres. Així doncs, coneixent la seqüència d'una de les cadenes de nucleòtids es pot conèixer la seqüència de nucleòtids de l'altra. Aquest fet es demostra gràcies a les **proporcions de Chargaff** que descobreix que les dues cadenes són complementàries degut a la complementarietat que s'estableix entre bases nitrogenades (A-T / T-A / G-C / C-G).

Les bases nitrogenades complementàries poden establir enllaços dèbils entre elles, semblant als ponts d'hidrogen que són atraccions febles que es donen entre àtoms molt electronegatiu (tendència a captar electrons) i àtoms d'hidrogen de molècules d'un mateix compost.

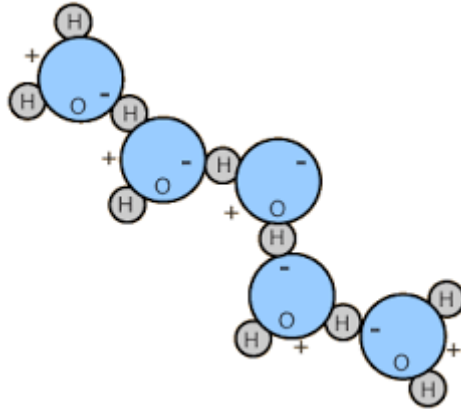


Figura 17: Ponts d'hidrogen entre molècules d'aigua

Font: https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT57uehpBi0BFAThzkqI7wwg6JhdsxnZq9G1kah8q6egFdqL_GH

Concretament entre l'adenina i la timina es poden establir dos enllaços, mentre que entre la guanina i la citosina n'hi ha tres. Aquests enllaços són els que mantenen les dues cadenes unides.

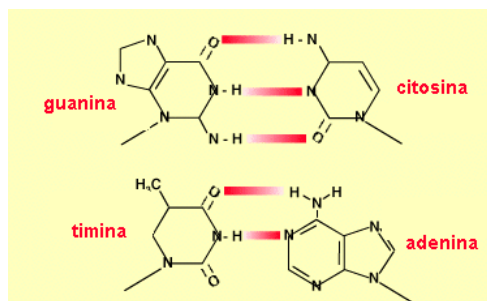


Figura 18: Enllaços entre bases nitrogenades

Font: <http://www.geocities.ws/terrabis2002/bioquimica/adnbases.gif>

Les dues cadenes de nucleòtids es troben formant una hèlix dextrògira (gira cap a la dreta) i s'enrotllen al voltant d'un eix imaginari fent que hi hagi un solc major i un solc menor (enrotllament plectonímic).

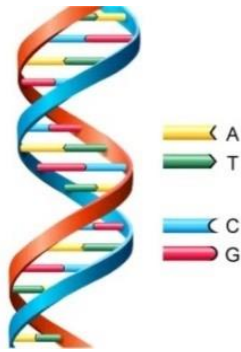


Figura 19: Estructura ADN

Font: <https://i.ytimg.com/vi/fRhpq5ED8M/maxresdefault.jpg>

L'estructura de l'ADN justifica les funcions que fa, ja que té una estructura bicatenària per tal de facilitar la replicació pel fet que si s'obren les cadenes cadascuna d'elles pot funcionar com a motlle i replicar-se de manera fidel. Aquesta estructura permet que la informació genètica emmagatzemada que s'ha de passar a la descendència sigui fàcil de copiar.

Per altre costat, el fet que la informació genètica estigui codificada en quatre lletres (bases nitrogenades): Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) i Guanina (G), que s'agrupen formant codons¹⁰, és a dir, estructures compostes per tres bases nitrogenades, que alhora s'agrupen formant gens que codifiquen per a proteïnes, fa que l'ADN tingui una estructura fàcil de llegir per tal de ser capaç de dirigir totes les activitats dels organismes.

Un cop descrita l'estructura tridimensional de l'ADN segons el model de Watson i Crick a l'any 1953, es va plantejar la qüestió sobre com es produïa la replicació de l'ADN ja que hi havia tres possibles hipòtesis al respecte¹¹:

- **Conservativa:** En la replicació de l'ADN, a partir d'una molècula se'n sintetitza una altra completament nova que es manté independent a la molècula original.
- **Semiconservativa:** Durant el procés de replicació, cadascuna de les dues hèlixs dels filaments d'ADN conté un filament íntegrament provinent de l'hèlix original i l'altre de nova síntesi.

¹⁰ WIKIPEDIA. (2016). *Ribosoma*. [en línia]. [Consultat: 12 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>>

¹¹ CLAUDIA CEBALLOS. (2011). *Las tres hipótesis de duplicación del ADN*. [en línia]. [Consultat: 16 agost 2016]. Disponible a Internet: <<http://biotec25dejulio.blogspot.com.es/2011/11/las-tres-hipotesis-de-duplicacion-del.html>>

- **Dispersiva:** En la replicació de l'ADN, les dues molècules filles es reparteixen.

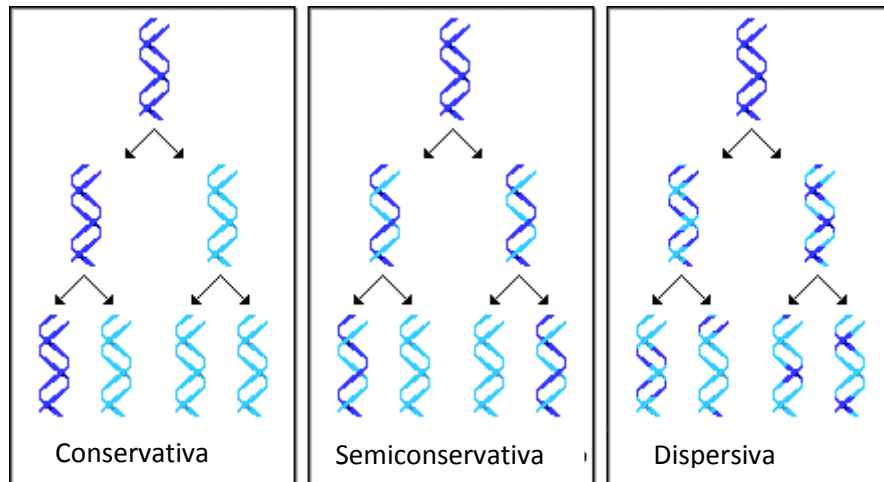


Figura 20: Models de replicació de l'ADN
 Font: <http://www.maph49.galeon.com/adn/repmodel.gif>

2.3.3. Model de replicació de l'ADN

Els experiments de Meselson i Stahl al 1958 demostraren que la replicació és **semiconservativa**.

Més tard, es va saber que la replicació s'inicia en punts concrets anomenats **orígens de replicació** on l'ADN s'obre i es comença a replicar, donant lloc a les **forquilles de replicació** que són estructures que es formen quan l'ADN s'obre.

Les cèl·lules procariotes tenen un únic origen de replicació, mentre que en les cèl·lules eucariotes hi ha diferents punts d'origen de replicació i la replicació es dona alhora a cadascun d'aquests.

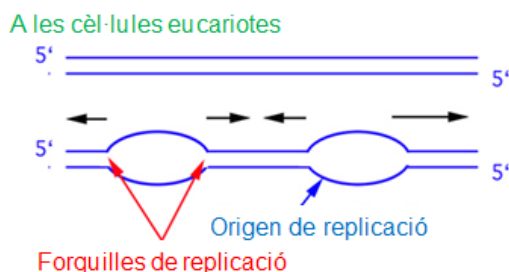


Figura 22: Punts d'origen de replicació en eucariotes
 Font: <http://genemol.org/biomolespa/Enzimas/enzima-06.jpg>

Més tard, es va qüestionar si la replicació començava al centre de les forquilles de replicació i tenia dues direccions (bidireccional) o si l'origen es trobava a un extrem de les forquilles de replicació i tenia una única direcció (unidireccional). Degut a la rapidesa en què es produïa la replicació es va deduir que era bidireccional.

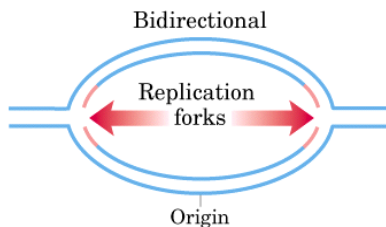


Figura 23: Replicació bidireccional

Font: <http://www.sakshieducation.com/CSIR/Images/MolecularBiology/Bi-directional.jpg>

La replicació de l'ADN consisteix en un conjunt de reaccions químiques que requereixen la presència d'enzims. Aquests mecanismes enzimàtics de replicació de l'ADN es van conèixer per primera vegada gràcies a la investigació bioquímica de A. Kornberg l'any 1956. Els experiments van ser realitzats amb el bacteri intestinal *Escherichia coli*.

En l'actualitat se sap que la replicació de l'ADN en cèl·lules procariotes té lloc en diverses etapes on intervenen una vintena d'enzims diferents. El conjunt d'enzims implicats en la replicació s'anomenen **sistema replicasa**:

1. Desenrotllament de l'hèlix

En primer lloc, cal separar les dues cadenes de la doble hèlix per construir la cadena complementària. L'enzim encarregat de separar aquesta estructura rep el nom d'**helicasa** i comença a l'origen de replicació on apareixen dues forquilles de replicació que avancen en les dues direccions. Per poder separar les dues cadenes cal energia que s'obté en forma d'ATP (nucleòtid compost per adenina, ribosa i tres fòsfors). Al mateix temps que l'helicasa separa les dues cadenes, la **topoisomerasa** (enzim) s'encarrega d'estabilitzar l'hèlix controlant que no hi hagi un superenrotllament.

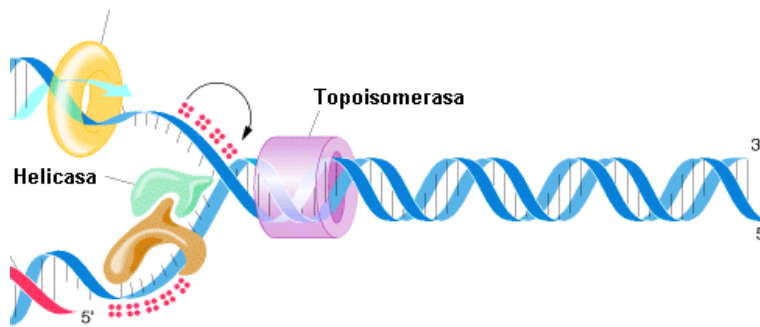


Figura 24: Procés de desenrotllament de l'hèlix

Font: http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/bach2/2genetica6_clip_image004.jpg

2. La síntesi de les cadenes complementàries

L'ADN polimerasa III és un dels enzims més importants durant la replicació ja que catalitza la síntesi de les cadenes noves seguint els criteris següents:

- Utilitza **nucleòtids trifosfat (ATP)** que en afegir-los perden dos grups fosfat **aportant l'energia** necessària per la formació del nou enllaç.

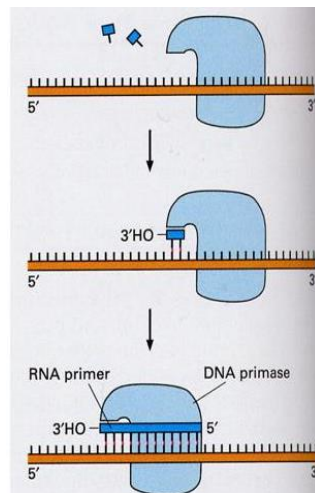


Figura 25: Síntesi de cadenes complementàries

Font: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/805/flashcards/132805/jpg/picture71331053105794.jpg>

- Afegeix **nucleòtids complementaris** a una **cadena motlle**.
- Només afegeix nucleòtids **en direcció 5' → 3'** d'una cadena complementària que ja estigui començada.

Per **iniciar la síntesi** cal un altre enzim anomenat **primasa** que inicia la síntesi col·locant una petita cadena complementària de ribonucleòtids. Aquest petit fragment d'ARN s'anomena **encebador o primer**.

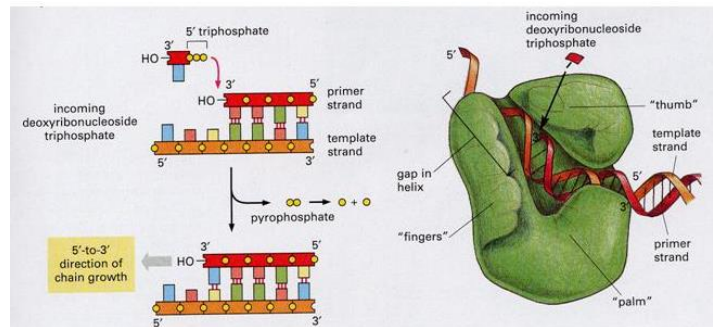


Figura 26: Síntesi de cadenes complementàries

Font: <http://www3.uah.es/biomolg/BM/Esquemas/imagenes/Transparencias%20Tema%203%20BM1/Diapositiva16.JPG>

Una de les dues cadenes un cop s'ha col·locat el primer o encebador es pot copiar de manera contínua, consegüentment, rep el nom de **cadena de síntesi contínua** ($5' \rightarrow 3'$). No obstant, l'altra cadena no es pot replicar de manera contínua ja que la ADN polimerasa només afegeix nucleòtids a l'extrem 3', així doncs, la replicació d'aquesta **cadena** es fa de manera **discontínua**: a mesura que va avançant la síntesi de la cadena contínua es van col·locant primers en direcció $5' \rightarrow 3'$ a la cadena complementària (cadena de síntesi discontínua). Per tal que aquesta cadena de síntesi discontínua es pugui replicar cal que la forquilla de replicació avanci deixant un fragment de la cadena motlle al descobert, quan la forquilla ha avançat es col·loca un primer o encebador i es replica aquest petit fragment. La forquilla torna a avançar i es replica el següent fragment, i així successivament, de manera que la síntesi avança fragment a fragment. Aquests fragments s'anomenen **fragments d'Okazaki**, en honor al científic que els va descobrir.

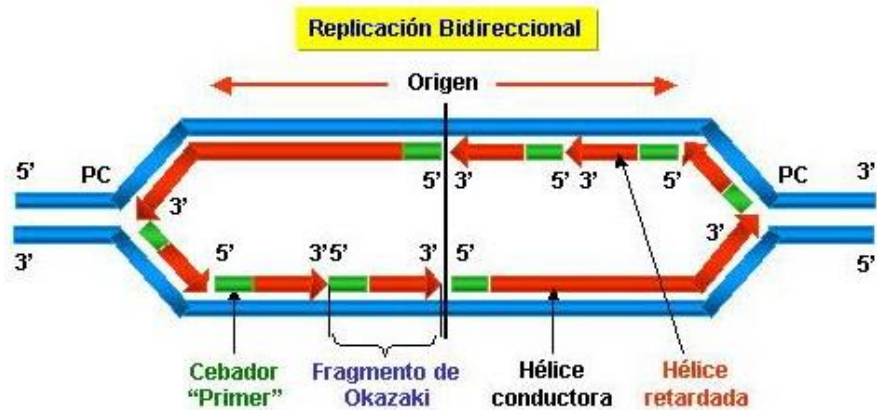


Figura 27: Replicació ADN: Cadena contínua, discontinua i fragments Okazaki
 Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7f/Replicaci%C3%B3n_bidireccional.jpg/350px-Replicaci%C3%B3n_bidireccional.jpg

3. Eliminació dels primers

Un altre enzim, l'**ADN polimerasa I** elimina els ribonucleòtids del primer o cebador (nucleòtids de l'ARN) i els substitueix per desoxiribonucleòtids (nucleòtids de l'ADN).

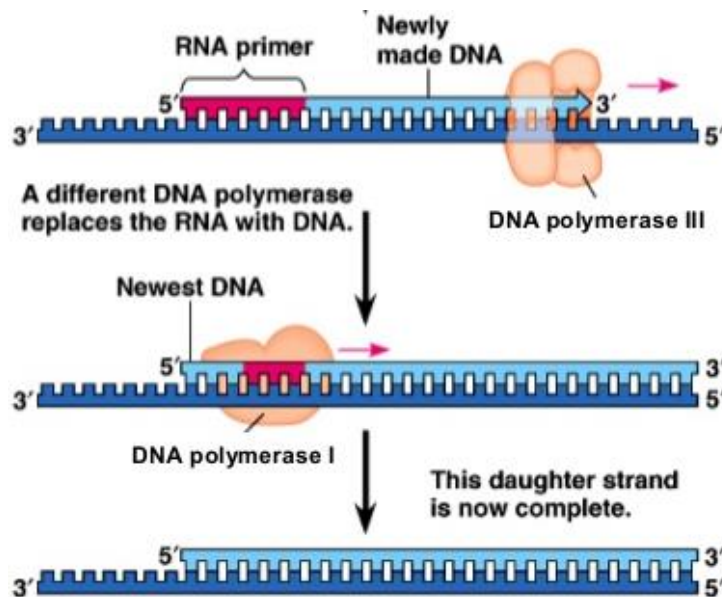


Figura 28: Eliminació dels primers
 Font: <http://image.slidesharecdn.com/dnareplicationandrepair-120402130505-phpapp01/95/dna-replication-and-repair-41-638.jpg?cb=1365036670>

4. Unió dels diferents fragments

Un enzim anomenat **ligasa** uneix els diferents fragments d'ADN (fragments d'Okazaki) de les noves cadenes.

5. L'ADN polimerasa té capacitat per corregir errors

Durant molt de temps es va creure que el grau de fidelitat de la replicació de l'ADN era degut exclusivament a la precisió de l'aparellament entre les bases nitrogenades del filament motlle i el nou filament, segons el model proposat per Watson i Crick. Tot i així, diversos experiments van revelar que si la fidelitat fos deguda exclusivament a l'aparellament de bases nitrogenades es produirien molts més errors. Així doncs, es demostra que la replicació correcta depèn també de l'ADN polimerasa, ja que té la capacitat de corregir els propis errors. Si una base nitrogenada s'aparella malament, trenca l'enllaç, elimina el nucleòtid incorrecte i el substitueix per un de nou assegurant així una còpia exacta.¹²

2.4. Els microARNs

2.4.1. Definició

Un **microARN (miARN)** és una molècula d'ARN monocatenari, és a dir, compost per una sola cadena, a diferència de l'ADN, que té una longitud de 21-25 nucleòtids. Es tracta de molècules molt petites que tenen seqüències que s'uneixen complementàriament a l'ARN missatger que transporta la informació genètica del nucli als ribosomes on es transforma en proteïnes, i no permeten que sigui traduït. És a dir, els gens no arriben a ser proteïnes degut a l'activitat de la maquinària de microARNs. Els microARN d'animals no presenten una complementarietat exacta, però generalment també poden inhibir la traducció de l'ARNm diana.¹³

¹² ESTELLER PÉREZ, FERNÁNDEZ ESTEBAN, LABRADOR ENCINAS, LÓPEZ NOVOA, MARTÍNEZ MOLINA, REGUEIRO GONZÁLEZ, TORRES LOBEJÓN i VILLENA CORTÉS.(2010). *Biología* - 2. 1ª ed. Barcelona: Vicens Vives.

¹³ JOSEP M. CASACUBERTA, ed. (2010). "*Organismes modificats genèticament*". Treballs de la SCB. Vol. 61 (2010) 105-119.

2.4.2. Ruta de ribointerferència

La funció principal del microARN és regular l'expressió de la informació genètica que aporten altres gens mitjançant diversos processos inclosos a una ruta de ribointerferència:

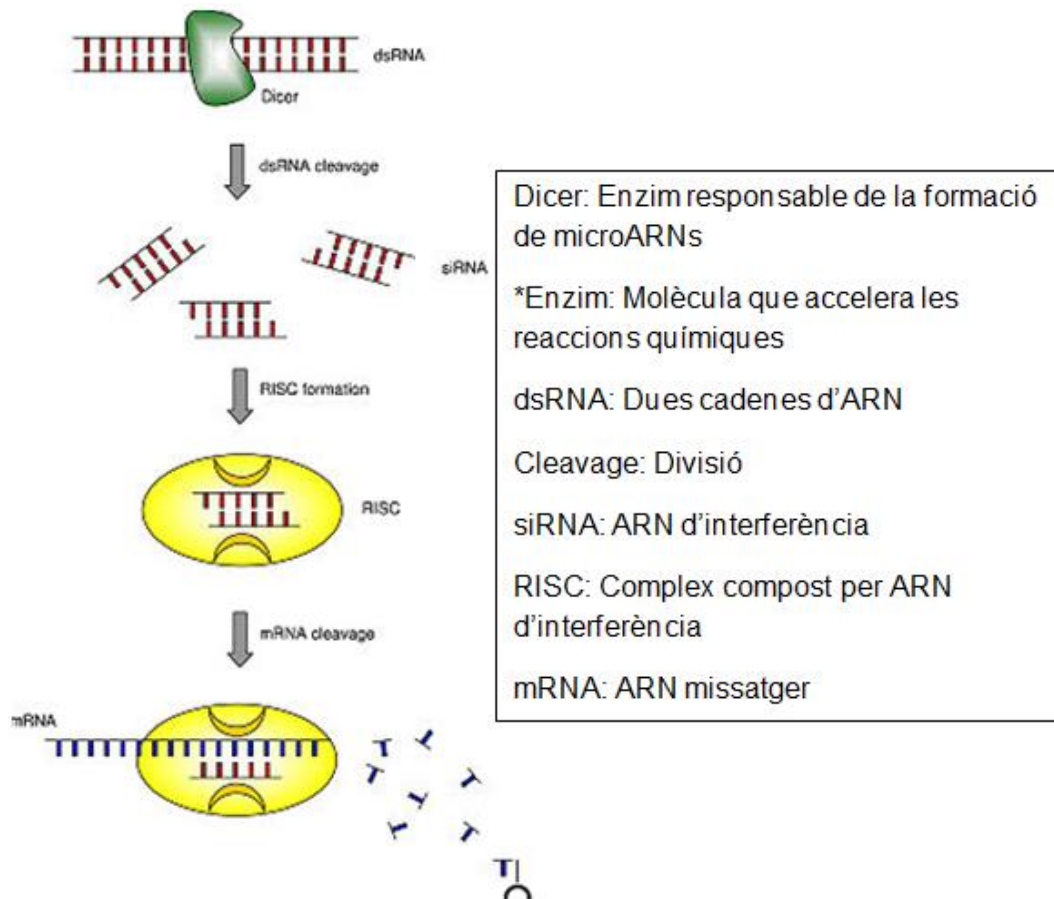


Figura 29: Ruta de ribointerferència

Font:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/70/Mechanism_of_RNA_interference.jpg/300px-Mechanism_of_RNA_interference.jpg

Ruta de ribointerferència: Sistema que utilitzen les cèl·lules dels organismes vius per tal de controlar els gens que estan activats i el seu grau d'activació. La ribointerferència consisteix en un mecanisme posttranscripcional que silencia alguns gens que s'han transcrit, és a dir que han passat d'ADN a ARNm, però encara no han sofert el procés de traducció que consisteix en l'aparició de proteïnes a partir de les seqüències d'informació genètica de l'ARNm. Aquest funcionament l'exerceixen molècules d'ARN que són complementàries a un ARN missatger, una còpia

d'ADN que transporta la informació genètica als ribosomes, i porten a la seva degradació o alteració del seu processament quan s'hi uneixen.

El gen d'ARN d'interferència es converteix en ARN d'interferència missatger que surt del nucli i es dirigeix cap al citoplasma. Durant el procés de transcripció diverses proteïnes adopten un paper de regulació d'aquest, com per exemple: Drosha, Pasha, Dicer... Seguidament, es dona la maduració de l'ARN d'interferència missatger, es separen les dues cadenes i una altra proteïna transporta una de les cadenes cap a l'ARN missatger d'un altre gen que serà degradat.

Cal diferenciar entre l'ARN d'interferència (ARNi) i el microARN ja que els dos realitzen la mateixa funció que consisteix en degradar altres gens tot regulant la seva expressió, però en el cas de l'ARNi es fa de manera artificial, és a dir, s'introdueix com una construcció gènica a l'organisme; mentre que el microARN és una molècula que es troba de manera natural en els organismes.

Els gens que codifiquen pels microARNs es troben en forma d'estructures compostes per 70 nucleòtids anomenades pre-microARNs. Aquests pre-microARNs maduren en forma de microARN gràcies a l'acció del Dicer que inicia la formació d'un complex anomenat RISC (*RNA-induced silencing complex*), responsable de la regulació de l'expressió dels gens. Concretament, la funció del Dicer és tallar els pre-microARNs tot formant dos molècules complementàries curtes, de les quals només una s'integra a l'estructura RISC. Una vegada ja s'ha format aquesta estructura, el microARN s'uneix a l'ARN missatger segons la seva seqüència de bases nitrogenades i el degrada tot inhibint la seva expressió en forma de proteïna.

Fan falta molts llocs d'unió per activar la degradació d'un gen, així doncs, un ARN missatger pot estar regulat per diferents microARNs, i de la mateixa manera, un únic microARN pot controlar l'activitat de centenars d'ARN missatgers diferents.¹⁴

¹⁴ WIKIPEDIA. (2014). *Ribointerferència*. [en línia]. [Consultat: 17 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Ribointerferencia>>

2.4.3. Mecanisme d'acció dels microARNs

Es tracta d'un procés dirigit per un complex anomenat RISC pel qual els microARNs madurs dirigeixen la repressió d'ARN missatgers.

Un microARN en el seu extrem 5' conté una regió anomenada "seed" d'uns 8 nucleòtids que és vital pel reconeixement de l'ARN missatger que ha de degradar. El fet que un microARN reconegui un ARN missatger específic és degut a la complementarietat de bases nitrogenades que formen la regió "seed" del microARN i els nucleòtids de l'extrem 3' de l'ARN missatger.

Quan aquest aparellament és perfecte, el complex de RISC talla l'ARN missatger i per consegüent redueix els nivells proteics resultants. D'altra banda, quan l'aparellament és imperfecte, els microARNs tornen a actuar a través del complex de RISC però d'una manera diferent ja que reprimeixen la traducció proteica de l'ARN missatger però sense afectar la seva estructura, d'aquesta manera es redueixen els nivells proteics, però els nivells d'ARN missatger es mantenen intactes.¹⁵

2.5. DROSOPHILA MELANOGASTER:

2.5.1. Cicle vital de *Drosophila Melanogaster*

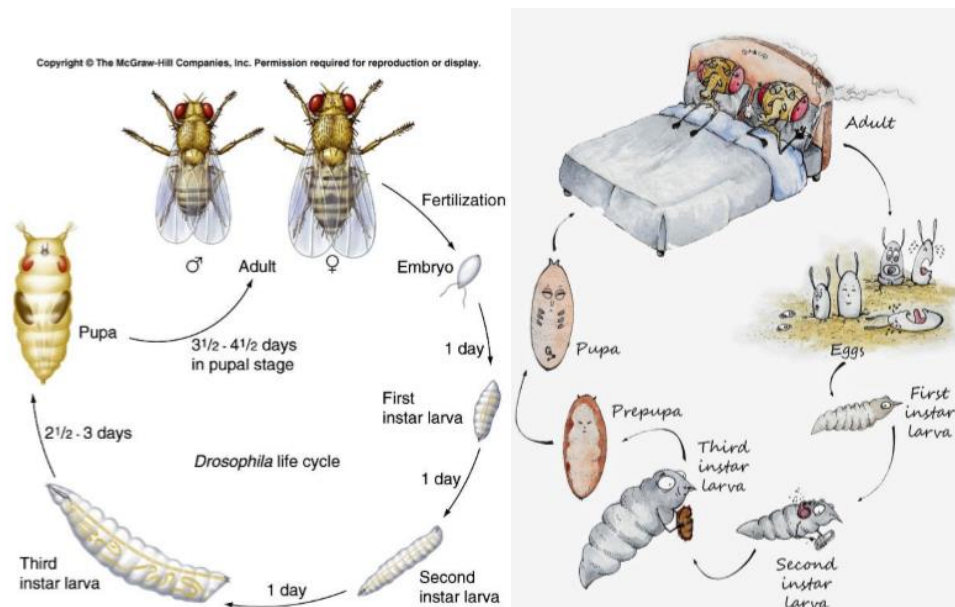


Figura 30: Cicle de vida *Drosophila Melanogaster*

Font: http://skenderianscience.weebly.com/uploads/2/6/1/4/26143564/7822724_orig.jpg

¹⁵ AUGUSTO ANGUITA (2016). *microARNs futuro prometedor en el tratamiento del cáncer*. [en línia]. [Consultat: 21 agost 2016]. Disponible a Internet: <<http://www.novgen.es/micrnas-y-cancer/>>

El cicle de vida de la *Drosophila Melanogaster* té una durada de 7-8 dies a 30°C de temperatura.

Les femelles poden arribar a pondre més de 25 ous al dia. No obstant, des de que la larva surt de l'ou fins que és suficientment madura per tornar-ne a pondre han de passar 8 hores.

Els embrions es troben a una *papilla*, un medi semi sòlid on hi ha els nutrients necessaris pel creixement de la mosca. L'etapa d'**embrió** sol durar un dia aproximadament, seguidament, es desenvolupa i comença la fase de la **larva** que es pot dividir en tres estadis:

- 1r estadi: La larva és molt petita i menja molt per tal de créixer, aquest estadi té una durada d'un dia.
- 2n estadi: La larva té una mida mitjana, aquest estadi dura un dia.
- 3r estadi: La larva és molt gran i menja molt per passar a la següent fase. També es coneix amb el nom de l'etapa "wondering o **prepupa**", estat previ a la pupa. Aquest estadi té una durada d'uns 2'5 - 3 dies.

Finalment, la larva es converteix en una **pupa** i al cap de 3 dies en una mosca adulta.

Durant les fases d'embrió, larva i pupa l'individu presenta teixits primordials i no és fins la fase **adulta** que aquests teixits es desenvolupen mitjançant la proliferació i diferenciació de les cèl·lules per donar lloc a òrgans.¹⁶

Les **mosques verges** són aquelles més grans i blanques que en el seu abdomen tenen una taca fosca que representa el *meconium* (restes de menjar per expulsar, excrements). Són el tipus de mosques que s'utilitzaran a la part pràctica per tal de dur a terme els encreuaments per generar descendència que continguin una construcció genètica determinada en el seu genoma.

¹⁶ MIGUEL ANGEL GUERRERO ADÁN. (2010). "Las moscas de la fruta". Revista de la SECA nº 1. Pág. 17-23.

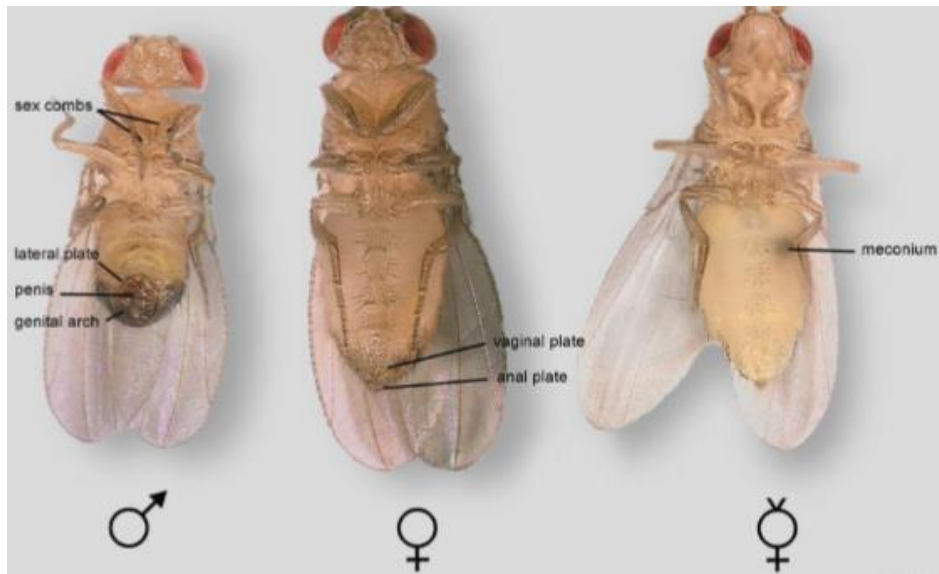


Figura 31: Gènere *Drosophila Melanogaster* i verges
Font: Live gene (pdf)

2.5.2. Diferència entre mascle i femella en *Drosophila Melanogaster*:

- **Mida de la mosca:** Les femelles solen ser un 25% majors que els mascles.
- **Color de l'abdomen:** La part inferior de l'abdomen d'un mascle és més fosca que la d'una femella.
- **Forma de l'abdomen:** L'abdomen del mascle és rodó a la part inferior, mentre que el de la femella acaba en forma de punta.¹⁷

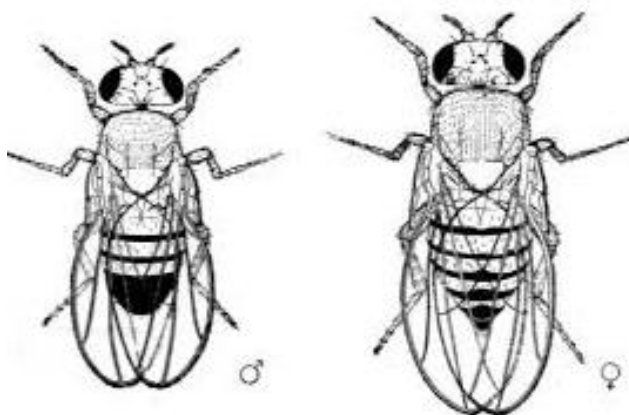


Figura 32: Gènere *Drosophila Melanogaster*
Font: Las moscas de la fruta (pdf)

¹⁷ WIKIHOW. (2016). *Cómo distinguir una mosca de la fruta hembra de una macho*. [en línia]. [Consultat: 24 agost 2016]. Disponible a Internet: <<http://es.wikihow.com/distinguir-una-mosca-de-la-fruta-hembra-de-una-macho>>

2.5.3. Genètica de *Drosophila Melanogaster*

La *Drosophila Melanogaster* té 4 parells de cromosomes:

- X Y (cromosomes sexuals):
 - XX: Femella
 - XY: Mascle

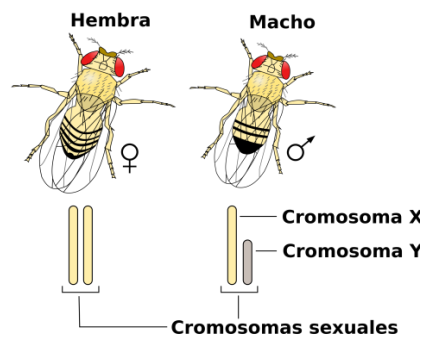


Figura 33: Cromosomes *Drosophila Melanogaster*
Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/Drosophila_XY_sex-determination-ES.svg/250px-Drosophila_XY_sex-determination-ES.svg.png

- 2
- 3
- 4 (quasi no conté gens, és poc utilitzat)

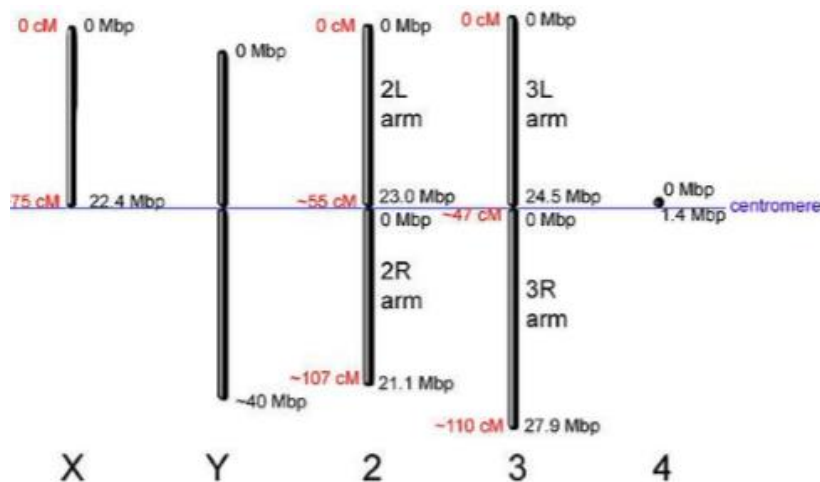


Figura 34: Cromosomes *Drosophila Melanogaster*
Font: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1d/Drosophila-chromosome-diagram.jpg/440px-Drosophila-chromosome-diagram.jpg>

Els **gens redundants** són aquells que realitzen la mateixa funció a l'organisme. En les mosques són poc habituals degut a la poca quantitat de cromosomes que presenten, així és que presenten una avantatge a l'hora de ser estudiades.

2.5.4. Disc d'ala de *Drosophila Melanogaster*

Les estructures primordials donen lloc a òrgans. Així doncs, el disc d'ala de les larves acabarà donant lloc a les ales de la mosca adulta. El disc d'ala es troba molt desenvolupat, concretament, al tercer estadi de la larva, per aquest motiu, es treballa amb aquest tipus de mosca per dur a terme la part pràctica.

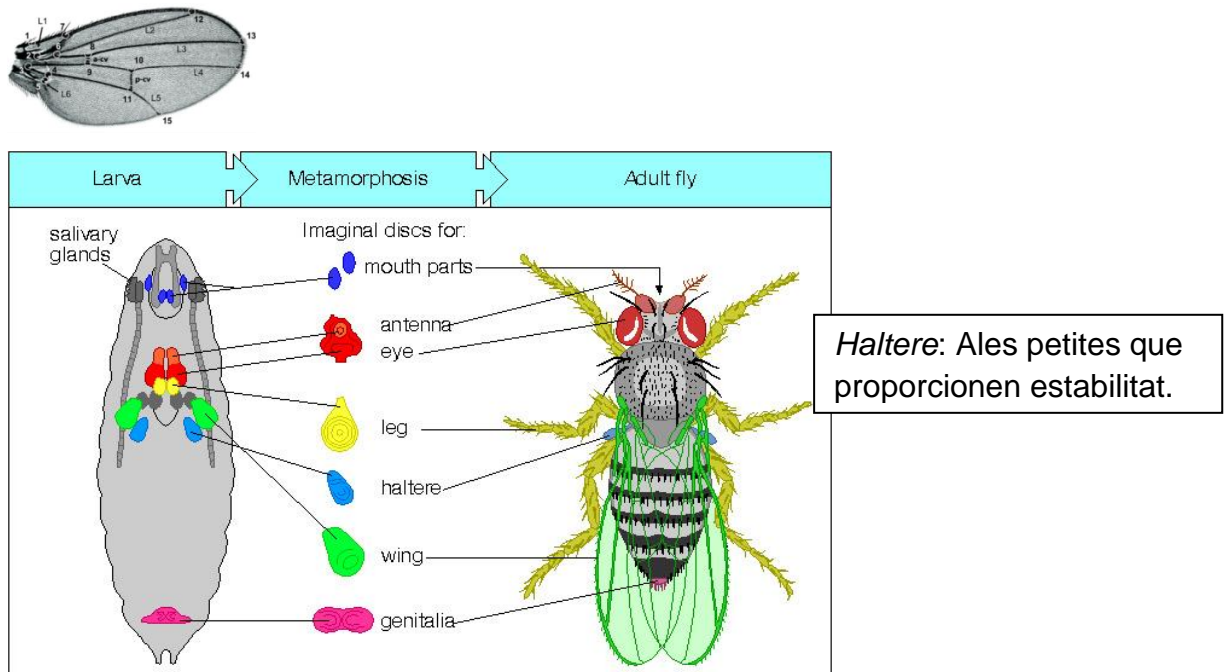
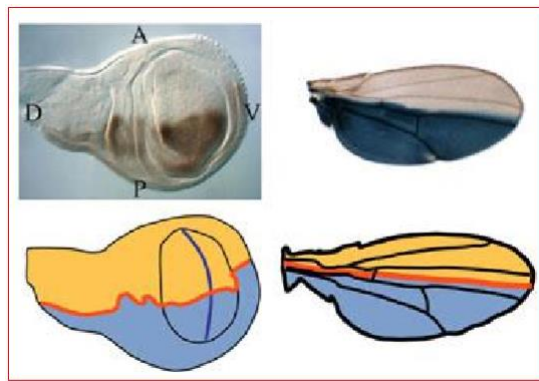


Figura 35: Dels discs als òrgans de *Drosophila Melanogaster*
Font: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_02/fig2_6.jpg

A cada lloc del disc, les cèl·lules expressen un gen diferent que s'anomena *driver gen* encarregat de dirigir i conduir les tasques desitjades.

Per dur a terme la part pràctica s'utilitzen els *driver gens* Ci i Hedgehog, el primer s'expressa al compartiment anterior del disc d'ala, mentre que el segon ho fa al compartiment posterior.



dorsal-ventral anterior-posterior

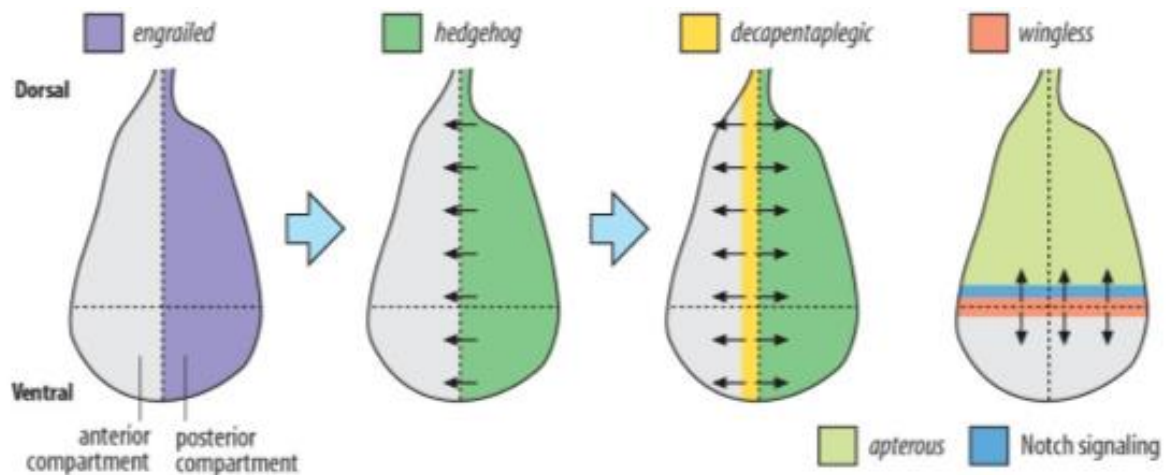


Figura 36: Gens presents al disc d'ala

Font: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_11/ch11f25.jpg

El **Ci** és un factor de transcripció que consisteix en un tipus de proteïnes que en unir-se al promotor d'un altre gen fan que aquest s'expressi, és a dir, es transcriu a ARN missatger i més tard es tradueix a proteïna. No obstant, si el Ci no s'uneix al promotor dels gens no es pot donar aquest procés.

El **promotor d'un gen** és una seqüència d'informació d'aquest que regula la seva expressió, és a dir, si es transcriurà i es traduirà obtenint proteïnes.

Com a conseqüència, la funció principal del Ci és unir-se a diferents gens i promoure la seva expressió regulant l'expressió d'aquests en el compartiment anterior de l'ala de la mosca, ja que el Ci no es pot unir a cap promotor procedent de gens que es troben al compartiment posterior d'aquesta.

Per altra banda, cal conèixer el **Hedgehog**, un *driver gen* associat a diferents marcadors i balancejadors que en determinen la seva presència. A més, l'expressió endògena d'aquest gen, és a dir, a l'interior de les cèl·lules, és més abundant que l'expressió de Ci. Per aquest motiu, s'utilitzarà el Hedgehog com a *driver gen* a la part pràctica per tal d'expressar l'ARNi introduït a la mosca.

Per tal de conèixer la funció d'un gen es degrada utilitzant un ARN d'interferència, és a dir, un mecanisme exogen que no es troba a la cèl·lula de forma natural, sinó que es construeix al laboratori i s'injecta al genoma de la mosca. Aquest mecanisme pot ser constitutiu (sempre s'expressa) o ocasional (s'expressa només en alguns teixits o moments específics), i té la funció de degradar els ARN missatgers per tal que no puguin passar a la fase de traducció i donar lloc a proteïnes.

A la part pràctica s'usa el sistema d'interferència **UAS-Gal 4** que consisteix en un mètode de control de l'expressió gènica, que s'utilitza en *Drosophila Melanogaster*.

La **proteïna Gal4** és un factor de transcripció que no existeix en *Drosophila Melanogaster*, s'obté a partir del llevat. La seqüència del driver gen Ci s'introdueix davant la seqüència que codifica per a la proteïna Gal 4 i per això en regula la seva expressió.

Cal tenir en compte que tots els promotors als quals s'uneix el gen Ci tenen una seqüència comuna, que es retalla, i en aquest cas, s'uneix al gen Gal4. Per aquest motiu, el gen Gal4 només s'expressarà en el compartiment anterior perquè el Ci s'unirà al seu promotor. Aquesta construcció genètica s'introdueix als embrions de *Drosophila Melanogaster* de manera que quan aquests es desenvolupin tots presentaran aquesta informació, és a dir, totes les cèl·lules contindran el gen Gal4 expressat al compartiment anterior de l'ala.

Alhora, aquest gen Gal4 s'unirà a la seqüència UAS que s'ha col·locat davant del gen que es vol expressar. La seqüència del gen UAS també només existeix en llevat, així és que s'ha inserit a la mosca seguint el

mateix procediment que el gen Gal4. Així doncs, l'expressió del gen que es vol expressar està regulada per la proteïna Gal4 que només s'expressa al compartiment anterior de l'ala, ja que aquest gen es troba influït per la seqüència UAS a la qual s'hi uneix la proteïna Gal4.

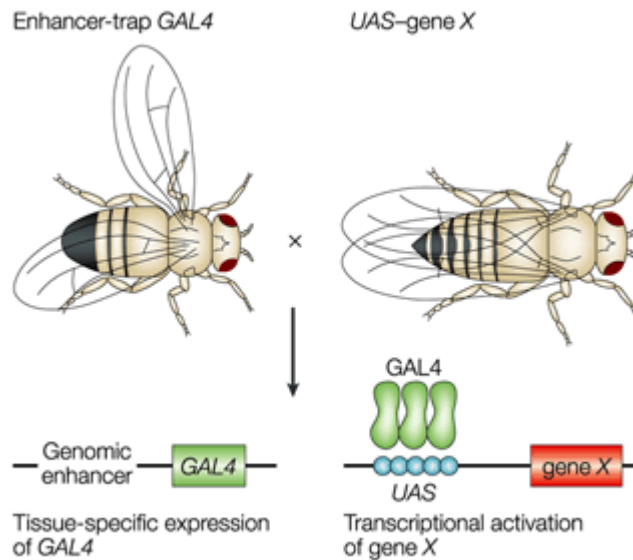


Figura 37: Sistema UAS-GAL 4 en *Drosophila Melanogaster*
 Font: <http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n3/images/nrg751-i1.gif>

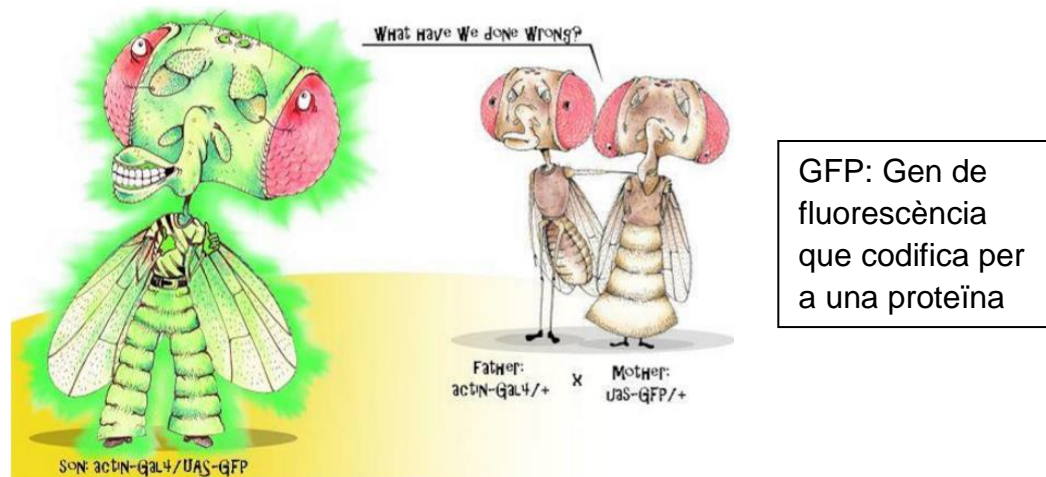


Figura 38: Sistema UAS-GAL 4 en *Drosophila Melanogaster* pel gen de fluorescència
 Font: http://www.ciberdroide.com/wordpress/wp-content/uploads/gfp_drosophila.jpg

Les seqüències de gens desitjades s'injecten durant l'etapa d'embrió de la *Drosophila Melanogaster* ja que les seves cèl·lules reproductores tindran aquesta nova construcció i així també ho tindrà la descendència. La injecció es dona a l'atzar, per tant, es poden obtenir diferents resultats:

- Que la seqüència sigui inserida a la meitat d'un gen vital, com a resultat, es pot produir la mort de l'organisme.
- Que la seqüència sigui inserida a la meitat d'una regió no codificant del material genètic de l'organisme, i així, aquest pugui sobreviure.
- Que la seqüència sigui inserida a un gen que conté diverses còpies a la cèl·lula, i així, la manca d'una d'elles no determini la supervivència de l'organisme.

2.5.5. Efecte del microARN en el creixement de les ales

El microARN és una seqüència petita d'uns 21-25 ribonucleòtids. És un sistema endogen, ja que s'expressa dintre la cèl·lula de manera natural i controla l'expressió dels gens a nivell post-transcripcional, és a dir, posterior a la fase de transcripció i previ a la fase de traducció. Així és que actua sobre l'ARN missatger tot regulant l'expressió del gen en forma de proteïnes. Cada microARN és específic i presenta diferents sistemes de regulació, però només en el cas de les plantes hi ha complementarietat total entre el microARN i l'ARN missatger que degrada.

El Dicer és una proteïna que fa talls específics per tal que els microARNs puguin realitzar la seva funció consistent en degradar els gens i evitar la seva expressió en forma de proteïnes. Així doncs, aquesta proteïna intervé en el procés de maduració de microARNs, de manera que si s'elimina el Dicer s'inhibeix la seva presència.

En el cas de *Drosophila Melanogaster*, si s'elimina la maquinària de microARNs tot reprimint l'expressió de Dicer es redueix l'expressió de Myc, un gen que impulsa el creixement de l'ala. Per comprendre aquesta conclusió és necessària la presència d'una proteïna intercalada entre els microARNs i Myc, ja que en reprimir la maquinària dels microARNs, la proteïna intermediària regulada per aquesta maquinària no és degradada sinó que es sobreexpressa, i com a conseqüència, degrada la proteïna Myc responsable del creixement de l'ala, i així, es redueix la mida d'aquesta.¹⁸

¹⁸ The miRNA machinery targets Mei-P26 and regulates Myc proteïna levels in the *Drosophila* wing. Héctor Herranz, Xin Hong, Lidia Pérez, Ana Ferreira, Daniel Oliveiri, Stephen M Cohen and Marco Milán.

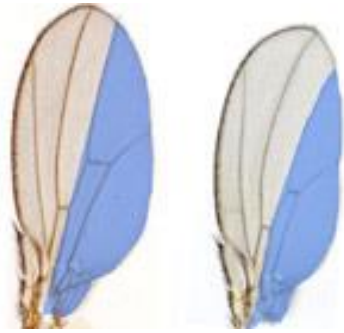


Figura 39: Efecte microARNs sobre la proteïna Mei-P26 sobre el gen Myc

Font: https://www.irbbarcelona.org/sites/default/files/styles/imagenot/public/news/2010/04/20100419_01_0.jpg?itok=peudDpsd

2.6. EPIGENÈTICA

El concepte **epigenètica** fa referència a l'estudi dels factors que juguen un paper important en la genètica molecular tot interaccionant amb els gens. Aquests factors genètics venen determinats per l'ambient i afecten el desenvolupament dels organismes tot regulant la seva expressió gènica. Alguns factors ambientals destacats són la temperatura, la nutrició, la presència de depredadors o de membres de la mateixa espècie d'un organisme determinat...



Figura 40: Epigenètica

Font: Wikipedia

En efecte, l'epigenètica és el conjunt de reaccions químiques i altres processos que modifiquen l'activitat de l'ADN sense alterar la seva seqüència, ja que no només els gens juguen un paper important en la genètica dels organismes.

Concretament, aquest concepte el va definir per primer cop Conrad Hal Waddington al 1942 per referir-se a l'estudi de les interaccions entre gens i l'ambient que es produeix en els organismes.

La funció principal de l'epigenètica és reinterpretar la informació genètica continguda a l'ADN de cada individu a la fase de traducció segons els factors ambientals, en conseqüència, cal tenir en compte que les experiències d'un ésser viu poden modificar el seu material genètic i aquestes variacions poden ser transmeses a generacions futures.

Fins l'any 2016, s'han pogut distingir diferents varietats de mecanismes epigenètics que poden donar lloc a diversos tipus de càncer, malalties cardiovasculars, neurològiques, reproductives o immunes.

Mitjançant la regulació epigènica es pot observar l'adaptació al medi dels organismes ja que les modificacions produïdes presenten molta estabilitat, i a més, poden ser heretables. Aquest fet és important ja que quan es produeix un error a les modificacions, pot donar lloc a malalties que poden perdurar molt temps en una família.

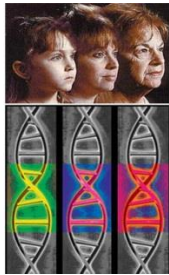


Figura 41: Herència mutacions epigenètiques
Font: Wikipedia

La regulació epigenètica es basa en les interaccions entre la cromatina i les proteïnes histones, unes proteïnes que s'uneixen fortament a l'ADN i permeten que es condensi en forma de cromosomes. Així doncs, aquestes proteïnes tenen un efecte regulador de l'expressió gènica. A més, l'estat de la cromatina determina el moment, el lloc i la manera de com un gen pot ser expressat o no, ja que si la cromatina està molt condensada, els elements de transcripció no poden accedir a l'ADN i aquest no es pot transcriure, però si la cromatina està poc condensada, els activadors transcripcionals es poden unir a les regions promotores de l'ADN perquè es produeixi la transcripció del gen.



Figura 42: Estat cromatina

Font: <http://www.centralx.es/p/printImage/cromatina.jpg>

S'han pogut determinar tres processos de regulació epigenètica¹⁹:

- Metilació de l'ADN: Un grup metil s'afegeix a la molècula tot provocant alteracions durant la fase de transcripció genètica.
- Modificació de les proteïnes histones: Algunes modificacions de les proteïnes histones serveixen com un codi per determinar si el gen ha de ser expressat o no.
- L'efecte dels microARN o ARN d'interferència: Les seves seqüències són complementàries a ARN missatgers que codifiquen per a proteïnes, i impedeixen la seva traducció.

L'ADN està compost per nucleòtids que alhora estan formats per un sucre, una base nitrogenada i un grup fosfat. Existeixen quatre tipus de bases nitrogenades: adenina (A), guanina (G) timina (T) i citosina (C). La seqüència d'aquestes molècules en la regió del genoma codificant determinen la naturalesa química de les proteïnes que són codificades per aquests gens. En les regions del genoma denominades reguladores, l'ordre de les bases nitrogenades defineix com la maquinària cel·lular reconeix la informació que aporta el gen. Necessàriament, perquè les molècules d'ADN siguin funcionals s'han de sotmetre al procés de transcripció pel qual són copiades a una molècula anomenada ARN missatger. En aquest procés tenen molta importància les seqüències reguladores, és a dir, conjunt de nucleòtids reconeguts per la maquinària cel·lular de manera que possibilita la transcripció del gen. Per tant, l'accessibilitat de les seqüències reguladores determina la possibilitat que es produeixi el procés de transcripció que precedeix el procés de regulació epigenètica.

¹⁹ REVISTA EIDON, Ch.(2012). *Epigenética*. Revista de la fundación de ciencias de la salud. Número 36
ISSN 2174 - 8292

2.7. NUTRIGENÒMICA

La nutrigenòmica pretén proporcionar un coneixement genètic sobre els components de la dieta que contribueixen a la salut mitjançant l'alteració de l'expressió dels gens. Bàsicament, és l'estudi de les interaccions entre el genoma i els nutrients.



Figura 43: Nutrigenòmica, relació entre els nutrients i els gens

Font:

<https://www.dietistasnutricionistas.es/wp-content/uploads/2010/11/nutrigeneticanutrigenomica.jpg>

La nutrigenòmica es basa en què els components de la dieta produeixen efectes sobre el genoma humà que poden alterar l'expressió dels gens donant lloc a malalties.

La ciència de la nutrició incorpora al segle XXI el coneixement del metabolisme i de les interaccions entre gens i nutrients amb la finalitat de millorar l'alimentació i la salut i oferir cada cop més una nutrició personalitzada.

Cal diferenciar entre la **nutrigenòmica** i la **nutrigenètica**. El segon concepte estudia els factors genètics que provoquen determinades malalties, així es pot recomanar dietes específiques que evitarien el desenvolupament de possibles malalties; mentre que la nutrigenòmica estudia l'efecte que provoquen els nutrients sobre el genoma dels éssers vius.²⁰

²⁰ INSTITUTO NUTRIGENÓMICA. (2015). *Nutrigenómica y Nutrigenética. Diferencias y significado de ambos términos*. [en línia]. [Consultat: 28 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://institutonutrigenomica.com/noticias-nutrigenomica/nutrigenomica-nutrigenetica-diferencias-y-significado-de-ambos-terminos/>>

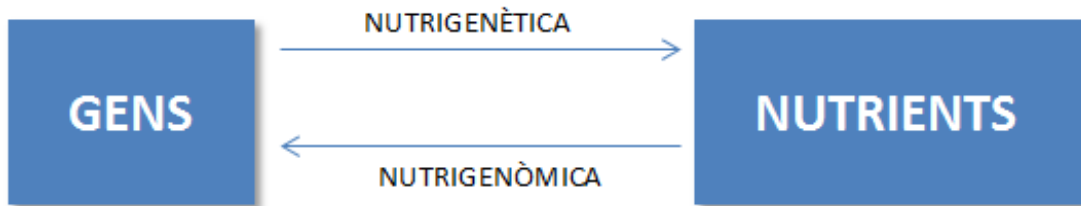


Figura 44: Relació nutrigenòmica i nutrigenètica

Un dels pilars fonamentals de la nutrició moderna és el desenvolupament de la nutrigenòmica. De fet, una millora en l'alimentació i com a conseqüència en la salut, representa un repte pels especialistes capaços de combinar la nutrició amb les noves aportacions de la genètica com l'epigenètica. Per tant, aquests experts tenen l'objectiu d'establir el concepte de nutrició personalitzada que considera tant les propietats saludables dels components alimentaris com els antecedents genètics de cada persona amb la finalitat de millorar la seva qualitat de vida.

Una bona dieta pot reduir o prevenir el risc de patir algunes malalties que venen determinades per l'alimentació²¹:

- Osteoporosis
- Osteoartritis
- Alguns tipus de càncer
- Diabetis de tipus 2
- Malalties cardíaques
- Hipertensió
- Obesitat
- Anèmia
- Manca de vitamines i minerals
- Intoxicacions degudes als aliments

Com ja s'ha esmentat, el menjar conté senyals químiques que poden aportar canvis en l'expressió dels gens. Es poden distingir dos exemples molt clars²²:

²¹ FRANCISCA SERRA. *Alimentació i nutrició personalitzada*. [en línia]. [Consultat: 29 agost 2016]. Disponible a Internet: <http://uom.uib.cat/digitalAssets/231/231872_serra1.pdf>

²² WIKIPEDIA. (2016). *Epigenètica*. [en línia]. [Consultat: 31 agost 2016]. Disponible a Internet: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Epigen%C3%A9tica>>

- Abelles: Gelea real i abella reina

La producció d'abelles reines depèn de l'alimentació de les larves ja que s'alimenten de gelea real que conté altes concentracions de proteïnes y secrecions de les glàndules salivals de les abelles obreres, d'aquesta manera, durant el seu desenvolupament seran abelles reines amb ovaris funcionals. Pel contrari, les larves que són alimentades amb gelea real durant períodes curts de temps es convertiran en abelles obreres sense ovaris funcionals. El consum de gelea real produeix alts nivells de síntesi de l'hormona juvenil en la larva que endarrereix la metamorfosi permetent que aquesta es desenvolupi durant més temps, adquireixi una mida major i desenvolupi ovaris funcionals.



Figura 45: Alimentació de les abelles

Font: <http://www.apicat.com/apicultura/wp-content/uploads/2016/02/abella-dins-el-rusc-apicat-1100x768.jpg>

- Escarabats: Longitud de les banyes:

La qualitat i quantitat de fems que reben els escarabats durant el període de desenvolupament determina el comportament dels escarabats mascles en algunes espècies, especialment en aquelles que els mascles tenen banyes i les femelles no. L'hormona juvenil afecta a la longitud de les banyes dels mascles: a majors concentracions d'aquesta, major longitud de banyes.

Les banyes són un factor de selecció sexual per la femella, els mascles amb banyes llargues són escollits per aquestes, mentre que els mascles amb banyes curtes caven túnels per arribar fins on hi ha les femelles i aparellar-se amb elles evitant ser descoberts pels mascles amb les banyes llargues. D'aquesta manera, l'alimentació deficient causa nivells baixos de l'hormona juvenil que alhora resulta en banyes curtes en els mascles amb un comportament covard.

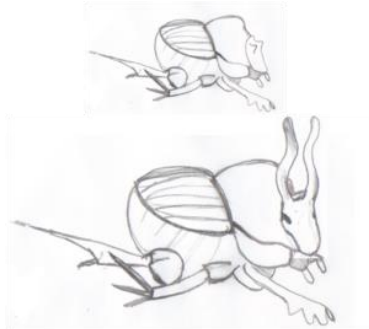


Figura 46: Alimentació dels escarabats
Font: Wikipedia

2.8. ALGUNES APLICACIONS EN LA RECERCA D'EPIGENÈTICA

- **Funció anti-viral:** Els microARNs poden degradar la seqüència d'ARN missatgers que representen el material genètic dels virus.
- **Funció pro-viral:** Alguns microARNs són necessaris per tal que alguns virus s'expressin de manera eficaç.
- Molts microARNs regulen el desenvolupament i el funcionament de les cèl·lules del **sistema immune** o de defensa i controlen processos entre les interaccions de l'hoste i l'agent extern.
- **Metilació de l'ADN:** La metilació de l'ADN és un factor regulador molt important durant la fase de transcripció dels gens, consisteix en un procés pel qual s'afegeixen grups metil (CH_3) a l'ADN tot modificant la seva funció ja que quan es troba en el sector promotor d'aquest reprimeix la transcripció i inactiva el gen. A més, la metilació de l'ADN és essencial en el desenvolupament embrionari i en les cèl·lules, ja que els patrons de metilació són transmesos a cèl·lules filles. Qualsevol patró anormal de metilació d'ADN està associat a possibles malalties, tan si és hipermetilació com hipometilació: la hipermetilació reprimeix la transcripció dels gens supressors de tumors, mentre que la hipometilació està implicada en processos de desenvolupament i progressió de càncer.

- **Funcions maternes:** Dos experiments independents realitzats en ratolins indiquen que una quantitat significativa de microARNs maternals s'hereten pels zigots i poden tenir un paper important en les etapes de desenvolupament embrionari.
- **Homeòstasis de colesterol i triglicèrids:** S'han identificat alguns microARNs que funcionen com reguladors de colesterol, triglicèrids i manteniment energètic dels organismes.
 Alguns microARNs regulen l'expressió de les proteïnes que capten colesterol (LDL) que tenen un paper important en la depuració hepàtica i en la prevenció d'arteriosclerosi i malalties cardiovasculars, així doncs, si la maquinària de microARNs actua degradant aquestes proteïnes facilita l'aparició de les malalties esmentades anteriorment.
 Els mateixos microARNs també poden afectar a l'expressió d'un gen que facilita la producció d'una proteïna (HDL) que elimina el colesterol de les cèl·lules i el transporta al fetge per excretar-lo, d'aquesta manera, si es degrada el gen es reprimeix l'expressió d'aquesta proteïna i consegüentment augmenten els nivells de colesterol. Per altra banda, hi ha anti-microARNs que afavoreixen l'expressió del gen i com a resultat es redueixen els nivells de colesterol.
- **Efectes d'envelliment:** Està demostrat que l'epigenoma (informació genètica) varia al llarg de la vida d'un organisme. Per exemple, estudiant el cervell s'ha esbrinat que l'epigenoma des del naixement fins a l'adolescència varia molt, però a partir d'aquesta etapa es manté estable fins arribar als 70 anys quan comença a degenerar.
 La variació més freqüent és la metilació d'ADN, s'ha fet un estudi en persones de diferents edats i s'ha comprovat que a mesura que creixen l'epigenoma canvia i perd grups metil, això provoca que les neurones deixin de produir els neurotransmissors adequats o que el cor no bategui amb normalitat. També s'ha analitzat nens amb envelliment prematur i s'ha descobert que la metilació de l'ADN coincideix amb el de qualsevol

persona de noranta anys, fet que implica que aquest epigenoma envellit escurci la durada de la vida dels nens.

En un futur, l'epigenètica pot servir per predir el temps de vida de les persones.

A part de la metilació d'ADN, també hi ha un factor important que intervé en l'envelliment: les proteïnes histones. Aquests elements són utilitzats per l'ADN per condensar-se i poder cabre al nucli de la cèl·lula. Se sap que a l'etapa de vellesa aquest material genètic no s'enrotlla correctament. Un experiment realitzat amb cucs, ratolins i llevats demostra que si es modifica l'enrotllament de l'ADN a les proteïnes histones es pot allargar la vida d'aquests organismes. Es pensa que en el futur alguns fàrmacs podrien desenvolupar aquesta funció en humans. Moltes malalties associades amb l'envelliment tenen un component genètic, per exemple, l'arteriosclerosi i alguns tipus de demència.

Actualment, durant l'any 2016, s'està portant a terme l'Estudi ALFA amb pacients asimptomàtics (no presenten símptomes) però que tenen algun familiar que pateix Alzheimer, ja que se sap que en algunes famílies hi ha certa predisposició a patir aquesta malaltia, i no és purament genètica, ja que no existeix una mutació heretada, de manera que es pot tractar d'una alteració epigenètica. Així doncs, s'analitza com poden influir els factors ambientals i la possibilitat de canvis epigenètics que donin lloc a la predisposició de la demència.

Ja fa 8 o 10 anys que s'apliquen fàrmacs epigenètics, que han estat molt eficaços sobretot en el tractament de leucèmies i limfomes, però també es volen cercar cures per a altres tipus de tumors. L'epigenètica és molt interessant per tractar tumors que reapareixen ja que encara no coneixen el nou fàrmac i serien sensibles al seu efecte. Durant aquest any 2016, ja s'han utilitzat teràpies epigenètiques per tornar quimiosensibles els tumors quimioresistents.

Cal remarcar la necessitat de continuar invertint en coneixement i recerca.

Totes les noves aportacions són degudes al progrés de la investigació en diferents àrees: medicina, biologia, bioquímica, farmacologia, radiologia, química, física... Si s'observen les xifres, cada any s'augmenta la supervivència en un 2 i un 2,5 %. De vegades, hi ha tumors que d'un any a l'altre milloren la resposta moltíssim, normalment perquè s'ha fet algun descobriment que permet elaborar un fàrmac específic.²³

2.8.1. Càncer i epigenètica

El càncer o neoplàsia és un tipus de malaltia en què un grup de cèl·lules desenvolupen un creixement descontrolat, envaeixen i destrueixen teixits, i produeixen metàstasi, és a dir, s'estenen a altres punts del cos. Aquestes tres propietats malignes dels càncers els distingeixen dels tumors benignes o hiperplàsia. La branca de la medicina que s'ocupa de l'estudi, el diagnòstic, el tractament i la prevenció del càncer és l'oncologia.

Els càncers poden tenir efecte a qualsevol edat, fins i tot en embrions, però en la majoria de tipus de càncer el risc augmenta amb l'edat.

Gairebé tots els càncers són provocats per anormalitats en el material genètic de les cèl·lules transformades, aquestes anormalitats poden ser degudes als efectes de factors cancerígens, com per exemple el fum de tabac, radiacions, substàncies químiques o agents infecciosos.

Altres anormalitats genètiques que promouen càncer es poden adquirir aleatòriament degut a possibles errors en la replicació de l'ADN, o són heretades i per tant estan presents a totes les cèl·lules des del naixement. Molts aspectes nous de la genètica involucrats en el desenvolupament de càncer, com ara la metilació de l'ADN i els microARNs, cada vegada són considerats més importants.

Les anormalitats genètiques que es donen en el càncer solen afectar dues classes generals de gens:

- Expressió d'oncogens: Els oncogens promotors del càncer solen estar activats a les cèl·lules canceroses donant-los noves propietats com creixements i divisions descontrolades, protecció contra la mort cel·lular programada (apoptosis) i capacitat d'envair altres teixits.

²³ WIKIPEDIA. (2016). *microARN*. [en línia]. [Consultat: 2 setembre 2016]. Disponible a Internet: <https://es.wikipedia.org/wiki/Micro_ARN>

- Repressió de l'expressió de gens supressors tumorals: Els gens supressors tumorals poden estar inactivats a les cèl·lules canceroses provocant la pèrdua de funcions normals en aquestes cèl·lules, com ara una replicació d'ADN adequada, el control del cicle cel·lular, l'orientació i l'adhesió dins dels teixits, i la interacció amb les cèl·lules protectores del sistema immunitari.

A mesura que es desenvolupa la recerca, els tractaments van esdevenint més específics per les diferents varietats de càncer. Hi ha hagut avenços significatius en el desenvolupament de medicaments de teràpia dirigida que actuen específicament sobre anormalitats moleculars destacables en certs tumors, i que minimitzen els danys a les cèl·lules normals.

La **metàstasi** consisteix en la dispersió de les cèl·lules canceroses d'un òrgan o part del cos a un altre òrgan o part del cos no adjacent. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat de desprendre's o filtrar-se des d'un tumor primari, entrar als vasos limfàtics o sanguinis, circular pel torrent sanguini, i establir-se per créixer en teixits sans de qualsevol part del cos.

2.8.1.1. Els microARNs i les seves característiques

Els microARNs són molècules no codificants que actuen com a reguladors en el procés de transcripció controlant el nivell d'expressió de les proteïnes mitjançant mecanismes de repressió. Gràcies a aquest fet, els microARNs són capaços de controlar el desenvolupament i diferenciació cel·lular. A més, també presenten la capacitat de conservació evolutiva que té un paper clau en el control del cicle cel·lular.

2.8.1.2. Paper dels microARNs en processos oncològics

La relació entre microARNs i càncer cada cop és més evident, ja que l'aparició de càncer és deguda a alteracions o mutacions en les proteïnes responsables de controlar la proliferació i el cicle cel·lular.

Els nivells d'aquestes proteïnes en una cèl·lula estan controlats mitjançant la repressió post-transcripcional pels microARNs de tal manera que les alteracions en la seva seqüència porten a la modificació de processos de

proliferació i diferenciació cel·lular, fet que produeix un augment de risc a patir determinats tipus de càncer. En resum, si la proteïna regulada per un microARN és una molècula clau en el control del cicle cel·lular, qualsevol error en el procés de control per part del microARN pot desenvolupar una alteració cancerígena.

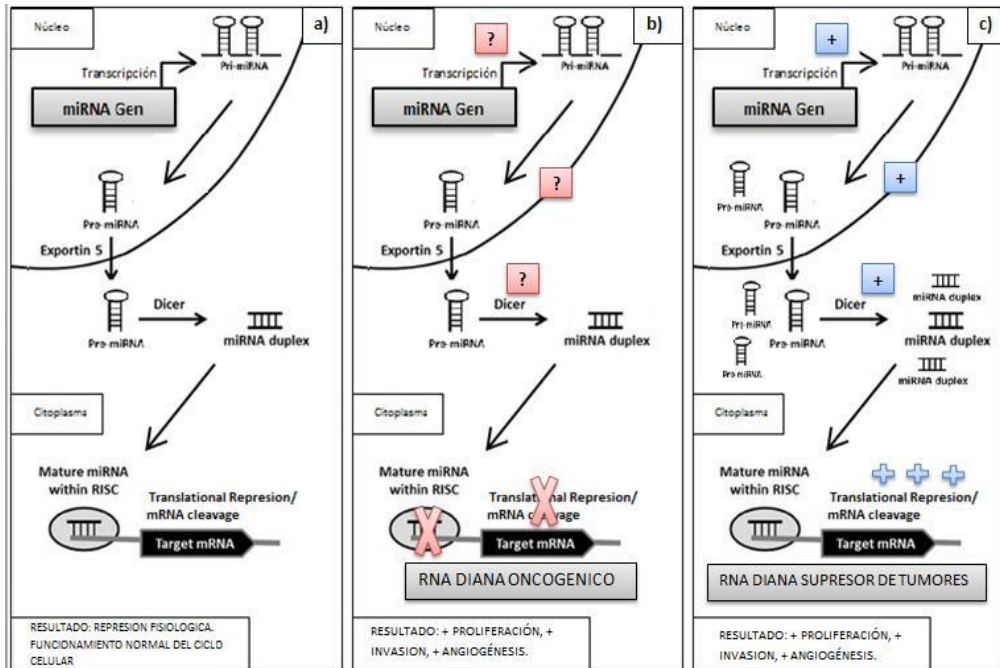


Figura 47: Funcionament dels microARNs en processos oncològics
 Font: <http://www.novgen.es/wp-content/uploads/2015/03/grafica.jpg>

- Funcionament fisiològic d'un microARN a la cèl·lula
- Mecanisme a través del qual un microARN pot promoure desenvolupament tumoral: La repressió de la maquinària de microARNs encarregada d'inhibir l'expressió gènica d'una proteïna oncogènica dirigeix la funció cel·lular cap a la formació d'un tumor. En aquest cas, els microARNs actuen com a supressors tumorals, però el fet que siguin reprimits els fa inactius i incapaçs de controlar els tumors.
- Mecanisme a través del qual una alteració en el desenvolupament d'un microARN pot promoure desenvolupament tumoral: En aquest cas, es produeix una sobreexpressió d'un microARN oncogènica responsable de reprimir l'expressió de supressors tumorals, de manera que degrada els supressors de tumors establint el cultiu perfecte perquè es puguin desenvolupar.

Actualment, durant aquest any 2016, hi ha hagut molts estudis basats en identificar i associar quines alteracions genètiques de la seqüència de microARNs o de proteïnes implicades en el seu procés de desenvolupament estan directament relacionades amb l'aparició de diferents tipus de càncer i d'aquesta manera es distingeixen com a marcadors sanguinis de predicció i diagnòstic de processos tumorals. Hi ha diverses entitats que estan desenvolupant kits que permetin mitjançant una biòpsia líquida (extracció de sang), detectar microARNs d'una forma ràpida, senzilla i fiable.

La capacitat d'usar els microARNs pot suposar un canvi radical en la detecció de patologies tot incrementant les possibilitats de supervivència dels pacients, ja que els microARNs ens permeten detectar patrons d'expressió en sang que científicament s'associen a una recuperació més o menys ràpida segons el tractament utilitzat, optimitzant d'aquesta manera els beneficis i permetent oferir la coneguda medicina personalitzada ja que d'aquesta manera s'evita que una persona rebi un fàrmac tòxic que no tindria efecte.

Per altre costat, també es podrien desenvolupar teràpies que permetin la introducció de microARNs en cèl·lules tumorals com si fossin molècules terapèutiques que redirigeixen la traducció proteica de cada cèl·lula maligna cap a una expressió de gens supressors de tumors i una repressió de gens oncogenes causants de malalties tot reduint el seu efecte devastador i millorant l'estat del pacient.²⁴

²⁴ AUGUSTO ANGUITA (2016). *microARNs futuro prometedor en el tratamiento del cáncer*. [en línia]. [Consultat: 21 agost 2016]. Disponible a Internet: <<http://www.novgen.es/micrornas-y-cancer/>>

3. METODOLOGIA

Per a dur a terme la part experimental, s'ha dividit la via d'experimentació en tres línies. Una primera experimentació pretén determinar l'efecte de la maquinària de microARNs en l'expressió gènica. Una segona línia d'investigació aspira a demostrar la funció de Myc a l'ala de *Drosophila Melanogaster*. Finalment, la tercera via de treball pràctic es basa en determinar el paper d'una proteïna intermèdia al procés d'expressió gènica de Myc.

3.1. INTRODUCCIÓ

- A la primera part experimental es vol demostrar que la maquinària de microARNs té un efecte regulador en el creixement de l'ala de *Drosophila Melanogaster*. La hipòtesi plantejada defensa que la maquinària de microARNs degrada la proteïna Mei-P26, que alhora degrada la proteïna Myc, responsable del desenvolupament de l'ala. Així doncs, s'intueix que eliminant la maquinària de microARNs augmentarà el nivell d'expressió de la proteïna Mei-P26 que reprimirà l'expressió de la proteïna Myc, de tal manera que el compartiment de l'ala on s'hagi suprimit la maquinària de microARNs tindrà una mida menor.
- A la segona part d'experimentació es vol demostrar que la proteïna responsable que impulsa el creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster* és Myc.
- A la tercera part d'investigació experimental es vol demostrar que en el procés de regulació de l'expressió de Myc per microARNs hi intervé una proteïna anomenada Mei-P26 que és degradada pels microARNs i alhora degrada l'expressió de Myc, per tant, promou la reducció de la mida de l'ala.

3.2. EFECTE DELS microARNs EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA:

En primer lloc, es van separar els mascles de les femelles de l'espècie *Drosophila Melanogaster* segons les característiques de cada sexe amb l'ajuda d'un microscopi. Un cop es van haver diferenciat els dos sexes, es va cercar en les femelles totes aquelles que complien els requisits per a ser considerades verges. Seguidament, es van posar 8 femelles verges amb la seqüència genètica Ci-Gal4 a cadascun dels tres tubs que contenien *papilla* per tal de proporcionar-los aliment i promoure el seu desenvolupament. Tot seguit, a un dels tubs s'hi van afegir tres mascles UAS-Dicer¹ARNi, a un altre tub s'hi van afegir tres mascles UAS-Dicer¹ ARNi que tenien un Dicer que actuava diferent respecte l'anterior, i a l'últim tub s'hi van afegir tres mascles UAS-GFP ARNi que representaven els organismes control ja que el gen GFP no existeix a la mosca sinó que es tracta d'un gen exogen, per tant, si se li adjudica un ARNi no tindrà cap efecte ja que aquest gen no està present a l'ala de la mosca. Així doncs, els encreuaments que es van dur a terme són els següents:

- TUB 1: Ci-Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi
- TUB 2: Ci-Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi
- TUB 3: Ci-Gal4 x UAS-GFP ARNi

En els encreuaments sempre hi havia d'haver una quantitat menor de mascles, aproximadament, la meitat que femelles.

Es van mantenir els tres tubs amb encreuaments diferents a una temperatura de 25°C per tal que les larves resultants dels encreuaments s'alimentessin dels nutrients proporcionats per la *papilla* de manera que aquesta s'anava liquant a mesura que perdia consistència i les larves anaven creixent fins assolir l'etapa adulta de la mosca, moment en què van ser posades a nous tubs a la mateixa temperatura. Contràriament, les larves i els ous que encara no havien assolit l'etapa adulta es van mantenir als tubs a una temperatura de 29°C ja que és el valor adient per proporcionar un metabolisme més ràpid, i a més, l'ARN d'interferència es podia expressar millor degut a l'eficàcia del sistema UAS-GAL4.

Al primer tub, l'ARN d'interferència hauria d'actuar degradant el Dicer dels microARN tot inhibint l'expressió de microARNs madurs a les cèl·lules de les mosques resultants d'aquest encreuament.

Al segon tub, l'ARN d'interferència hauria d'actuar degradant el Dicer però amb una potència diferent que l'ARNi utilitzat en els organismes del tub anterior. De totes maneres, també s'hauria d'inhibir l'expressió de microARNs madurs a les cèl·lules de les mosques resultants d'aquest encreuament.

Al tercer tub, l'ARN d'interferència hauria d'actuar degradant el gen GFP que no té cap efecte en el desenvolupament i creixement de l'ala, per tant, la mida de l'ala hauria de restar inalterada. Els organismes resultants d'aquest encreuament s'anomenen CONTROL ja que haurien de representar el comportament normal del creixement de l'ala, sense cap modificació.

Per extreure conclusions d'un experiment és necessari aplicar el procediment a diverses mosques, ja que els resultats d'un sol individu no són suficients per poder extreure conclusions generals.



Figura 48: *Drosophila Melanogaster* mascles



Figura 49: *Drosophila Melanogaster* femelles verges Ci-Gal 4

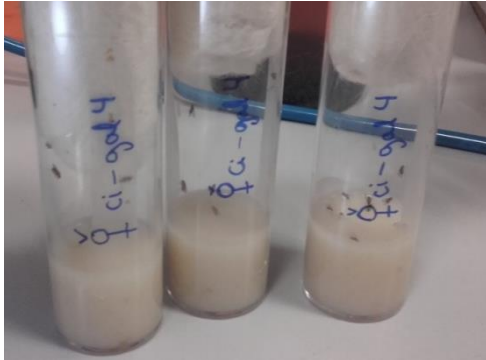


Figura 50: 8 *Drosophila Melanogaster* femelles verges Ci-Gal 4 a cada tub



Figura 51: 8 *Drosophila Melanogaster* femelles verges Ci-Gal 4

Més tard, es va introduir en un Eppendorf una dissolució composta per glicina i etanol anomenada SH, per tal de conservar millor les mosques. A cada Eppendorf s'hi va introduir 10 mosques femelles i 10 mosques mascles resultants dels tres encreuaments diferents:

- Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi
- Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi
- Ci-Gal 4 x UAS-GFP ARNi

Es va treballar amb mascles i femelles per separat ja que els mascles tenen tendència a ser més petits que les femelles, fet que comportaria resultats erronis a l'hora de fer una anàlisi general si s'inclouen els dos gèneres.

Conseqüentment, es van mantenir separades les 10 mosques de cada sexe resultants dels tres encreuaments realitzats, a diferents Eppendorfs. Així doncs, hi havia un total de sis Eppendorfs amb continguts diferents:

- Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi
 - o 10 Mascles
 - o 10 Femelles

- Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi
 - o 10 Mascles
 - o 10 Femelles
- Ci-Gal 4 x UAS-GFP
 - o 10 Mascles
 - o 10 Femelles



Figura 52: Mascles espècie *Drosophila Melanogaster*



Figura 53: Femelles espècie *Drosophila Melanogaster*

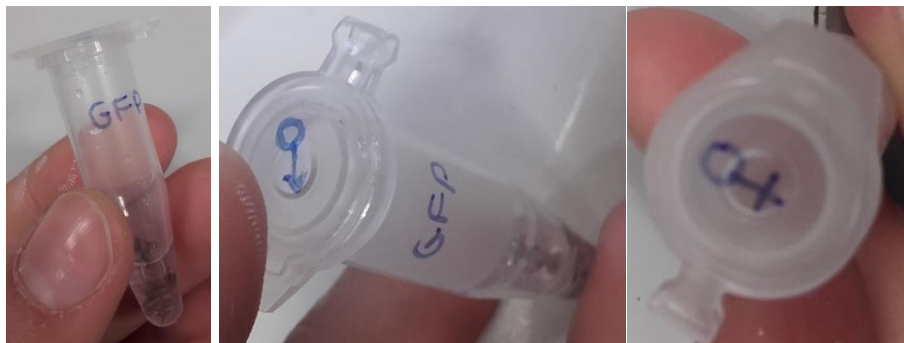


Figura 54: *Drosophila Melanogaster* amb el gen de fluorescència (GFP) alterat



Figura 55: *Drosophila Melanogaster* dipositades a Eppendorfs diferents segons la seva seqüència gènica

Seguidament, es van introduir 10 mosques femelles resultants dels tres encreuaments a tres plaques diferents segons l'encreuament del qual procedien. Es va decidir treballar amb femelles ja que són més grans i és més fàcil identificar l'expressió dels gens. Tot seguit, es van treure les dues ales de cadascuna de les mosques que es trobaven a les plaques inundades amb aigua (per consegüent les mosques estaven mortes) amb l'ajuda d'unes pinces i un microscopi òptic.

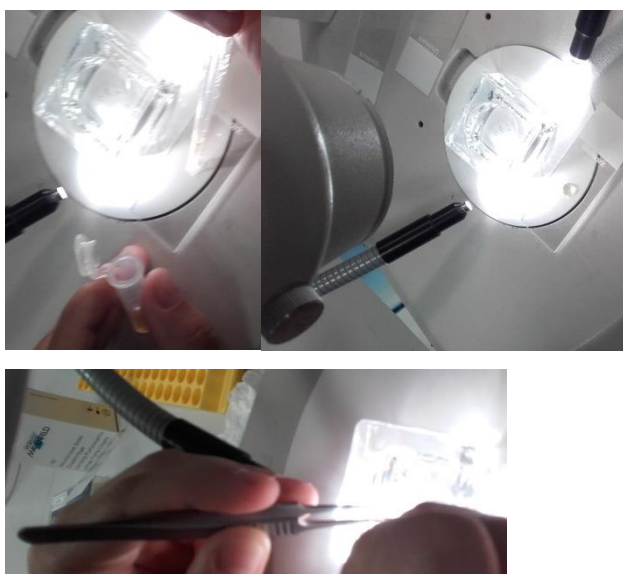


Figura 56: Dissecció d'ales de *Drosophila Melanogaster*

Tot seguit, es van muntar les ales en una gota de Faure que es va preparar damunt d'un portaobjectes, es va col·locar un cobraobjectes al damunt i es van observar les ales al microscopi.

Es va repetir aquest mateix procediment per a cadascuna de les plaques que contenia 10 mosques femelles resultants dels tres encreuaments diferents.



Figura 57: Ales *Drosophila Melanogaster*

Es van obtenir imatges mitjançant un programa informàtic anomenat Cell F que estava connectat al microscopi. A partir de les imatges capturades es va poder definir l'àrea de les ales i del compartiment anterior de cadascuna d'elles ja que és on s'hi expressa la construcció gènica inserida, amb un programa informàtic anomenat Image J. Finalment, es va poder elaborar una anàlisi estadística per tal d'obtenir una significació.



Figura 58: Ala *Drosophila Melanogaster*

A les imatges cal distingir el compartiment anterior de l'ala que dista des de la segona vena començant a comptar per la part inferior de l'ala, fins a la part superior d'aquesta. I per altre costat, el compartiment posterior que representa la part inferior de l'ala.

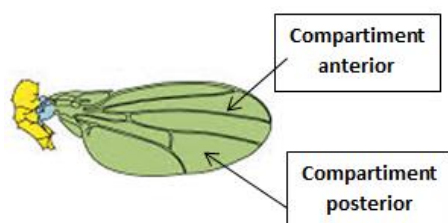


Figura 59: Estructura de l'ala de *Drosophila Melanogaster*

Font: <http://www.scielo.br/img/revistas/isz/v101n4/a09fig14-16c.jpg>

3.3. FUNCIO DE Myc EN DROSOPHILA MELANOGASTER

En primer lloc, es va tornar a reprimir la maquinària de microARNs tot utilitzant un ARN d'interferència que degradés l'expressió de Dicer, i per tant, impedís el procés de maduració dels microARNs. Seguidament, per tal de veure com s'expressa la proteïna Myc a les cèl·lules dels discs d'ala sense maquinària de microARNs, es va realitzar un protocol de dissecció dels discs d'ala i d'immunotinció d'aquests. El fet de voler treballar amb discs d'ala va implicar l'ús de larves enlloc de mosques, ja que aquestes presenten teixits primordials (discs d'ala) que donaran lloc a òrgans quan la larva assolixi l'etapa adulta de la mosca (ales).

3.3.1. Dissecció discs d'ala:

Per a començar, es van seleccionar les larves més grans (tercer estadi o *prepupes*) resultants de l'encreuament Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi, per tant, amb manca de maquinària de microARNs al compartiment anterior de l'ala que és on s'hi expressa el gen Ci.



Figura 60: Selecció de larves del tercer estadi

Seguidament, es van disseccionar les larves per poder-ne observar els discs d'ala, és a dir, d'una en una es van anar col·locar en una placa amb aigua per ofegar-les, i un cop mortes, poder-les observar al microscopi òptic per tal de poder subjectar-les pels dos extrems amb l'ajuda de dues pinces i anar desplaçant la pinça que subjectava la part fosca de la larva que representa la zona del cap i les peces bucals fins aconseguir separar el cap del cos de la larva.



Figura 61: Estructura larva *Drosophila Melanogaster*

Més tard, es va retirar el cos de la larva de la preparació ja que els discs d'ala es troben a la zona propera al cap. Tot seguit, es va col·locar una pinça al cap de la larva i una altra a l'altre extrem pel qual s'havia partit la larva, de manera que amb l'ajuda de les dues pinces es va aconseguir donar la volta al cos de la larva per poder observar els discs dels òrgans que hi havia a l'interior.

Finalment, es va realitzar un protocol d'immunotinció per tal de poder veure l'expressió de Myc al microscopi.

3.3.2. Immunotinció de discos marginals de *Drosophila Melanogaster*

En primer lloc, un cop es van haver disseccionat els discs d'ala, es van posar en un medi amb PBS que es tracta d'una solució isotònica en estat de gel que no és tòxica per a les cèl·lules. Tot seguit, es va fixar els discs amb PBS i formaldehid durant 20 minuts. Un cop passat aquest temps, es van rentar 3 vegades durant 10 minuts amb PBT els discs d'ala i es van tornar a rentar 3 vegades més durant 15 minuts amb BBT per tal de bloquejar-los, de manera que l'anticòs primari que es va afegir posteriorment fos més específic i només s'unís a la proteïna adequada (Myc). Al dia següent, es van rentar els discs d'ala 4 vegades durant 20 minuts amb BBT per tal d'extreure les restes de l'anticòs primari que no s'havien pogut unir a Myc, es va afegir l'anticòs secundari i es va incubar durant 90 minuts. Finalment, es van rentar els discs quatre vegades durant 15 minuts amb PBT per tal d'eliminar les restes d'anticòs secundari que no s'havien pogut unir a l'anticòs primari, i es van muntar per tal d'observar-los al microscopi.

En excitar amb una llum d'una longitud d'ona determinada l'anticòs secundari que portava adjunt un fluoròfor, aquest absorbia la llum i l'emetia en una longitud d'ona diferent donant lloc a un altre color.

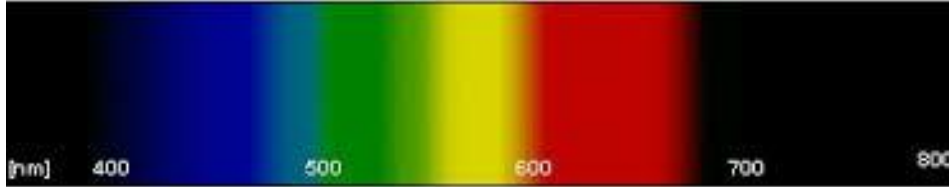


Figura 62: Esquema de longituds d'ona

Font: <http://elblogdeniury.files.wordpress.com/2011/07/espectrovisible.jpg?w=426&h=156>

D'aquesta manera, es va poder veure on s'expressava la proteïna Myc en els discs d'ala i a quin dels dos compartiments s'hi expressava més: al compartiment anterior on s'havia eliminat la maquinària de microARNs, o al compartiment posterior on encara hi restava la seva presència.

3.4. PAPER DE MEI-P26 EN L'EXPRESSIÓ DE Myc

Per a dur a terme aquesta última part experimental, es va utilitzar *Drosophila Melanogaster* amb tres tipus de construccions genètiques diferents que se'ls hi havia inserit anteriorment al seu genoma:

- EPPENDORF 1: Ci - Gal4 x UAS - Dicer¹ARNi - Dicer Mei-P26
- EPPENDORF 2: Ci-Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi
- EPPENDORF 3: Ci-Gal4 x UAS-GFP ARNi (control)

Les tres classes de mosques es trobaven en Eppendorfs diferents segons la construcció genètica que presentaven.



Figura 63: Eppendorfs amb *Drosophila Melanogaster* de diferents construccions genètiques

En primer lloc, es va separar els mascles de les femelles de cadascun dels Eppendorfs, i només es van seleccionar les femelles com ja s'havia fet a la primera part pràctica a la qual es volia determinar quin era el paper dels microARNs en el creixement de l'ala de les *Drosophila*.



Figura 64: Femelles *Drosophila Melanogaster*

Un cop es van haver seleccionat les femelles, van ser disseccionades tot traient les dues ales de cadascuna d'elles amb l'ajuda d'unes pinces i un microscopi. Es van muntar les ales a una gota de Faure que s'havia col·locat a la superfície d'un portaobjectes que es va cobrir amb un cobrobjectes per poder observar les ales al microscopi.



Figura 65: Dissecció d'ales *Drosophila Melanogaster*

El microscopi estava connectat a un programa anomenat Cell F que va permetre obtenir imatges de cadascuna de les ales. Més tard, es va utilitzar un altre programa anomenat Fiji per tal de quantificar la mida de les ales i obtenir-ne la seva àrea total i del compartiment anterior on s'hi expressa la construcció gènica inserida. Amb les dades obtingudes es va completar una taula a l'Excel i es va fer una mitjana de tots els resultats per obtenir-ne uns de conclusius.



Figura 66: Ales de femelles *Drosophila Melanogaster*



Figura 67: Ales de femelles *Drosophila Melanogaster* amb Faure

No obstant, els resultats obtinguts no es corresponien amb els lògics, així que es va tornar a repetir aquesta última part experimental amb algunes modificacions, tot i que generalment, es va seguir un procediment molt similar al que s'ha descrit anteriorment, però amb la única diferència de les construccions genètiques insertades a les *Drosophila Melanogaster*:

- EPPENDORF 1: Hh - Gal4 x UAS - Dicer¹ARNi - Dicer Mei-P26
- EPPENDORF 2: Hh - Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi

Les classes de mosques es trobaven en Eppendorfs diferents segons la construcció genètica que se'ls hi havia inserit.



Figura 63: Eppendorfs amb *Drosophila Melanogaster* de diferents construccions gèniques

En primer lloc, es van separar els mascles de les femelles de cadascun dels Eppendorfs, i només es van utilitzar les femelles.



Figura 64: Femelles *Drosophila Melanogaster*

Un cop es van haver seleccionat les femelles, van ser disseccionades traient les dues ales de cadascuna d'elles i posant-les en una gota de Faure que s'havia col·locat a la superfície d'un portaobjectes.



Figura 65: Dissecció d'ales *Drosophila Melanogaster*

Seguidament, es va cobrir la mostra amb un cobraobjectes i es va observar al microscopi òptic connectat a un programa anomenat Cell F que va permetre obtenir imatges de cadascuna de les ales. Més tard, es va utilitzar un altre programa anomenat Fiji per tal de quantificar la mida de les ales i obtenir-ne l'àrea de cadascuna d'elles i també del compartiment posterior on s'hi expressava la construcció genètica inserida. Amb les dades obtingudes es va completar una taula a l'Excel i es va fer una mitjana de tots els resultats per obtenir-ne uns de conclusius.



Figura 66: Ala femella Drosophila Melanogaster al programa Cell F

4. RESULTATS i ANÀLISIS

4.1. EFECTE DELS microARNs EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Per aquesta primera part experimental, es van plantejar tres possibles hipòtesis pels futurs resultats obtinguts, que es van poder comprovar un cop va estar finalitzada:

- a) Que no es produeixi cap alteració en el creixement de les ales de *Drosophila Melanogaster* després d'haver reprimint l'expressió de la maquinària de microARNs vist que aquesta no tindria cap efecte regulador en el creixement i desenvolupament de l'ala.
- b) Que el compartiment de l'ala de *Drosophila Melanogaster* on s'ha suprimit la maquinària de microARNs augmenti respecte l'ala control.
- c) Que el compartiment de l'ala de *Drosophila Melanogaster* on s'ha suprimit la maquinària de microARNs disminueixi respecte l'ala control.

Un cop s'han obtingut els resultats de la primera part pràctica que pretenia demostrar quin paper té la maquinària de microARNs sobre l'expressió del gen que impulsa el creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster*, es pot afirmar que la hipòtesi vàlida és la tercera ja que s'ha observat que en reprimir la maquinària de microARNs presents a les cèl·lules tot inhibint l'expressió de la proteïna Dicer que desenvolupa una funció fonamental per la maduració de microARNs, el creixement de l'ala és menor. Per tant, els microARNs tenen un paper regulador important en el creixement i desenvolupament de les ales de les mosques *Drosophila Melanogaster*. Es dedueix que la manca d'aquesta maquinària provoca la sobreexpressió d'una proteïna que degrada el gen responsable del creixement de les ales. A la següent part pràctica s'intenta determinar de quin gen es tracta, tot proposant que el responsable del creixement i desenvolupament de les ales de les mosques *Drosophila Melanogaster* és el gen Myc.

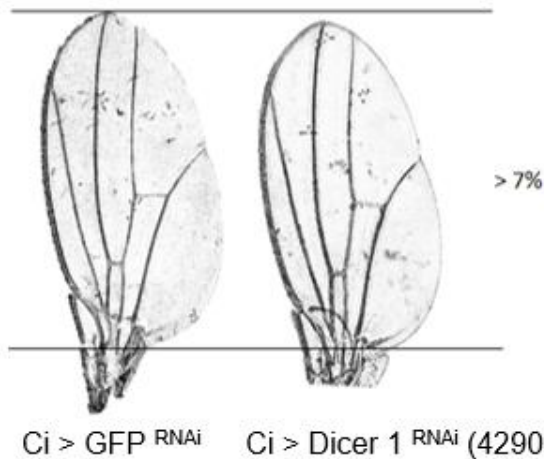


Figura 68: Comparació ala control i ala amb maquinària de microARNs inactiva

Tal i com es pot comprovar als resultats, l'absència de microARNs provoca una reducció de la mida de l'ala de la mosca equivalent a un 7% de la seva totalitat.

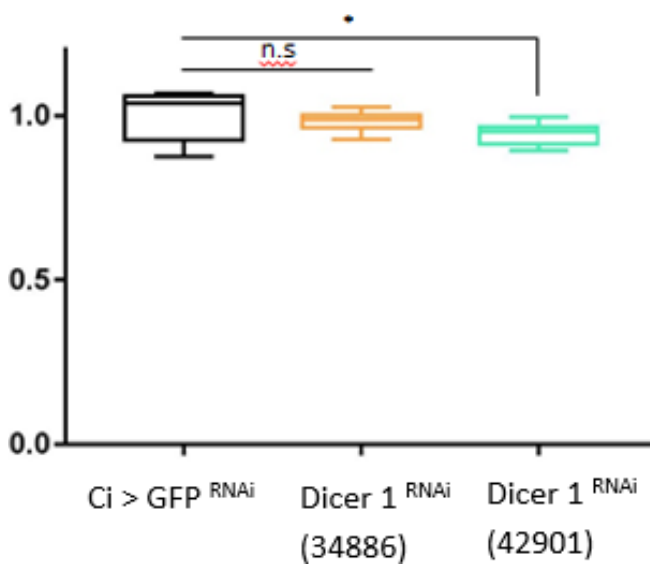


Figura 69: Comparació gràfica de l'àrea d'una ala control i ales tractades amb diferents alteracions d'expressió de Dicer

Per un costat, les ales de les mosques que tenien la seqüència Dicer 1 ARNi (34886) al seu genoma no s'hi pot distingir tan clarament la reducció de l'ala com a les mosques que contenen la seqüència Dicer 1 ARNi (42901) al seu genoma, ja que a les primeres s'hi usa un ARN d'interferència menys potent i per tant, degrada menys l'expressió de Dicer que alhora no permet la repressió total de la maquinària de microARNs, així

que aquesta té algun efecte en la inhibició de l'expressió de la proteïna intermèdia que regula l'expressió de Myc, i en ser més degradada permet la possibilitat de l'expressió de Myc; d'aquesta manera, les ales tenen una mida major. Per altre costat, a les ales de les mosques amb la seqüència Dicer 1 ARNi (42901) al seu genoma s'hi mostra més clarament l'efecte regulador de la maquinària de microARNs sobre el gen que promou el creixement de l'ala, ja que es tracta d'un ARN d'interferència molt més potent que degrada quasi totalment la maquinària de microARNs que provoca la sobreexpressió de la proteïna intermèdia que degrada l'expressió de Myc, i per conseqüent, l'ala té una mida menor.

Seguidament es mostren les àrees de cadascuna de les ales de les mosques *Drosophila Melanogaster* amb diferents seqüències gèniques:

GFP RNAi		
TOTAL	ANTERIOR	Anterior/total
3,16	1,77	0,560126582
3,24	1,68	0,518518519
3,22	1,76	0,546583851
3,17	1,76	0,555205047
3,4	1,59	0,467647059
3,38	1,55	0,458579882
3,4	1,65	0,485294118
3,29	1,71	0,519756839
3,13	1,74	0,555910543
3,11	1,69	0,54340836
3,15	1,76	0,558730159
3,240909091	1,696363636	0,524523723

Figura 70: Dades resultants de l'àrea de l'ala control (GFP)

La taula anterior proporciona dades de les mosques control (GFP) que no tenen la proteïna Dicer alterada, de manera que la maquinària de microARNs s'expressa i duu a terme la seva funció de manera habitual que consisteix en degradar la proteïna que regula l'expressió del gen Myc que promou el creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster*.

La primera columna mostra l'àrea total de les ales de les mosques amb la seqüència Ci-Gal4 - UAS-GFP ARNi al seu genoma.

A la segona columna s'hi exposa l'àrea del compartiment anterior de les ales de les mateixes mosques on el gen Ci té efecte, per tant, s'hi dona la degradació de l'expressió del gen GFP.

La darrera columna mostra la relació de l'àrea del compartiment anterior de l'ala de les mateixes mosques amb l'àrea total d'aquesta.

A sota de cadascuna de les columnes s'hi ha calculat una mitjana dels valors per tal de poder establir comparacions amb mosques que se'ls hi ha inserit seqüències genètiques diferents. Pel fet que aquestes mosques representen la mostra control, se'ls hi ha adjudicat el valor de referència equivalent a 1.

34886 RNAi			
TOTAL	ANTERIOR	Anterior/total	
3,36	1,72	0,511904762	
3,46	1,8	0,520231214	
3,34	1,72	0,51497006	
3,31	1,61	0,486404834	
3,47	1,82	0,524495677	
3,18	1,68	0,528301887	
3,46	1,86	0,537572254	
3,32	1,69	0,509036145	
3,56	1,75	0,491573034	
3,45	1,81	0,524637681	
3,391	1,746	0,514912755	1,018665237

Figura 71: Dades resultants de la mida d'ala amb Dicer alterat per un tipus d'ARN d'interferència 1

La segona taula proporciona dades de les mosques que tenen la proteïna Dicer (necessària per la maduració dels microARNs) alterada per mitjà d'un ARN d'interferència del tipus 34886. De manera que la maquinària de microARNs es veu reprimida i provoca una sobreexpressió de la proteïna que degrada el gen Myc tot obtenint ales més reduïdes.

La primera columna mostra l'àrea total de les ales de les mosques amb la seqüència Ci-Gal4 - UAS-Dicer (34886) ARNi al seu genoma.

A la segona columna s'hi exposa l'àrea del compartiment anterior de les ales de les mateixes mosques on el gen Ci té efecte, per tant, s'hi dona la degradació de l'expressió de la proteïna Dicer.

La darrera columna mostra la relació de l'àrea del compartiment anterior de l'ala de les mateixes mosques amb l'àrea total d'aquesta.

A sota de cadascuna de les columnes s'hi ha fet una mitjana dels valors.

En aquest tipus de mosques s'ha obtingut un resultat d'1,02 després de dividir el quocient de la mitjana dels valors del compartiment anterior i total de la mosca amb el Dicer alterat per l'ARN d'interferència 34886 i la mosca control. Si es compara amb el valor de referència de les ales control es podria deduir que l'àrea de les mosques amb el Dicer alterat és major, així doncs, el resultat obtingut no s'ajustaria a la tercera hipòtesi plantejada i considerada veritable. Conseqüentment, s'ha decidit analitzar el resultat i s'ha comprovat que aquest valor no és significatiu degut a la desviació dels punts analitzats.

42901 RNAi			
TOTAL	ANTERIOR	Anterior/total	
3,41	1,72	0,504398827	
3,41	1,78	0,521994135	
3,28	1,71	0,521341463	
3,43	1,73	0,504373178	
3,31	1,55	0,468277946	
3,56	1,73	0,485955056	
3,32	1,59	0,478915663	
3,34	1,69	0,505988024	
3,57	1,7	0,476190476	
3,43	1,71	0,498542274	
3,44	1,66	0,48255814	
3,409090909	1,688181818	0,49532138	0,944326
	0,78724896	0,032130989	

Figura 72: Dades resultants de la mida d'ala amb Dicer alterat per un tipus d'ARN d'interferència 2

La tercera taula proporciona dades de les mosques que tenen la proteïna Dicer, necessària per la maduració dels microARNs, alterada per mitjà d'un ARN d'interferència del tipus 42901. De manera que la maquinària de microARNs es veu reprimida i provoca una sobreexpressió de la proteïna que degrada el gen Myc tot obtenint ales més reduïdes.

La primera columna mostra l'àrea total de les ales de les mosques amb la seqüència Ci-Gal4 - UAS-Dicer (42901) ARNi al seu genoma.

A la segona columna s'hi exposa l'àrea del compartiment anterior de les ales de les mateixes mosques on el gen Ci té efecte, per tant, s'hi dona la degradació de l'expressió de la proteïna Dicer amb una potència diferent que a les mosques anteriors.

La darrera columna mostra la relació de l'àrea del compartiment anterior de l'ala de les mateixes mosques amb l'àrea total d'aquesta.

A sota de cadascuna de les columnes s'hi ha fet una mitjana dels valors.

En aquest tipus de mosques s'ha obtingut un resultat de 0'94 després de dividir el quocient de la mitjana dels valors del compartiment anterior i total de la mosca amb el Dicer alterat per l'ARN d'interferència 49201 i la mosca control. Si es compara amb el valor de referència de les ales control es dedueix que l'àrea de les mosques amb el Dicer alterat és menor, fet que s'ajusta a la tercera hipòtesi plantejada ja que mostra que la mida de l'ala ha estat reduïda en inhibir el paper dels microARNs. Per tal de comprovar els resultats s'ha calculat la coincidència de les mides de les ales obtingudes amb les ales de les mosques control que correspon a un 7%, a més, els resultats són considerats significatius ja que s'obté un valor de coincidència menor del 0'05, concretament, de 0'03.

Tot i haver realitzat una significació dels resultats per comprovar quin dels dos encreuaments amb el Dicer alterat, de manera que s'inhibia la funció de la maquinària de microARNs, proporcionava dades correctes, es va decidir repetir el mateix experiment amb un altre ARN d'interferència més potent que degradés l'expressió de la proteïna Dicer de manera més eficaç, i així, inhibís el funcionament de la maquinària de microARNs.

Es va tornar a realitzar el mateix procediment de dissecció explicat a la metodologia que consistia en treure les dues ales de cadascuna de les mosques, muntar-les en una preparació de Faure damunt un portaobjectes cobert per un cobraobjectes i observar-les a un microscopi òptic connectat a un programa que permetia obtenir-ne imatges per tal de calcular-ne les àrees desitjades. Els valors obtinguts després de quantificar les imatges de les ales de les mosques tractades amb aquest ARN d'interferència més potent han estat els següents:

Dcr2; Ci >			
CONTROL (GFP)		DICER RNAi	
ANTERIOR	ANTERIOR REL	ANTERIOR	ANTERIOR REL
2,217105263	0,896850625	2,08974359	0,845331016
2,782178218	1,125430675	2,041176471	0,825684925
2,136645963	0,864303693	2,071005917	0,837751361
2,826086957	1,143192385	2,066666667	0,835996072
2,701923077	1,092966329	2,04	0,825209026
2,513274336	1,016655229	2,122699387	0,858662105
2,198630137	0,889377174	2,049689441	0,829128543
2,70754717	1,095241354	2	0,809028457
2,165517241	0,875982536	2,043478261	0,826616032
2,472100929	1	2,058273304	0,832600837
			0,000630379

Figura 74: Dades resultants de la mida d'ala amb Dicer alterat per un tipus d'ARN d'interferència 3

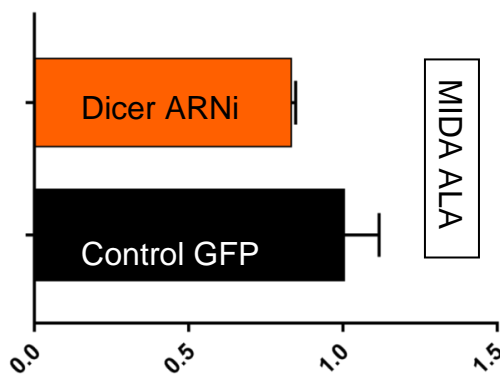


Figura 75: Gràfic amb els valors mitjans de les mides d'ala de *Drosophila Melanogaster* amb diferent seqüència genica

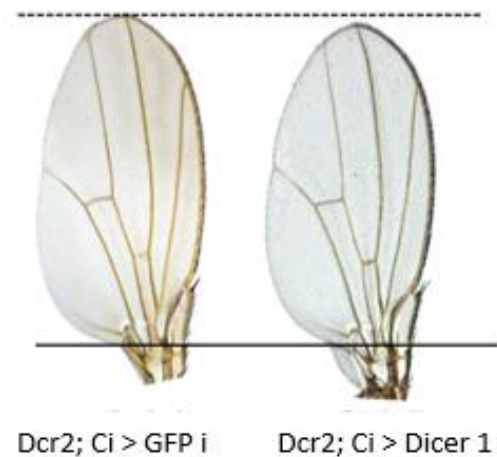


Figura 76: Comparació ala control i ala amb maquinària microARN inactivada

D'aquesta manera, es pot donar totalment per vàlida la tercera hipòtesi que afirma que al compartiment de l'ala de *Drosophila Melanogaster* on s'hi ha suprimit la maquinària de microARNs disminueixi respecte l'ala control. Per tant, aquesta maquinària té un efecte regulador indirecte sobre l'expressió del gen Myc que promou la proliferació i creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster*.

4.2. FUNCIO DE Myc EN DROSOPHILA MELANOGASTER

Després d'haver realitzat aquesta segona part experimental, es va poder afirmar que el gen que codifica la proteïna responsable del desenvolupament i creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster* és Myc.

Un cop es van realitzar els protocols de dissecció i immunotinció dels discs d'ala de larves que tenien la seqüència Ci-Gal 4 x UAS-Dicer¹ARNi al seu genoma, aquests van poder ser observats al microscopi connectat a un programa que permetia l'obtenció de les imatges següents:

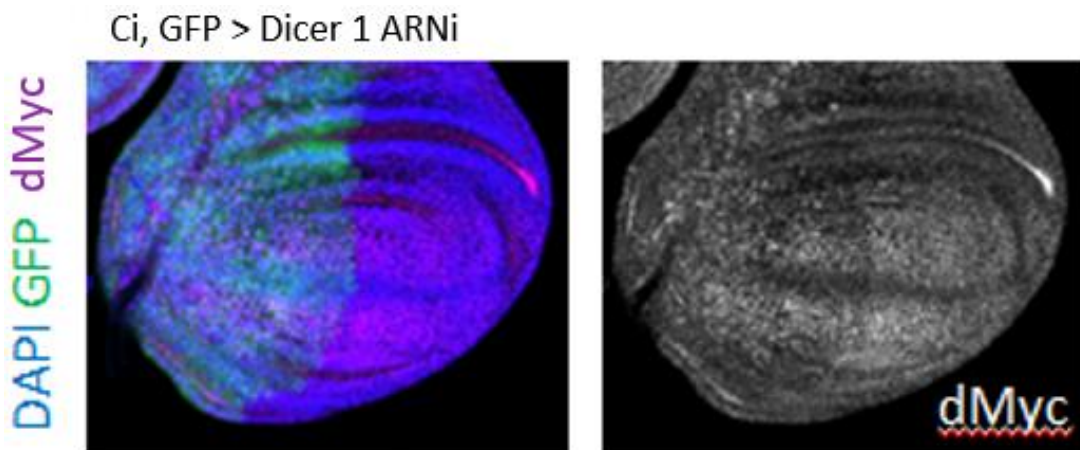


Figura 77: Expressió de Myc a l'ala de *Drosophila Melanogaster* amb la maquinària de microARNs inactivada

Observant les imatges es pot comprovar que el gen Myc es troba menys expressat al compartiment anterior de l'ala degut a l'efecte regulador dels microARNs, ja que en reprimir la seva funció de degradació es sobreexpressa una proteïna que alhora degrada l'expressió de Myc i per aquest motiu l'ala és menor.

*És important conèixer que DAPI es tracta d'una proteïna que s'expressa a la cromatina, és a dir, al material genètic que es troba al nucli de les cèl·lules, concretament s'expressa a les parelles de les bases nitrogenades Adenina-Timina. Per tant, el color blau indica la presència dels nuclis de les cèl·lules.

En aquest encreuament, el gen de fluorescència GFP serveix per reconèixer el compartiment anterior de l'ala de *Drosophila Melanogaster* ja que està lligat al *driver gen* Ci que només s'expressa a aquest compartiment. Així doncs, el color verd indica la superfície del compartiment anterior de l'ala.

Finalment, el color violeta representa el fluoròfor adjunt de l'anticòs secundari que s'uneix a l'anticòs primari que alhora s'uneix específicament a la proteïna Myc gràcies al protocol d'immunotinció explicat a la metodologia. Per conseqüència, el color violeta indica els llocs on es dona l'expressió de la proteïna Myc, que tal i com es pot veure a la imatge, la proteïna està menys expressada al compartiment anterior que al posterior ja que és la part de l'ala on s'hi ha suprimit la maquinària de microARNs, així doncs, els resultats obtinguts són totalment coherents amb la hipòtesi plantejada.

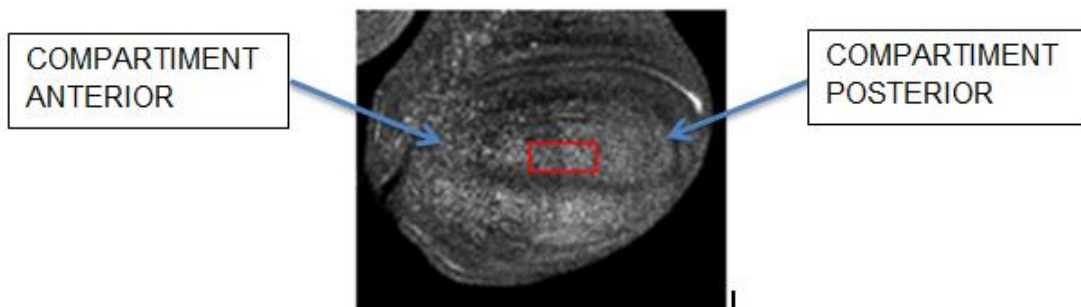


Figura 78: Expressió de Myc a l'ala de *Drosophila Melanogaster* amb la maquinària de microARNs inactiva

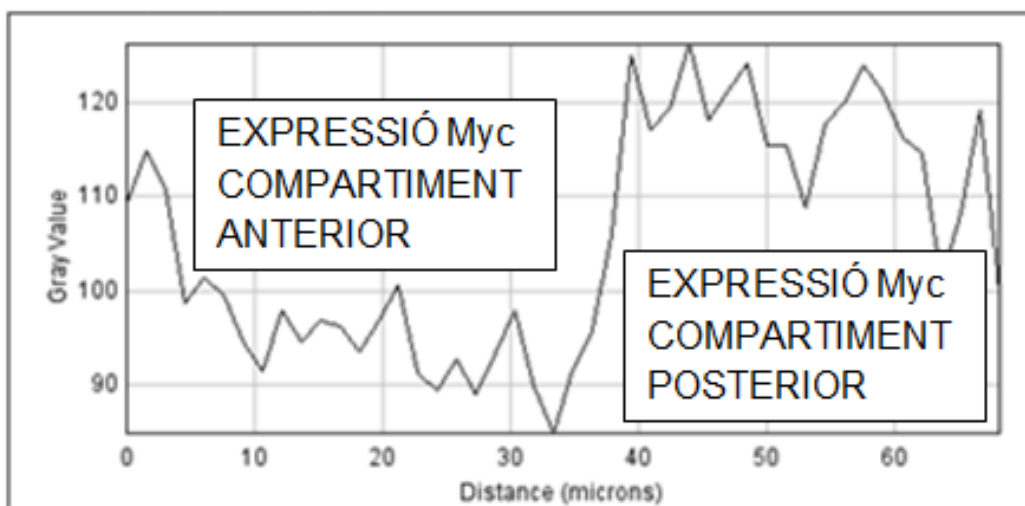


Figura 79: Gràfic que mostra l'expressió de Myc als diferents compartiments de l'ala de *Drosophila Melanogaster* amb la maquinària de microARNs inactiva

4.3. PAPER DE MEI-P26 EN L'EXPRESSIÓ DE Myc

Malauradament, després d'haver realitzat per primer cop aquesta tercera part experimental, els resultats obtinguts no van coincidir amb la hipòtesi plantejada que consistia en què els microARNs són responsables de degradar una proteïna anomenada Mei-P26 que alhora degrada a la proteïna Myc responsable del desenvolupament i creixement de l'ala en *Drosophila Melanogaster*.

Els resultats no són correctes ja que en inhibir l'expressió de la maquinària de microARNs, la proteïna Mei-P26 no es sobreexpressava de manera que l'expressió de Myc no es degradava i tampoc es reduïa la mida de l'ala. Així doncs, es va deduir que l'ARN d'interferència usat no era prou potent per reprimir l'expressió de Dicer que impediria la maduració dels microARNs, tot provocant que la mida de l'ala es mantingués semblant a la de l'ala control, l'ala per naturalesa que no ha estat tractada.

Per altra banda, la semblança entre l'ala control i l'ala procedent d'una mosca amb l'expressió de Dicer i la proteïna Mei-P26 inhibida es correspon amb els resultats esperats, ja que en reprimir l'expressió d'aquestes dues proteïnes s'aconsegueix que Myc no estigui regulat per cap agent i per tant, la mida de l'ala no varia respecte l'ala control.

Tot i que no s'ha obtingut els resultats desitjats en un dels casos, s'ha comprès l'error efectuat.

Així doncs, una de les possibles línies futures de treball podria consistir en tornar a provar el mateix experiment utilitzant un ARN d'interferència més potent que en suprimir-lo de la cèl·lula produís una sobreexpressió de la proteïna Mei-P26 i alhora la degradació de Myc que es manifestaria en la reducció de la mida de l'ala (resultats que s'havien obtingut a la primera part pràctica que pretenia determinar la funció de la maquinària de microARNs en el procés d'expressió genètica).

També es podrien provar altres proteïnes capaces de realitzar la funció de Mei-P26, és a dir, ser degradades per la maquinària de microARNs i alhora

degradar l'expressió de Myc. Tot i que si es té en compte el resultat obtingut en reprimir l'expressió de la maquinària de microARNs i també la de la proteïna Mei-P26, la mida de l'ala no varia respecte l'ala control, d'aquesta manera es pot afirmar que Mei-P26 té una funció en degradar Myc ja que en suprimir-la aquest gen no es veu afectat.

No obstant, s'ha tornat a repetir aquesta tercera part pràctica tot usant un *driver gen* diferent que s'expressa al compartiment posterior de l'ala de la mosca *Drosophila Melanogaster* ja que té una expressió proteica més alta que el Ci.

Així doncs, la repetició de la tercera part pràctica es va dur a terme amb mosques *Drosophila Melanogaster* que contenen diferents construccions al seu genoma, ja que enlloc de contenir-hi Ci tenien com a *driver gen* el Hedgehog (Hh).

Després de realitzar els següents encreuaments se n'ha obtingut descendència:

- EPPENDORF 1: Hh-Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi i UAS-MeiP26ARNi
- EPPENDORF 2: Hh - Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi

A partir de la descendència obtinguda s'han pogut determinar dades demostratives:

UAS-Dicer 1 RNAi			
T	P	R	
3,04	1,66	0,546052632	0,987129181
3,11	1,68	0,540192926	0,976536272
3,08	1,68	0,545454545	0,986047988
3,36	1,81	0,538690476	0,973820211
3,00	1,64	0,546666667	0,988239206
3,07	1,72	0,560260586	1,012813678
2,98	1,66	0,55704698	1,007004266
2,96	1,71	0,577702703	1,044344745
3,29	1,77	0,537993921	0,97256101
3,18	1,78	0,559748428	1,01188782
3,14	1,75	0,557324841	1,00750657
2,89	1,65	0,570934256	1,032109054
3,091666667	1,709166667	0,553172413	

Figura 80: Dades resultants de l'àrea de l'ala de les mosques obtingudes de l'encreuament Hh - Gal4 x UAS-Dicer¹ARNi

UAS-Dicer 1 RNAi, Mei-P26 RNAi		
T	P	R
3,37	1,8	0,534124629
2,81	1,77	0,629893238
3,38	1,83	0,541420118
2,62	1,71	0,652671756
2,8	1,74	0,621428571
2,78	1,74	0,625899281
3,12	1,67	0,53525641
2,9	1,88	0,648275862
2,84	1,77	0,623239437
3,12	1,65	0,528846154
2,974	1,756	0,594105546

Figura 81: Dades resultants de l'àrea de l'ala de les mosques obtingudes de l'encreuament Hh - Gal4 x UAS-Dicer1ARNi i UAS-MeiP26ARNi

La primera taula proporciona dades de les ales de les mosques amb la maquinària microARN reprimida, mentre que la segona s'hi presenten les dades de les ales de les mosques amb la maquinària microARNs i la proteïna Mei-P26 inexpressades.

A la primera columna de les taules s'hi mostra l'àrea total de les ales de les mosques, a la segona columna s'hi exposa l'àrea del compartiment posterior de cadascuna d'elles, i a la darrera columna s'hi mostra la relació de l'àrea del compartiment posterior de l'ala amb l'àrea total d'aquesta.

A sota de cadascuna de les columnes s'hi ha calculat una mitjana dels valors per tal de poder establir comparacions amb mosques que només tenen la maquinària de microARNs reprimida i les que amés també tenen la proteïna Mei-P26 inexpressada.

Tot observant detalladament els resultats obtinguts es pot demostrar que les ales on únicament s'hi reprimeix l'expressió de la maquinària de microARNs tenen una mida menor que les ales on s'hi reprimeix l'expressió de la maquinària de microARNs i la proteïna Mei-P26.

El resultat és lògic, ja que tal i com s'ha explicat al marc teòric, la proteïna Mei-P26 està regulada per la maquinària de microARNs i alhora regula l'expressió de Myc. D'aquesta manera, quan es reprimeix l'expressió de la

maquinària de microARNs els nivells d'aquesta proteïna augmenten i degraden la manifestació de Myc de manera que es redueix la mida de l'ala. Per altre costat, si es reprimeix l'expressió de la maquinària de microARNs i alhora la proteïna Mei-P26, el gen Myc no rep cap efecte de regulació, i consegüentment, la mida de l'ala no varia, així que és major que l'ala on únicament es reprimeix l'expressió de la maquinària de microARNs.

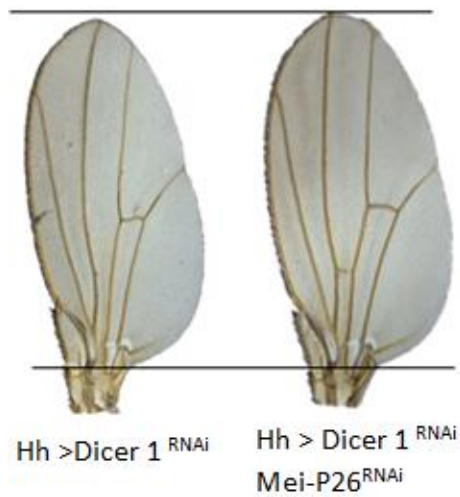


Figura 83: Comparació d'una ala amb manca d'expressió de la maquinària de microARNs i una ala amb maquinària microARN i proteïna Mei-P26 inexpressades

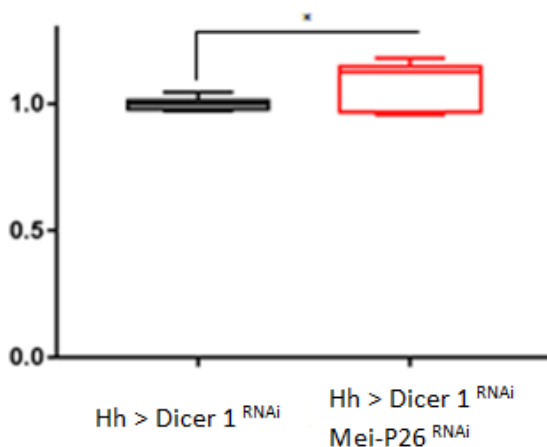


Figura 84: Comparació d'una ala amb manca d'expressió de la maquinària de microARNs i una ala amb maquinària microARN i proteïna Mei-P26 inexpressades

5. CONCLUSIONS:

Com a resultat de la investigació plantejada i desenvolupada en tres línies de recerca experimentals, s'ha obtingut resultats que permeten elaborar les següents conclusions.

En primer lloc, pel que fa a l'efecte que té la maquinària de microARNs sobre l'expressió genètica, s'ha pogut comprovar experimentalment sobre Myc, que es tracta d'un gen que codifica per una proteïna que controla diversos processos de proliferació i creixement cel·lular, i que, a més a més, també supervisa la replicació d'ADN. S'ha comprovat que en tots els tipus de càncer les cèl·lules tenen alts nivells de la proteïna Myc, ja que amb un excés d'aquesta, les cèl·lules es multipliquen exageradament donant lloc a la generació de tumors. Una qüestió fonamental sobre Myc consisteix en saber com les cèl·lules sanes mantenen els nivells d'aquesta proteïna de manera correcta. En aquest estudi realitzat en *Drosophila Melanogaster* s'ha descobert que la maquinària de microARNs controla els nivells de Myc a través de la molècula Mei-P26. Els microARNs són molècules petites que representen menys de l'1% del genoma humà però que tenen un paper clau en el funcionament de la cèl·lula ja que són capaços d'anul·lar o modificar l'expressió dels gens.

En estudis anteriors realitzats en ratolins es va demostrar que la proteïna Myc controla els nivells de microARNs de les cèl·lules, i ara, es descobreix que en la *Drosophila* els microARNs afecten els nivells de Myc. En el cas de la *Drosophila*, si es redueix el nivell de la proteïna Myc, automàticament s'endarrereix el creixement cel·lular i es redueix la mida de les cèl·lules, mentre que una sobreexpressió d'aquesta proteïna provoca un efecte contrari.

Un altre punt és pel que fa referència a la presència d'una proteïna intercalada en el procés de regulació de l'expressió de Myc que rep el nom de Mei-P26. Aquesta molècula és una proteïna que presenta una seqüència molt similar a una *E3-ubiquitin ligase*, per tant, desenvolupa una funció semblant. Aquesta funció consisteix en unir-se a una proteïna E2 i transferir un grup d'ubiquitina al substrat, que en aquest cas es tracta de Myc. L'ubiquitina és una molècula

reconeguda per unes estructures anomenades proteosomes que es troben a la cèl·lula i degraden a Myc degut a la identificació d'ubiquitina que s'hi troba adherida.

S'ha demostrat que eliminant la maquinària de microARNs de la *Drosophila Melanogaster* en una de les seves ales en desenvolupament, s'obtenen uns resultats molt similars que reprimint l'expressió de Myc: l'ala és més petita, les cèl·lules són més petites i no es divideixen correctament. Myc, doncs, controla el creixement de teixits, i com que les característiques de l'ala en els dos casos són molt similars, s'ha deduït que els microARNs i Myc estan relacionats. També s'ha descobert la proteïna Mei-P26, una molècula que en disminuir els nivells de microARNs en les cèl·lules, es sobreexpressa ja que no es veu degradada per aquesta maquinària, i així, reprimeix l'expressió de Myc.

La proteïna homòloga de Mei-P26, és a dir, que realitza la mateixa funció que aquesta però es troba en mamífers, s'anomena TRIM32. *Per tal de cercar proteïnes homòlogues en mamífers és molt útil consultar la pàgina web següent: www.genecards.org

En un segon bloc de conclusions, s'analitzen les dificultats que s'han presentat en la metodologia del treball i algunes propostes d'investigació per tal d'evitar-les:

Per una banda, el procés de selecció de femelles respecte els mascles no va ser fàcil, ja que la diferència entre aquests és difícil de distingir malgrat haver utilitzat un microscopi òptic. A més, seguidament es va haver de seleccionar dintre del grup de les femelles totes aquelles que eren verges, i la diferència tampoc és gaire marcada. Si prèviament a la selecció s'hagués realitzat una bona consolidació de les marques de diferència entre sexe i la característica de virginitat, el procés de selecció hagués estat molt més fàcil i efectiu. El mateix passa amb el procés de dissecció de discs d'ala, ja que la manca d'experiència ha portat a la repetició constant d'aquesta tasca, però si s'hagués rebut una formació del mètode de manera més detallada, s'haurien pogut evitar tantes repeticions. No obstant, cal tenir present que els mètodes d'experimentació s'aprenen a mesura que es practiquen.

Per altra banda, la descendència dels encreuaments es dona a l'atzar, de manera que no sempre s'obtenen els individus amb la construcció gènica desitjada. Una bona solució seria utilitzar rangs amplis d'organismes descendents, i així, poder seleccionar aquells que interessin segons la seva informació genètica.

També cal tenir present l'ús de cobraobjectes, ja que la manca d'aquests produeix un assecament de la dissolució que manté la mostra que es vol observar al microscopi i n'altera la seva presència.

Una altra dificultat important per esmentar, que a més, ha produït una alteració en els resultats, ha estat l'ús de Ci, un *driver gen* que no era prou potent i s'expressa minoritàriament a l'ala de la mosca, respecte el Hedgehog, el *driver gen* que es va utilitzar posteriorment.

Altrament, també cal potenciar l'ús d'ARNi que siguin el màxim eficients possibles, ja que són els responsables de degradar seqüències genètiques i d'aquesta manera es poden observar els resultats. No obstant, si la degradació no és el màxim d'efectiva, els resultats obtinguts no seran del tot correctes.

Finalment, també cal concloure que l'objectiu de la recerca va més enllà de la simple observació de l'efecte de la maquinària de microARNs, tot i que aquest mecanisme té una influència directa en els processos de l'epigenètica i per tant, sobre les variacions que es poden produir en l'expressió escrita dels gens i la relació que tenen amb els factors ambientals. Des de fa anys, es creu que l'ADN conté tota la informació genètica que qualsevol persona hereta i que allò que un individu faci al llarg de la seva vida no es transmet als seus fills. No obstant, aquesta maquinària de microARNs provoca que alguns gens no es puguin expressar, és a dir, influeix de manera directa en la genètica. Així doncs, aquest sistema i altres experiències ambientals dels individus, com la seva **nutrició** o l'**estrès**, afecten a les seqüències genètiques que són heretables. D'aquesta manera, també es pot demostrar la influència de l'epigenètica en l'**envelliment**, ja que al llarg dels anys es reprimeix l'expressió de nombrosos gens i això causa una distorsió de l'epigenoma. A més, aquest envelliment molecular ha resultat ser més destacat en certes regions de l'organisme, com en aquelles que participen en la **resposta immunològica**,

l'**obesitat** i el **metabolisme** o les vies implicades en la regulació del **càncer**. Això és degut al fet que els microARNs poden regular l'expressió de gens com Myc que en *Drosophila Melanogaster* impulsen la proliferació de teixits. Aquest creixement descontrolat de cèl·lules és el que pot donar lloc a la formació de tumors, siguin benignes o malignes, i donar lloc a un càncer.

Així mateix, la maquinària de microARNs, que tal i com s'ha esmentat és un factor destacat de l'epigenètica, també té una important influència pel que fa a la determinació de les funcions de les nostres cèl·lules. Atès que l'ADN s'enrotlla en forma de cromatina dintre cadascuna de les cèl·lules que formen els éssers vius, segons com sigui el seu enrotllament, la cèl·lula realitzarà unes funcions o unes altres. Així doncs, el mecanisme de la maquinària de microARNs que presenta la capacitat de degradar l'expressió d'alguns gens en forma de proteïnes, pot modificar les funcions de les cèl·lules pel fet que les proteïnes representen la unitat funcional d'aquestes. D'aquesta manera, qüestions relacionades amb la clonació d'organismes, alteracions cancerígenes i moltes altres malalties es poden entendre tenint en compte la presència d'aquest factor epigenètic.

No obstant, cal tenir en compte que hi ha altres factors epigenètics, a més de la maquinària de microARNs, que també poden alterar l'expressió genètica d'un organisme, com per exemple, la metilació de l'ADN (addició de grups metils a la cadena), o l'acetilació (addició de grups acetils a les proteïnes histones, responsables de l'enrotllament del material genètic). També poden alterar l'expressió genètica dels éssers vius factors ambientals com l'exposició a agents químics durant l'etapa prenatal i post-natal, la radiació solar, l'alimentació...

Tot això representa un avantatge pels éssers vius, ja que podem modificar positivament el nostre genoma mantenint hàbits de vida saludables. Un exemple el trobaríem en pacients alcohòlics, que solen patir deficiències de vitamines que al seu torn, provoquen la metilació del seu material genètic. Aquest fet està directament relacionat al desenvolupament de diverses malalties com per exemple alteracions autoimmunes o la mutació d'un gen responsable del síndrome de Rett (retràs mental en les dones), entre d'altres.

6. BIBLIOGRAFIA

ESTELLER PÉREZ, FERNÁNDEZ ESTEBAN, LABRADOR ENCINAS, LÓPEZ NOVOA, MARTÍNEZ MOLINA, REGUEIRO GONZÁLEZ, TORRES LOBEJÓN i VILLENA CORTÉS.(2010). *Biología* - 2. 1ª Edició. Barcelona: Vicens Vives.

DOCTOR MANEL ESTELLER (2014). *Aposta per la salut!*. 1ª Edició. Barcelona: Raval Edicions SLU, Pòrtic

SENESCIÈNCIA (2016). *Número 3: Epigenètica*. [en línia]. Revista de la Universitat de Barcelona sobre salut i benestar. Disponible a Internet: <<http://www.ub.edu/senesciencia/noticia/epigenetica-2/>>

STEVEN DOWSHEN, MD (2014). *Para padres - ¿Qué es la epigenética?* [en línia]. Disponible a Internet: <<http://kidshealth.org/es/parents/about-epigenetics-esp.html>>

FABIO CELNIKIER (2007) *Biología De La Mente y Epigenética*. [en línia]. Disponible a Internet: <<http://www.epigenetica.org/>>

REVISTA EIDON, Ch.(2012). *Epigenética*. [en línia]. Revista de la fundación de ciencias de la salud. Número 36 ISSN 2174 – 8292. Disponible a Internet: <<http://www.revistaeidon.es/archivo/crisis-y-salud/investigacion-y-ciencia/117910-epigenetica>>

NICOLÁS MAQUIAVELO (2013). *Epigenética: Caracteres adquiridos sobre nuestros genes*. [en línia]. Investigación y ciencia - Edición española de SCIENTIFIC AMERICAN – SciLogs – Medicina y Biología. Disponible a Internet: <<http://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/28/posts/epigenetica-caracteres-adquiridos-sobre-nuestros-genes-11009#comentarios>>

IRB BARCELONA (2007). *Més enllà del genoma: l'epigenètica*. [en línia]. Disponible a Internet: <<https://www.irbbarcelona.org/en/node/1272>>

RAQUEL BOQUÉ-SASTRE, MARTA SOLER, CRISTINA OLIVEIRA-MATEOS, ANNA PORTELA, CATIA MOUTINHO, SERGI SAYOLS, ALBERTO VILLANUEVA, MANEL ESTELLER i SONIA GUIL (2016). *Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation*. [en línia]. Disponible a Internet: <<http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/articulo-mes/1011-head-to-head-antisense-transcription-and-r-loop-formation-promotes-transcriptional-activation>>

RAQUEL BOQUÉ-SASTRE, MANEL ESTELLER i SÒNIA GUIL (2015). *La transcripción antisentido y la formación de un R loop promueven la activación transcripcional en un gen relacionado con cáncer*. [en línia]. Disponible a Internet: <<http://revistageneticamedica.com/2015/07/06/r-loop-activacion-gen-cancer/>>

NESSA CAREY (2012). *The Epigenetics Revolution*. 1^a Edició. Columbia University Press.

AUGUSTO ANGUITA (2016). *microARNs futuro prometedor en el tratamiento del cáncer*. [en línia]. Disponible a Internet: <<http://www.novgen.es/micrnas-y-cancer/>>

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS – DIEC 2 (2016). [en línia]. Disponible a Internet: <www.iec.cat>

ENCICLOPÈDIA (2016). [en línia]. Disponible a Internet: <www.enciclopedia.cat>

WIKIPEDIA (2016). [en línia]. Disponible a Internet: <www.wikipedia.org>

MICHAEL W KING PhD (2015). *Introducción y Síndromes de Cáncer Familiar y Supresores de Tumores*. [en línea]. Disponible a Internet: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/es/tumor-suppressors-sp.php>>

Hofmann, Jeffrey W; Zhao, Xiaoi; De Cecco, Marco; Peterson, Abigail L; Pagliaroli, Luca; Manivannan, Jayameenakshi; Hubbard, Gene B; Ikeno, Yuji; Zhang, Yongqing; Feng, Bin; Li, Xiayi; Serre, Thomas; Qi, Wenbo; Van Remmen, Holly; Miller, Richard A; Bath, Kevin G; de Cabo, Rafael; Xu, Haiyan; Neretti, Nicola; Sedivy, John M. (2015). *Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan*. [en línea]. Disponible a Internet: <<http://pesquisa.bvsalud.org/enfermeria/resource/es/mdl-25619689>>

LA JOHNSTON (2014). *Socializing With MYC: Cell Competition in Development and as a Model for Premalignant Cancer*. [en línea]. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Disponible a Internet: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/24692189/>>

DOCTOR VICENTE LAHERA (2014). *¿Qué es la nutrigenética y la nutrigenómica?* [en línea]. Disponible a Internet: <http://www.teinteresa.es/Microsites/Pregunta_al_medico/Alimentacion/vicentelahera/nutrigenetica-nutrigenomica_0_1100290090.html>

Rawson, N. (2008). *Nutrigenomics Boot Camp: Improving Human Performance through Nutrigenomic Discovery*. A Supply Side West VendorWorks Presentation.

Müller M, Kersten S. (2003). *Nutrigenomics: Goals and Perspectives*. Nature Reviews Genetics 4. 315 -322.

Astley, Sian B. (2007). *An introduction to nutrigenomics developments and trends*. Genes Nutr. 2 (1): 11–13.

MARIOLA AGUJETAS (2014). *Nutrigenómica: prevenir mediante una dieta personalizada*. [en línea]. Disponible a Internet:

<<http://www.efesalud.com/noticias/nutrigenomica-prevenir-mediante-una-dieta-personalizada/>>

INSTITUTO NUTRIGENÓMICA (2015). *Nutrigenómica y Nutrigenética. Diferencias y significado de ambos términos*. [en línea]. Disponible a Internet:

<<https://institutonutrigenomica.com/noticias-nutrigenomica/nutrigenomica-nutrigenetica-diferencias-y-significado-de-ambos-terminos/>>

FRANCISCA SERRA (2016). *Alimentació i nutrició personalitzada*. [en línea]. Disponible a Internet:

<http://uom.uib.cat/digitalAssets/231/231872_serra1.pdf>

NATURE (2016). [en línea]. Disponible a Internet:

<<http://www.nature.com/>>

HÉCTOR HERRANZ, XIN HONG, LIDIA PÉREZ, ANA FERREIRA, DANIEL OLIVEIRI, STEPHEN M COHEN i MARCO MILÁN (2010). *The miRNA machinery targets Mei-P26 and regulates Myc proteína levels in the Drosophila wing*. [en línea]. Disponible a Internet:

<<http://www.ca.globaltalentnews.com/sistema/aldia/3388/Noves-dades-sobre-el-control-duna-proteina-alterada-en-tots-els-tipus-de-cancer.html>>

FLYBASE (2016). *Gene Dme\\mei-P26*. [en línea]. Disponible a Internet:

<<http://flybase.org/reports/FBgn0026206.html>>

INTERACTIVEFLY (2015). *meiotic P26*. [en línea]. Disponible a Internet:

<<http://www.sdbonline.org/sites/fly/genebrief/mei-p26tumorsuppressor.htm>>