

ELS TRANSGÈNICS

LA NOVA NORMALITAT

UN ESTUDI SOBRE LES TÈCNIQUES, L'ACTUALITAT ECONÒMICA,
L'APROVACIÓ SOCIAL I UNA ANÀLISI COMPUTACIONAL



El treball de recerca ha estat elaborat per "Yeast"

Resum o abstract

La transgènesi és un tema d'actualitat que consta de moltes vessants i que sol protagonitzar situacions polèmiques. Concretament, s'investiguen tres d'elles: la científica, l'econòmica i la social. Des del punt de vista científic, es realitza una anàlisi exhaustiva sobre les tècniques d'enginyeria genètica que poden ser aplicades segons el tipus d'organisme que es tracta. Per a entrar en contacte amb l'aplicació física de la transgènesi, es descriu la situació econòmica que en deriva juntament amb les diverses conseqüències de la comercialització dels transgènics. Amb l'objectiu de comprendre la visió social, s'examina l'opinió pública i la percepció occidental, la qual es complementa amb la difusió d'una enquesta que engloba diversos aspectes. Simultàniament, s'avaluen experimentalment els passos previs a la creació d'un organisme transgènic mitjançant l'exploració de la incapacitat de fermentar maltosa d'una de les següents espècies de llevat *Saccharomyces cerevisiae*: RMI I-IA i BY474I.

*La transgénesis es un tema de actualidad que consta de muchas vertientes y que suele protagonizar situaciones polémicas. Concretamente, se investigan tres de ellas: la científica, la económica y la social. Desde el punto de vista científico, se realiza un exhaustivo análisis sobre las técnicas de ingeniería genética que pueden ser aplicadas según el tipo de organismo que se trata. Para entrar en contacto con la aplicación física de la transgénesis, se describe la situación económica que deriva junto con las diversas consecuencias de la comercialización de los transgénicos. Con el objetivo de comprender la visión social, se examina la opinión pública y la percepción occidental, que se complementa con la difusión de una encuesta que engloba varios aspectos. Simultáneamente, se evalúan experimentalmente los pasos previos a la creación de un organismo transgénico mediante la exploración de la incapacidad de fermentar maltosa de una de las siguientes especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: RMI I-IA y BY474I.*

*Transgenesis is a topical issue that has many facets and is often responsible for controversial situations. Specifically, three of them are investigated: the scientific, the economic and the social one. From a scientific point of view, a thorough analysis is performed on the genetic engineering techniques that can be applied depending on the type of organism being treated. To get in touch with the physical application of transgenesis, the economic situation that derives from it is described with the consequences of the commercialization of transgenics. In order to understand the social vision, public opinion and Western perception are examined, which is complemented by the dissemination of a questionnaire that encompasses several aspects. Simultaneously, the previous steps to the creation of a transgenic organism are evaluated experimentally by exploring the inability to ferment maltose from one of the following species of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: RMI I-IA and BY474I.*

Índex

I. PROJECTE DE RECERCA	pàg. 7-17
I.1. OBJECTE D'ESTUDI	pàg. 8-9
I.2. PREGUNTES METODOLÒGIQUES	pàg. 10-11
I.3. HIPÒTESIS DE TREBALL	pàg. 12-15
I.4. METODOLOGIA DE CONTRASTACIÓ	pàg. 16-17
2. MARC TEÒRIC	pàg. 18-92
2.1. TÈCNIQUES DE TRANSGÈNESI	pàg. 19-77
2.1.1. ANIMALS	pàg. 19-52
2.1.1.1. Introducció	pàg. 19-26
2.1.1.2. Transgènesi als gàmetes	pàg. 27-32
2.1.1.2.1. A l'esperma i els seus precursors	pàg. 27-31
2.1.1.2.1.1. Directament a l'esperma	pàg. 27-30
2.1.1.2.1.1.1. Mitjançant SMGT	pàg. 27-28
2.1.1.2.1.1.2. Mitjançant ICSI	pàg. 29-30
2.1.1.2.1.2. In vitro mitjançant cèl·lules de precursors de l'esperma	pàg. 31
2.1.1.2.1.3. In vivo mitjançant cèl·lules de precursors de l'esperma	pàg. 31
2.1.1.2.2. Als oòcits	pàg. 32

2.1.1.3. Transgènesi als embrions	pàg. 33-36
2.1.1.3.1. Mitjançant microinjecció pronuclear	pàg. 33-36
2.1.1.4. Transgènesi mitjançant cèl·lules	pàg. 37-41
2.1.1.4.1. Mitjançant cèl·lules pluripotents	pàg. 37-39
2.1.1.4.2. Mitjançant la transformació de cèl·lules somàtiques en cultiu i transferència nuclear (clonació) ...	pàg. 39-41
2.1.1.5. Transgènesi mitjançant vectors virals	pàg. 42-48
2.1.1.5.1. Mitjançant vectors adenovirals	pàg. 43-44
2.1.1.5.2. Mitjançant vectors retrovirals	pàg. 45
2.1.1.5.3. Mitjançant vectors de virus adenoassociats pàg. 46-47
2.1.1.5.4. Mitjançant vectors lentivirals	pàg. 47-48
2.1.1.6. Transgènesi mitjançant vectors d'addició gènica ..	pàg. 49-50
2.1.1.6.1. Mitjançant vectors transposons	pàg. 49
2.1.1.6.2. Mitjançant vectors episomals	pàg. 50
2.1.1.7. Transgènesi mitjançant vectors de substitució	pàg. 51-52
2.1.1.7.1. Gens <i>knock-out</i>	pàg. 52
2.1.1.7.2. Gens <i>knock-in</i>	pàg. 52
2.1.2. PLANTES	pàg. 53-77
2.1.2.1. Mètodes indirectes	pàg. 56-64
2.1.2.1.1. Sistema <i>Agrobacterium</i>	pàg. 56-62

2.1.2.1.2.	Vectors virals	pàg. 63-64
2.1.2.2.	Mètodes directes	pàg. 65-77
2.1.2.2.1.	Liposomes	pàg. 65-66
2.1.2.2.2.	Biobalística	pàg. 67-69
2.1.2.2.3.	Electroporació	pàg. 70-71
2.1.2.2.4.	Sonicació	pàg. 72-73
2.1.2.2.5.	Transfèrència intervinguda per compostos químics	pàg. 74
2.1.2.2.6.	Fibres de carbur de silicona	pàg. 75
2.1.2.2.7.	Microinjecció	pàg. 76-77
2.1.2.2.8.	Microlàser	pàg. 77
2.2.	IMPACTE ECONÒMIC	pàg. 78-85
2.3.	VISIÓ SOCIAL	pàg. 86-92
3.	PART PRÀCTICA	pàg. 93-150
3.1.	INVESTIGACIÓ AMB AARON NEW	pàg. 94-128
3.1.1.	Gens perifèrics, gens centrals i mutacions	pàg. 94
3.1.2.	Pèrdua d'heterozigositat i subtelòmers	pàg. 94-101
3.1.3.	Tret quantitatiu i creixement del llevat	pàg. 101-108
3.1.4.	Part experimental	pàg. 109-125
3.1.4.1.	Eines i recursos	pàg. 109
3.1.4.2.	Procediment	pàg. 109-117

3.1.4.3. Resultats i discussió	pàg. 118-125
3.1.5. Funcionament molecular dels gens MAL	pàg. 125-128
3.2. ENQUESTA	pàg. 129-150
3.2.1. Presentació de l'enquesta	pàg. 129
3.2.2. Resultats	pàg. 129-144
3.2.3. Anàlisi dels resultats i discussió	pàg. 145-150
4. CONCLUSIONS	pàg. 151-154
5. AGRAÏMENTS	pàg. 155-156
6. BIBLIOGRAFIA	pàg. 157-164

I. PROJECTE DE RECERCA

I.1. Objecte d'estudi



Propòsits del treball de recerca

El treball de recerca que s'efectua centra els seus propòsits en diferents objectes d'estudi: les tècniques de transgènesi aplicades a éssers vius, innovacions que en podran derivar, l'ètica metodològica, la visió social i la relació amb l'economia.

En primer lloc, es vol observar i plasmar en la recerca la manera en què la **metodologia** i els **avenços científics** han progressat. Alhora, es pretén realitzar una comparació de caire cronològic, que projecti com han millorat les tècniques amb el pas del temps. Mitjançant la lectura d'articles i de llibres, l'assistència a laboratoris i les entrevistes a professionals que s'efectuaran durant els propers mesos es podrà, probablement, satisfer el primer dels anhels. És sovint recurrent que en els estudis científics en què es basa el treball s'expliquin les metodologies més arcaïques per a contrastar-les amb les més recents i així ressaltar els seus beneficis. Entre d'altres, la recerca es centrarà en aspectes relacionats amb la medicina, com ara la utilització de vectors virals per la cura de certes malalties com la Síndrome d'Immunodeficiència Combinada Severa (SCID o *severe combined immunodeficiency*).

En segon lloc, s'aspira a aconseguir visualitzar **possibles innovacions futures**, establir hipòtesis de treball i qüestions que siguin resoltes quan es finalitzi el projecte. La intenció és poder desenvolupar una mirada més curiosa i oberta al món de la ciència, que mostri el ventall de possibilitats en què centrar-se i establir projeccions que, posteriorment, podran ser acceptades o desmentides. És a dir, després de realitzar la recerca pertinent, es veurà la viabilitat dels plantejaments inicials.

En tercer lloc, s'expecta fer una anàlisi exhaustiva i des de l'objectivitat de l'**acceptació social** i l'**ètica** respecte els processos i les finalitats amb què es posen en pràctica els coneixements actuals sobre la

transgènesi. Malgrat la intenció de seleccionar la informació proporcionada des de la neutralitat, és necessari detenir-se més en algunes postures que han sigut més problemàtiques i han despertat més interès dins del col·lectiu de professionals en l'àmbit.

En quart lloc, i íntimament relacionat amb l'aspecte anterior, es vol tractar la **visió social**, la desinformació i els problemes que, des dels inicis de la transgènesi, han conduït a un rebuig desinteressat per part de la societat. L'ésser humà es caracteritza, per naturalesa, per la seva curiositat insaciable, però alhora per la por respecte el desconegut. Els qui neguen la remota conseqüència positiva per part de la ciència ho fan per desconfiança, per la sensació que el món hermètic i privat els transmet. Si, en canvi, es tractés amb més normalitat i les eines propagandístiques no s'aprofitessin de l'atracció del públic amb titulars confusos sinó que prioritzessin la cultura i el coneixement fiable, es podrien entreveure els grans beneficis que s'estudiaran en el projecte.

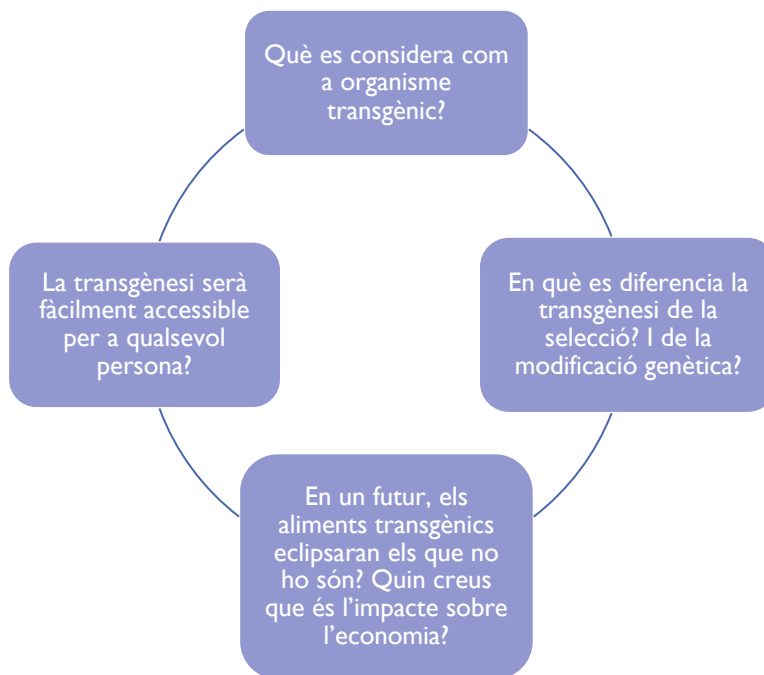
En cinquè lloc, és extremadament rellevant considerar qualsevol impacte que els transgènics puguin tenir sobre l'**economia** i l'estabilitat d'un país. Una de les conseqüències positives més conegudes de la transgènesi és la disposició de productes a un cost més assequible. De la mateixa manera que els productes electrònics s'abarateixen a mida que passen de ser un luxe a ser una necessitat, és possible que l'ús extensiu de transgènics proporcioni un accés més facilitat a les necessitats, que seran molt més abundants i, conseqüentment, menys restringides. Cal considerar que, presumiblement, s'alteraria radicalment el balanç social que coneixem avui en dia. Si la tendència econòmica deixa de trobar-se en equilibri i les posicions centrals augmenten, deixarà d'existir l'opulència i la sumptuositat alhora que la pobresa i la misèria per a donar pas a un nou estament caracteritzat per l'equitat. A més, el fàcil accés a la medicina tindria impactes beneficiosos en poblacions tercermundistes, principalment, en què actualment hi ha un limitat abast de vacunes, medicaments i personal sanitari. Si es trobessin alternatives més resistents i adequades per les condicions menys favorables, la desigualtat sobre la salut s'alleugeriria, entre moltes altres aplicacions i impactes de la transgènesi sobre la societat i la seva economia.

Els objectius redactats anteriorment representen els propòsits inicials del treball de recerca.

1.2. Preguntes metodològiques

Per a endinsar-se en la temàtica del treball, és pertinent plantejar-se qüestions inicials i prèvies a la recerca d'informació més concisa. Realitzant preguntes superficials sobre el tema, es pot adquirir un coneixement bàsic que permetrà comprendre el sentit global de l'àmbit.

Seguidament, es mostren les interrogacions al·ludides amb anterioritat.



Esquema de les preguntes metodològiques

1. Què es considera com a organisme transgènic?

Sovint es sent a parlar d'organismes transgènics, però molts cops es fa des del desconeixement. Per tant, és necessari establir-ne el significat.

Hi trobem controvèrsia per saber com distingir un aliment transgènic perquè, què comporta que ho sigui? Quin factor és el que ho determina?

Per exemple, la confusió es podria relacionar amb la seva identificació en els supermercats, en els quals es mostra públicament quins aliments ho són amb una etiqueta. Malgrat això, se'n desconeix l'origen del rebuig cap a la transgènesi.

2. En què es diferencia la transgènesi de la selecció? I de la modificació genètica?

De nou, conèixer-ne la dissimilitud entre ambdós conceptes resulta fonamental per la comprensió òptima dels diversos termes que engloba l'assumpte que es tracta al llarg del treball.

3. En un futur, els aliments transgènics eclipsaran els que no ho són? Quin creus que és l'impacte sobre l'economia?

No només és insigne discernir les definicions dels mots, sinó que també és rellevant determinar les possibles conseqüències que podrien derivar-ne de l'ús en un futur. Els impactes socioeconòmics són dels més significatius a tenir en compte deguda la seva implicació en el dia a dia.

4. La transgènesi serà fàcilment accessible per a qualsevol persona?

Després d'efectuar l'estudi necessari sobre les implicacions en l'economia, se'n podrà predir amb exactitud l'accessibilitat del producte. Alhora, però, calen ser considerats els diversos canvis socials com ara grups reivindicatius emergents.

1.3. Hipòtesis de treball

- 1. Un organisme transgènic és el que ha estat sotmès a manipulacions per part de l'humà mitjançant eines genètiques pròpies dels laboratoris.**

A l'organisme se li incorpora un fragment de DNA aliè al seu genoma que serà transmès a les següents generacions de forma hereditària.

- 2. La transgènesi i la selecció es diferencien per l'origen de la qualitat fenotípica desitjada. Per tant, la transgènesi és un tipus de modificació genètica.**

La selecció és el resultat de l'adaptació d'un organisme al medi i les condicions ambientals que comporta. Se'n poden diferenciar dos tipus, la natural i l'artificial.

Mentre en la natural la transcendència d'una espècie ve regida per la naturalesa, l'artificial és determinada per l'acció de l'home. Per tant, l'aparició de nous factors genètics i fenotípics és conseqüència de mutacions que el progenitor presenta a l'atzar i la seva preservació, en el cas de la selecció artificial, depèn dels encreuaments realitzats per l'ésser humà.

En canvi, la transgènesi abasteix un ventall de possibilitats més ampli pel fet que pot introduir modificacions d'altres éssers que no pertanyen a l'organisme de manera natural. Per això, cal no confondre-la amb la modificació genètica ja que, tot i que n'és un tipus, no tots els organismes modificats genèticament són necessàriament transgènics. Per exemple, la supressió de gens d'un organisme no es considera pròpia de la metodologia transgènica.

- 3. Els aliments transgènics sobrepassaran als tradicionals a mida que els seus beneficis s'evidencïin. A causa de l'extensió de la transgènesi, l'economia té tendència a centrar la mediana social al centre, a una condició estàndard.**

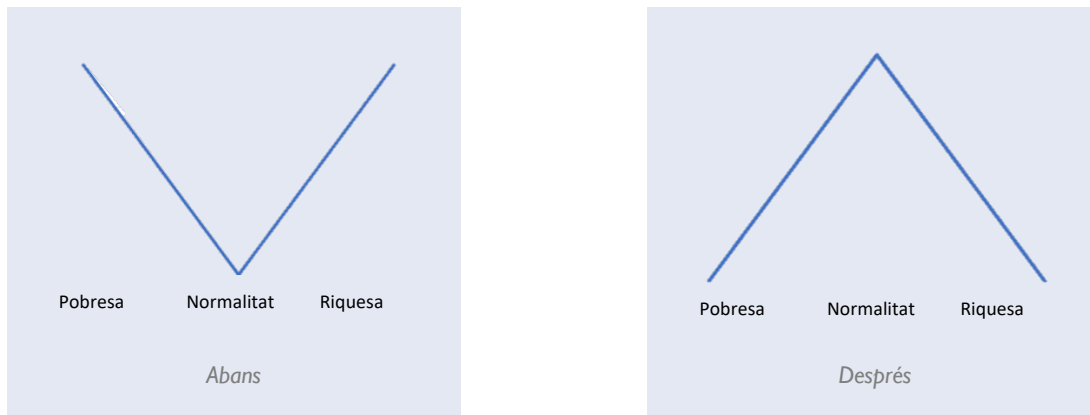
L'èxit dels aliments modificats genèticament dependrà de diversos factors.

En primer lloc, la visió social sobre els organismes esmentats serà clau per aconseguir que puguin arribar a ser més consumits que els aliments no modificats genèticament. Per tant, serà necessari que els consumidors deixin de tenir una imatge negativa sobre ells, sovint lligada al concepte de perillositat. Alhora, la visió que algunes persones tenen sobre els OMG és contradictòria, ja que opinen que es tracten d'aliments artificials, quan tot el que ingereixen mai ha sigut completament natural.

En segon lloc, perquè els aliments transgènics tinguin èxit caldria que els processos que, per exemple, la Unió Europea duu a terme per a garantir la seguretat del consum d'OMG esdevinguessin més ràpids i tinguessin més facilitats legislatives, que haurien de ser controlades des de l'àmbit polític.

Malgrat els canvis que caldria fer, cal esmentar altres aspectes que podrien ser causes del succés dels OMG de forma immediata. El fet que es tractin d'aliments modificats genèticament fa que puguin adaptar-se a qualsevol tipus de clima i d'ambient a partir de la introducció de gens al seu genoma que els atorguin determinades propietats. Així, els OMG oferirien la possibilitat de diversificar els aliments disponibles en diversos llocs del món, fet que podria donar peu a la seva reeixida. A més, les transferències genètiques podrien fer que els agricultors estalviessin diners en la compra de productes com per exemple els pesticides, ja que els cultius haurien estat modificats genèticament, esdevenint organismes resistents a les plagues, a insectes o a virus, entre d'altres. Això alhora faria que hi hagués menys pèrdues en la producció i una major qualitat del producte. A més, el menor ús de pesticides faria que menys mà d'obra fos necessària i reduiria l'impacte de productes agroquímics al medi ambient, ja que els herbicides associats als cultius transgènics són més fàcilment degradables. D'altra banda, els cultius transgènics suposarien menys costos en l'ús de màquines i en el control mecànic de males herbes. Per tant, els cultius transgènics tindrien un rendiment més elevat i serien més rentables que els convencionals. Per últim, lògicament, es produiria una major inversió en investigació i desenvolupament científic i en corporacions de l'àmbit biotecnològic. A més, si es pogués aconseguir un accés més inclusiu als aliments saludables, es solucionaria un dels actuals problemes de l'economia i l'alimentació: l'excessiva ingesta de productes processats deguda la seva accessibilitat a causa del seu baix cost. Si s'aconseguís, es podria garantir una notable millora en la qualitat dels productes.

Tots els avantatges econòmics i mediambientals també contribuirien a l'èxit dels OMG.



Representació esquemàtica de la inversió econòmica i l'abastiment de productes

4. Com ha succeït amb altres productes, la transgènesi passarà de ser un concepte aliè a ser una necessitat.

Des de fa pocs anys, biohackers com el Josiah Zayner, treballen amb l'objectiu d'apropar l'experimentació científica a la societat, sobretot en l'àmbit de la genètica. De fet, ell, a través de la seva empresa *The Odin*, ven el que ell defineix com a kits educatius, és a dir, caixes amb el material necessari per portar a la pràctica diferents experiments en l'àmbit de l'enginyeria genètica, com per exemple l'edició de cèl·lules humanes o la creació de Repeticions Palindròmiques Curtes Agrupades i Regularment Espaiades (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o CRISPR). El CRISPR són seqüències repetitives presents en el DNA bacterià que contenen material genètic dels virus que han atacat el bacteri al qual pertanyen, permetent que el bacteri pugui reconèixer nous virus similars i destrueixi el seu material genètic. Es podria dir que el CRISPR són unes tisores genètiques que sovint es fan servir en desenvolupaments terapèutics per tractar diferents tipus de càncer, malalties de la sang i altres patologies que es presenten durant el període de gestació i que poden ser hereditàries o no, com la ceguera congènita. El CRISPR també permet atacar tumors a partir de l'edició de cèl·lules immunitàries, que ajuda al cos a combatre infeccions i altres malalties, detectar virus en mostres clíniques, modificar mosquits transmissors de malalties per tal que deixin de ser-ho i, de forma polèmica, manipular embrions humans. En l'àmbit de l'agricultura, es fa servir per a eliminar plagues, augmentar l'eficiència dels nutrients i fer les plantes més resistents a la sequera, per exemple.

Finalment, el CRISPR també serveix per generar models cel·lulars o animals de malalties humanes als laboratoris i crear animals lliures de virus perquè puguin ser donants d'òrgans en transplantaments humans.

Els kits del Josiah Zayner encara no permeten modificar-se genèticament a un mateix, però es poden comprar de forma molt fàcil en línia i, per tant, representen el primer pas perquè, en un futur, la modificació genètica acabi sent totalment accessible per a qualsevol persona.

Com ha passat amb altres productes també, l'ús normalitzat causa que, amb el pas del temps, sigui més assequible la seva disposició. Per això, els aparells electrònics com els mòbils i els ordinadors o els electrodomèstics de la llar com els rentavaixelles i les aspiradores sense fil, entre d'altres, han mostrat una clara i progressiva tendència de descendent. Com més alta és la seva sol·licitud i disposició, el producte perd qualitat i riquesa, ja que passa a ser un abastiment rutinari. De la mateixa manera, s'expecta poder gaudir de procediments ambientats a la cura de malalties i d'aliments amb propietats més beneficioses de manera més inclusiva en un futur.

El que realment marcarà el futur accés universal a la modificació genètica seran els límits ètics que decidim establir que, segons Josiah Zayner, els seus kits inclouen, ja que permeten que la gent gaudeixi de les tècniques i eviten que cometin errors.

I.4. Metodologia de contrastació

Amb l'objectiu de verificar les hipòtesis, es duran a terme un seguit d'experiències pràctiques que serviran per recollir informació i dades útils per fer el treball.

En primer lloc, es preveia la realització d'una pràctica amb l'Aaron New al *Centre for Genomic Regulation* al llarg de dues setmanes del mes de juliol. L'objectiu de l'experiment en qüestió era elaborar una anàlisi sobre la capacitat de fermentació de la maltosa del llevat en funció de la mutació a què hagi estat sotmès. Per saber-ne més, s'enllaça el document que ha realitzat. No obstant això, la situació de pandèmia i les mesures del centre han canviat la metodologia de la pràctica, la qual ha estat finalment elaborada de manera telemàtica i amb un parell de reunions presencials amb l'Aaron New. La part pràctica, per tant, és computacional, però els conceptes teòrics es mantenen perquè s'estudia la capacitat de fermentació de maltosa en l'àmbit de la genètica i les mutacions mitjançant diversos programes proporcionats per l'investigador. Els procediments s'expliciten en l'apartat 3.1. del treball de recerca.

En segon lloc, per aprofundir més en el coneixement científic sobre el tema principal del treball, es preveia la realització d'una entrevista a l'Alba Hernández Bonilla, secretària del departament de Genètica i Microbiologia pertanyent a la Facultat de Biociències de Bellaterra, qui hauria pogut proporcionar accés als laboratoris, on s'hauria dut a terme una altra part pràctica que hauria calgut concretar. El seu contacte ha sigut proporcionat per la Rosa Bartolomé Comas, metgessa adjunta del servei de Microbiologia i Parasitologia pertanyent a l'Hospital Vall d'Hebron, a qui també es preveia realitzar una entrevista, presumiblement, al setembre. En canvi, per causes personals, cap de les activitats amb els contactes esmentats ha sigut possible finalment. Per això, s'han reforçat els àmbits que s'anaven a tractar amb les pràctiques amb l'Aaron New i una enquesta, la qual s'explica en els apartats següents.

En tercer lloc, centrant-se més en la part social, cultural i econòmica, la tutora del treball, doctorada en educació biomèdica, professora i dissenyadora de materials educatius, ens podria fer arribar el contacte d'una experta en el camp, a qui s'hauria pogut realitzar una entrevista, la qual no ha estat factible finalment.

Finalment, també en la línia social, cultural i econòmica, s'expecta elaborar una enquesta de caire informatiu, educatiu, qualitatiu i quantitatiu per a donar suport a les hipòtesis i per a tenir un recull d'una representació que estimaria el pensament de la societat en general. Cal respectar, per tant, l'anonimat dels participants i garantir que es té el consentiment per a utilitzar les dades obtingudes en el treball. L'enquesta, per tant, té un gran pes per a corroborar els aspectes que es tracten sobre la visió social en l'apartat 2.3. i es troba la seva anàlisi a l'apartat 3.2., tot i que l'enquesta s'ha adjuntat a l'annex de documents del treball de recerca.

Amb això, es poden complementar tots els àmbits que abastirà la teoria del treball de forma pràctica.

2. MARC TEÒRIC

2.1. Tècniques de transgènesi

2.1.1. Animals

2.1.1.1. Introducció

L'element clau en qualsevol tipus de procés de transgènesi és el transgen, el gen que es desitja introduir en un organisme que és l'objecte d'estudi (Felmer, 2004). No obstant això, s'ha de tenir en compte que la construcció i l'expressió d'un transgen no només involucren el gen d'interès, els elements de codificació i estructurals per a la proteïna d'interès, sinó que també el fet que el DNA transgènic inclogui elements de control, com per exemple promotors (Gibbons et al., 2014). Les regions promotores o les regions reguladores de la regió promotora dirigeixen la localització de l'expressió dels gens d'interès cap a un teixit específic i determinen el moment d'expressió del transgen (Albareda, 1982; Felmer, 2004; Gibbons et al., 2014).

A més, els promotors, seqüències de DNA que reconeixen els factors de transcripció i les RNA polimerases II que participen en el procés de transcripció, són un dels mecanismes emprats per facilitar la integració òptima del transgen, així com dels vectors virals, un concepte que s'explicarà més endavant. Concretament, els promotors faciliten el transport del DNA transgènic al nucli, ja que uneixen factors de transcripció que afavoreixen que els mecanismes de la cèl·lula reconeguin el transgen com una molècula nuclear, facilitant la seva entrada al nucli. Els promotors que es fan servir en la transgènesi es classifiquen en promotors constitutius i regulables, o bé en promotors de teixit inespecífic o de teixit específic.

Els promotors constitutius o de teixit inespecífic produeixen elevats i constants nivells d'expressió dels transgens en diferents tipus de cèl·lules eucariotes, les quals, mitjançant mecanismes de defensa, poden inactivar els promotors a causa del seu origen viral. (Legorreta-herrera et al., 2012) Dos exemples dels promotors més utilitzats són el del citomegalovirus (CMV), un tipus de virus de l'herpes, i el del virus simio 40 (SV-40), el DNA viral del qual es va microinjectar en el blastocel d'un blastocist, és a dir, en la regió central plena de fluid d'un embrió en una etapa primerenca del seu desenvolupament, per generar els primers ratolins transgènics (Legorreta-herrera et al., 2012; Palmiter & Brinster, 1985).

Els promotors específics d'un teixit produeixen baixos o moderats nivells d'expressió del transgen, en comparació als anteriors ja que només responen a factors de transcripció que s'expressen en teixit blanc,

és a dir, en teixit adipós, el greix corporal. Els promotors regulables regulen l'expressió del transgen en funció de la concentració d'alguna molècula biològica, com les hormones, per exemple. (Legorreta-herrera et al., 2012)

Cal destacar que la construcció completa pot ser utilitzada per estudiar l'efecte del transgen en cèl·lules o organismes sencers. Es pot aconseguir a través de la introducció, en la regió de codificació de la construcció del transgen, d'un gen reporter que codifica per una proteïna fàcilment visible o quantificable a causa de la seva activitat enzimàtica. (Houdebine, 2003) Per tant, els gens reporters es fan servir per identificar la transgènesi fent un seguiment de l'expressió de la proteïna ja esmentada, l'activitat de la qual ha de ser fàcilment diferenciable de l'activitat endògena de la cèl·lula. El gen reporter que s'esculli no pot ser tòxic per a la cèl·lula, ha de ser d'una detecció no invasiva, no ha de destruir teixits i se n'ha de poder fer un seguiment sense impedir que la cèl·lula sigui utilitzada amb altres objectius de forma posterior. D'altra banda, tots els gens reporters es poden fer servir com a vectors virals, un concepte que s'explicarà més endavant. (Legorreta-herrera et al., 2012)

El transgen pot provenir d'un altre animal de la mateixa espècie, d'un bacteri o bé d'una planta i, normalment, està format per diverses seqüències amb diferents orígens, com per exemple en el cas que es tracta, en què es disposa, d'una banda, del gen que codifica la proteïna d'interès i, de l'altra, del promotor que dirigeix l'expressió a un teixit determinat (Felmer, 2004; Gibbons et al., 2014). En general, els elements que formen l'estructura final del transgen són escollits segons l'objectiu de l'experiment i, particularment, segons el tipus de cèl·lula en la qual es té previst que s'expressi el transgen (Houdebine, 2003).

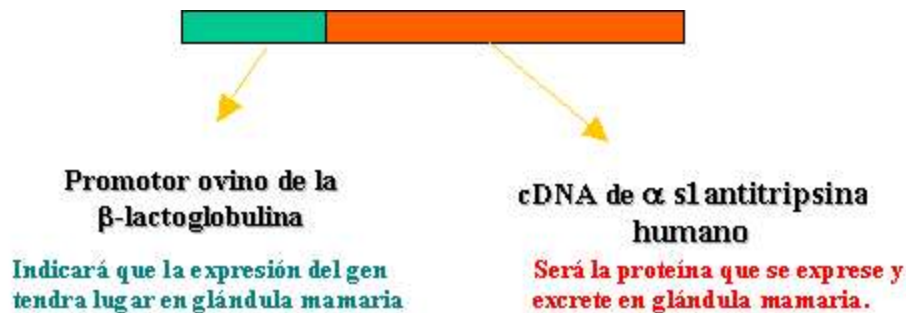
Com es veurà a continuació, la construcció experimental d'un transgen suposa la realització de diversos passos, començant amb l'aïllament d'una molècula complexa de DNA i passant per l'ús d'enzims de restricció, que divideixen el DNA en localitzacions específiques, d'oligonucleòtids, els quals són sintetitzats químicament, del mètode de la PCR, que es fa servir per amplificar, és a dir, incrementar el nombre de còpies de fragments de DNA in vitro, i d'una ligasa per associar de manera covalent els fragments de DNA (Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003). A més, sovint i com també s'especificarà més endavant, els fragments de DNA esmentats s'afegeixen a plasmidis, que són transferits a bacteris de tal manera que els clons bacterians resultants són seleccionats i amplificats (Houdebine, 2003).

Actualment, la creació d'un transgen ha esdevingut molt més fàcil, ja que existeixen empreses que sintetitzen molècules de DNA d'una seqüència donada (Gibbons et al., 2014).

Abans d'aprofundir en el procés de construcció d'un transgen, cal establir un últim concepte, el DNA complementari (cDNA). Es tracta d'un tipus de DNA artificial produït al laboratori a partir de gens de cèl·lules eucariotes. El cDNA està format per seqüències que corresponen únicament als exons, ja que

se'ls ha eliminat els introns. Els introns són regions del DNA que no codifiquen, mentre que els exons són les regions que s'expressen i permeten produir proteïnes.

De forma resumida, el cDNA és important en la transgènesi, ja que permet que els organismes procariòtics (bacteris i cianobacteris) puguin expressar de forma funcional gens provinents d'organismes eucariòtics (animals, plantes, algues, llevats i fongs), que inicialment era impossible a causa de la manca de mecanismes d'eliminació d'introns en el DNA dels organismes procariòtics. Per tant, el cDNA permet que es pugui produir un intercanvi de material genètic entre organismes procariòtics i eucariòtics. (Vigara Fernández, Javier; Vega Piqueres, 2016)



Representació del funcionament del cDNA

Amb l'objectiu de generar un Organisme Modificat Genèticament (OMG), primerament, és necessari identificar el gen d'interès i la seqüència reguladora a través del Projecte Genoma o bé fent una anàlisi genètica d'una característica determinada. El Projecte Genoma Humà va ser un projecte internacional d'investigació científica dut a terme per determinar els parells de bases químiques que constitueixen el DNA humà i per identificar físicament i funcionalment la mitjana de gens que el formen.

Per tal d'identificar el gen d'interès és clau realitzar diverses proves bioquímiques, així com anàlisis sobre la funcionalitat de diversos enzims per determinar els més adequats i seqüenciar els seus gens. Com a resultat, s'obté el gen o els gens que expressen la informació necessària per sintetitzar els enzims que produeixen el fenotip de la característica que s'estudia. Cal remarcar que sovint s'aconsegueix mitjançant l'estudi de la ruta metabòlica del fenotip en qüestió, és a dir, l'estudi del conjunt de reaccions químiques consecutives que són provocades per enzims programats per la cèl·lula.

D'altra banda, per identificar la seqüència reguladora adequada és necessari estudiar les zones reguladores de diversos gens de l'organisme, els quals s'expressen naturalment i únicament en la zona d'estudi.

Un cop identificada la seqüència reguladora i el gen d'interès, és necessari separar ambdues estructures genètiques dels seus genomes respectius mitjançant unes proteïnes anomenades enzims de restricció o

endonucleases de restricció per poder-les unir entre si. (Bueno i Torrens, 2011) Els enzims de restricció reconeixen seqüències de DNA curtes normalment de 6 a 8 nucleòtids de forma molt específica i les hidrolitzen, és a dir les tallen i divideixen trencant els seus enllaços, de tal manera que deixen extrems cohesius als fragments de DNA produïts. Concretament, ho fan de manera inclinada, de tal manera que els extrems esdevenen protuberants, és a dir que sobresurten en les cadenes de DNA que formen la doble hèlix, anomenades palindròmiques.

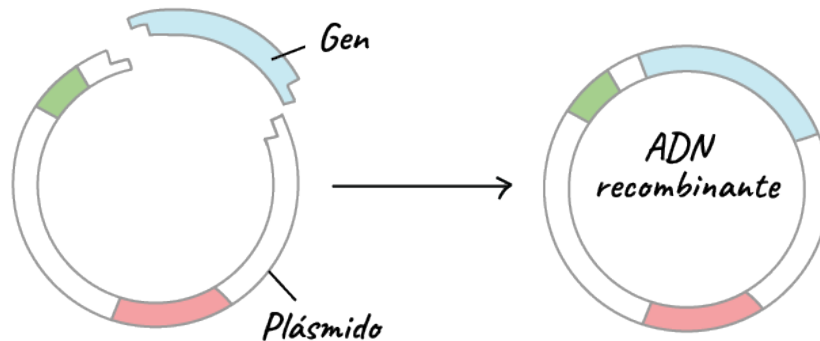
Els extrems protuberants simètrics generats pels talls del DNA produïts pels enzims de restricció es poden unir molt fàcilment en cas que s'estigui experimentant *in vitro*, ja que si s'inactiven els enzims de restricció per xoc tèrmic per exemple, té lloc la reassociació dels fragments de DNA, els extrems dels quals s'atrauen entre si. Tallant la seqüència reguladora i el gen d'interès *in vitro*, dos DNA de diferent origen, a través del mateix enzim de restricció, s'aconsegueix que quan entrin en contacte només tendeixin a unir-se, ja que el procés deixa fragments de DNA amb extrems cohesius i complementaris. Per realitzar la unió esmentada i lligar els extrems es fa servir un enzim anomenat DNA ligasa, donant peu a la formació del DNA recombinant, un element clau en la clonació molecular.

A més, els enzims de restricció són un tipus de defensa molecular dels bacteris davant les invasions virals que els poden afectar. Quan un bacteri es veu afectat per un virus, els enzims de restricció que conté reconeixen el DNA víric i el tallen evitant que es reproduïxi. Els diferents tipus d'enzims de restricció es diferencien pel tipus de DNA que reconeixen i la forma en la qual el fragmenten. Actualment existeixen comercialitzats 600 enzims de restricció diferents. (Bueno i Torrens, 2011; Vigarà Fernández, Javier; Vega Piqueres, 2016)

A continuació, és necessària l'obtenció d'un número considerable de còpies de DNA recombinant per tal de poder-lo analitzar i utilitzar. Per poder-ho aconseguir, és necessari inserir el DNA recombinant en un vector bacterià per poder donar peu a la seva clonació. Els diferents vectors que poden ser utilitzats es dissenyen per transportar i allotjar construccions gèniques de diferents magnituds. (Bueno i Torrens, 2011; Houdebine, 2003) Alguns exemples són els plasmidis, els cosmidis, els bacteriòfags ϕ I, els cromosomes bacterians artificials (bacterial artificial chromosomes - BACs) o els cromosomes artificials dels llevats (yeast artificial chromosomes - YACs), els quals poden allotjar fins a 20 kb, 40 kb, 90 kb, 200 kb i 1000 kb de DNA, respectivament. Cal destacar que el terme "kb" fa referència a la mesura de longitud biològica de la kilobase, una unitat la qual equival a 1000 parells de bases de DNA o RNA. (Houdebine, 2003)

Molt sovint es fa referència als plasmidis, molècules de DNA circular que es repliquen de manera autònoma, o bé a virus com els bacteriòfags, un tipus de bacteris que infecten exclusivament organismes procariotes, quan es parla de vectors en la transgènesi. Tant els plasmidis com els bacteriòfags tenen un

origen natural, però els que es fan servir en enginyeria genètica han estat modificats al laboratori per poder acollir grans construccions gèniques i per fer-les funcionar.



Representació de l'obtenció d'un plàsmid amb DNA recombinant

Un cop introduït el DNA recombinant en una de les dues estructures esmentades, s'introdueix tot el complex en un microorganisme (bacteris o llevats) i de forma natural el seu mecanisme biològic s'encarrega de fer el nombre de còpies necessari, clonant el transgen. (Bueno i Torrens, 2011; Jouve, 2000) Normalment, es fa servir *Escherichia coli*, un bacteri intestinal, com a hoste del procés de clonació. Finalment, s'extrauen els plàsmids dels bacteris o es recuperen els bacteriòfags, els quals trenquen directament el bacteri i surten. A més, fent servir enzims de restricció adequats, es recupera el DNA recombinant, la seqüència reguladora i el gen d'interès.

Una altra manera d'obtenir moltes còpies d'un DNA determinat és mitjançant la reacció de la polimerasa en cadena, la PCR (Polymerase Chain Reaction). (Bueno i Torrens, 2011) Concretament, la DNA polimerasa sintetitza la cadena complementària a una regió d'una de les cadenes de la doble hèlix de DNA, estructura que ha sigut prèviament escalfada a una temperatura d'entre 90 °C i 95 °C durant 1 minut per separar els seus dos filaments, un procés anomenat desnaturalització, i refredada a 55 °C per permetre la hibridació de dos encebadors a les cadenes de DNA impedit la seva unió, un procés anomenat alineament. Els dos encebadors són dues seqüències curtes d'entre 15 i 20 oligonucleòtids de RNA, cadascuna complementària a una seqüència d'una cadena de la doble hèlix de DNA diferent, que s'associen als filaments de DNA delimitant la zona de material genètic d'interès. El fet de tenir dos encebadors simultàniament porta a la síntesi d'una doble hèlix de DNA.

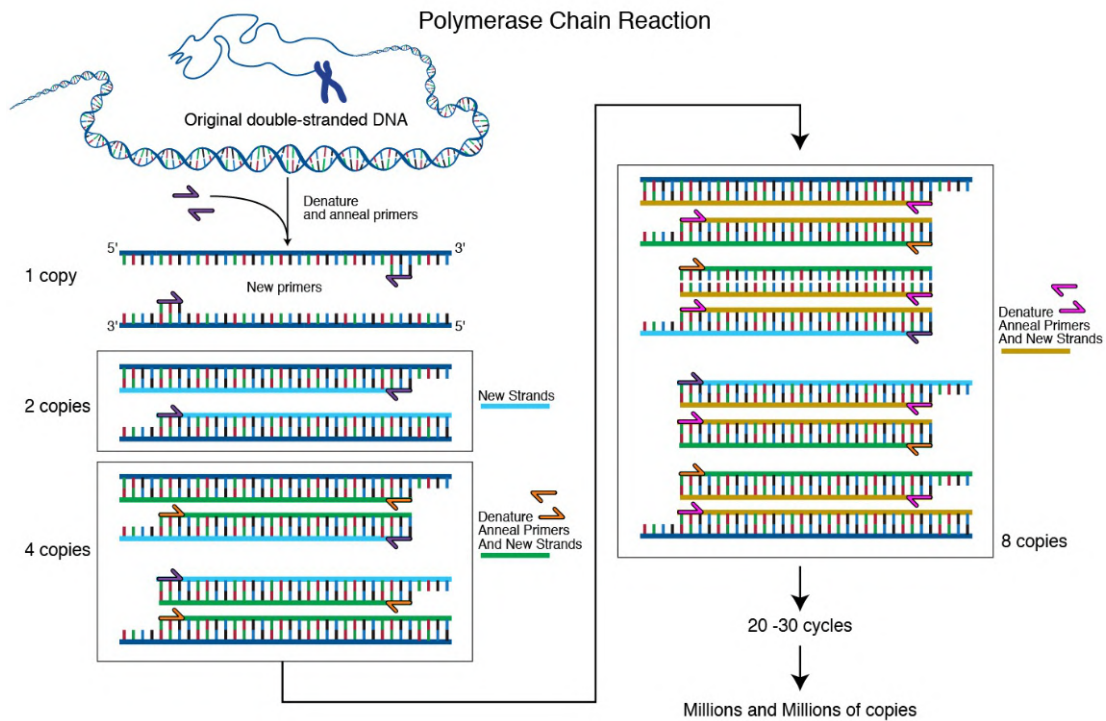
Finalment, per tal de produir còpies complementàries al fragment de DNA seleccionat, és necessari escalfar tot el complex fins a 75 °C perquè un tipus concret de DNA polimerasa, la Taq polimerasa, pugui generar un filament de DNA complementari a la seqüència seleccionada a partir dels encebadors, procés anomenat extensió. Es tracta d'una polimerasa provinent d'un bacteri termòfil, el *Thermus aquaticus*, és a

dir, que requereix temperatures elevades per poder funcionar amb normalitat, contràriament a la majoria de DNA polimerases, els enzims de les quals queden inactivats a causa de l'escalfament inicial de la doble hèlix de DNA.

Els substrats de la reacció de la PCR són dATP, dTTP, dGTP i dCTP.

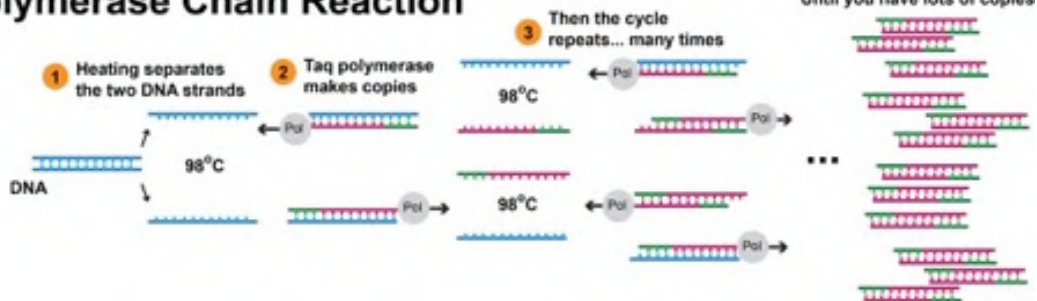
Gràcies a un aparell de laboratori anomenat termociclador és possible programar la reacció de la PCR el temps que sigui necessari, donant peu a la realització de molts cicles d'amplificació amb una autoregulació de les temperatures adients en cada moment. Al cap de 30 cicles, el fragment de DNA s'ha arribat a duplicar fins a 10^9 vegades. La PCR finalitza a causa d'un esgotament dels substrats. La tècnica de la PCR es fa servir per classificar diferents tipus de genomes, per modificar fragments de DNA in vitro, per construir gens funcionals a partir de diversos fragments de DNA o per identificar individus en concret, per exemple, progenitors o assassins.

Cal esmentar que existeixen diverses variacions de la PCR, com per exemple, la RT-PCR, una tècnica que serveix, per exemple, per amplificar el mRNA i detectar agents infecciosos. No obstant això, és necessari, primer, generar una còpia del filament del mRNA en cDNA fent servir el primer com a motlle a través de l'enzim transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase - RT). (Houdebine, 2003; Vigarà Fernández, Javier; Vega Piqueres, 2016)



Representació del funcionament de la PCR

Polymerase Chain Reaction



Representació del funcionament de la PCR

Per finalitzar la creació d'un OMG, només cal introduir el DNA recombinant a la cèl·lula hoste mitjançant la tècnica adequada depenent del tipus d'organisme que s'està modificant, és a dir, si es tracta d'un microorganisme, una planta o bé d'un animal.

Independentment d'això, existeixen recursos útils per facilitar la introducció del transgen en la cèl·lula com els vectors, ja esmentats anteriorment, els quals es fan servir com una tècnica en si mateixos i com un complement a altres tècniques de transgènesi ja existents. En ambdós casos, es parla de transfecció, ja que es fa referència a la introducció del DNA d'interès a cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis i virus, entre d'altres. De fet, els vectors es poden classificar en vectors virals, com l'adenovirus o el retrovirus, i en vectors no virals, com els plasmidis, els liposomes, que són vesícules esfèriques, o els cromosomes artificials, que són cromosomes copiats dels originals de l'organisme però que contenen el gen d'interès. (Bueno i Torrens, 2011; Gibbons et al., 2014; Jouve, 2000)

Per últim, cal tenir en compte que la introducció de seqüències de DNA que aïllen el transgen, anomenades *insulators* o aïllants, en la construcció del vector pot evitar que l'expressió del transgen es perdi a curt termini. A més, el transgen pot desaparèixer per destrucció o a causa de la seva desaparició en la descendència, ja que el gen pot romandre en forma episòmica, és a dir, en constant replicació i lliure al nucli cel·lular. Per tal de millorar l'expressió del transgen, es poden incorporar introns artificials al final de la seva seqüència, o inserir el gen al lloc desitjat sense interrompre la funció de cap gen clau per a la supervivència cel·lular utilitzant tècniques de transgènesi precises. (Legorreta-herrera et al., 2012) El fet que a vegades el transgen no s'expressi en un organisme, s'observi en teixits on normalment no s'expressa (expressió ectòpica) o en moments del desenvolupament de l'organisme no específics, pot tenir lloc com a conseqüència del fenomen del mosaïcisme en les cèl·lules de la línia germinal dels progenitors de l'individu en qüestió, per molt que siguin organismes transgènics. El mosaïcisme és el trastorn pel qual un individu té dos o més poblacions de cèl·lules amb informació genètica diferent. (Albareda, 1982)

A part d'afegir característiques biològiques, com s'ha vist fins ara, també se'n poden suprimir mitjançant la manipulació de gens determinats del genoma, interferint la funcionalitat del RNA o substituint el gen. Llavors, sovint, es parla del concepte de teràpia gènica. (Bueno i Torrens, 2011)

2.1.1.2. Transgènesi als gàmetes

En l'àmbit de la transgènesi animal, en primer lloc, trobem les tècniques de transferència del gen d'interès als gàmetes, és a dir, directament a les cèl·lules sexuals, que són els òvuls en el cas de les femelles i els espermatozoides en el cas dels mascles. El tipus de mètode en qüestió permet que, un cop hagi tingut lloc la fecundació, el DNA forà arribi a totes les cèl·lules de l'embrió i que, per tant, estigui present en totes les cèl·lules de l'individu que n'evoluciona. Es divideix en dos àmbits, la transferència genètica a l'esperma i els seus precursors i la transferència genètica als oòcits, els precursors immadurs de l'òvul. (Houdebine, 2003)

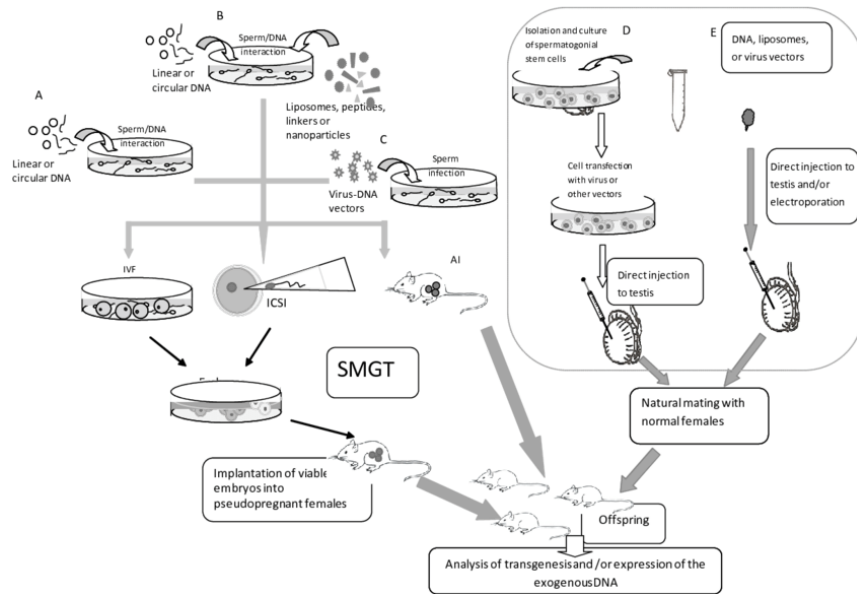
2.1.1.2.1. A L'ESPERMA I ELS SEUS PRECURSORS

2.1.1.2.1.1. DIRECTAMENT A L'ESPERMA

2.1.1.2.1.1.1. MITJANÇANT SMGT

Per començar, es tractarà un desenvolupament que va provocar molts dubtes respecte el seu funcionament quan va ser publicat per primer cop, anomenat la transferència genètica mediada per l'esperma o semen, i, conseqüentment, pels espermatozoides (Sperm Mediated Gene Transfer - SMGT) (Clark & Whitelaw, 2003). Cal establir que l'esperma madur té un genoma inactiu, és a dir, que no es replica, el qual està cobert per protamines, un tipus de proteïnes nuclears petites que substitueixen a les histones, un altre tipus de proteïna, al llarg de l'espermatogènesi, la producció d'espermatozoides. Així, les protamines deixen poc accés al DNA forà en el genoma de l'esperma i, per tant, el transgen no s'hi pot integrar, però sí que pot associar-se a l'esperma. (Houdebine, 2003)

És per això que es fa servir la tècnica de transfecció d'espermatozoides per tal d'inserir el DNA exogen al genoma de l'esperma. Es tracta de la incubació de l'esperma en presència del DNA que es desitja transferir per fer servir els espermatozoides com a vehicle del fragment de material genètic en qüestió i com a responsables de la seva introducció a l'oòcit en el moment de la fecundació *in vitro*. L'any 1989, es va descriure per primer cop la generació de ratolins transgènics mitjançant el mètode d'inseminació artificial, fent servir els passos descrits anteriorment.



Representació de la transgènesi mitjançant SMGT (Fernández-González et al., 2012)

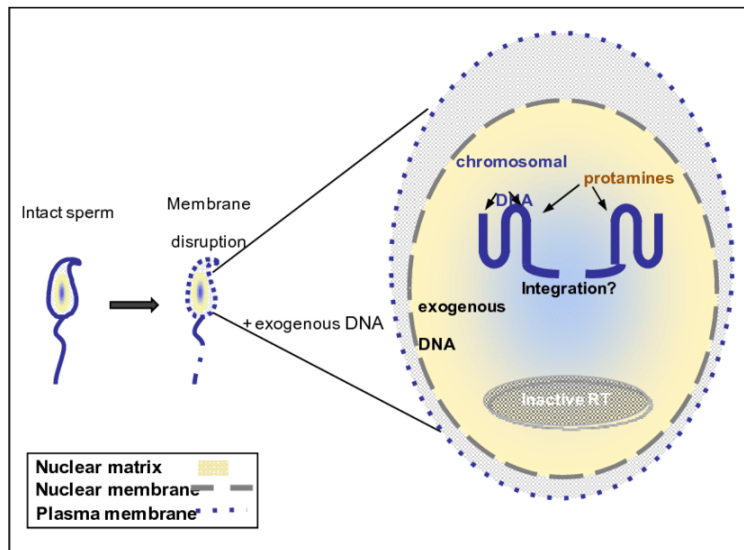
Com s'ha pogut observar, es tracta d'un mètode aparentment molt senzill, però que va donar peu a una gran polèmica al voltant del fet que la seva reproductibilitat era d'un nivell baix, ja que diferents grups de laboratori no van ser capaços de reproduir l'experiment amb ratolins. Malgrat això, pocs anys més tard, el mateix grup de descobridors va aconseguir produir porcs transgènics amb el mateix mètode, aconseguint una eficiència d'entre el 54 i 60% i demostrant que els espermatozoides d'altres espècies eren capaços de realitzar el procés descrit per incorporar el DNA forà.

Finalment, altres problemes que presenta són les recombinacions amb el DNA genòmic que pateixen els transgens, així com les reordenacions o els rearranjaments que tenen lloc en el DNA forà un cop integrat, com, per exemple, en el cas de vaques, porcs, ovelles i medakes, un tipus de peix japonès. Cal remarcar que les reordenacions consisteixen en les ruptures i reunions incorrectes de segments cromosòmics. Totes les dificultats esmentades suposen un obstacle per a la formació de línies d'animals transgènics amb nivells d'expressió estables. (Albareda, 1982; Felmer, 2004; Houdebine, 2003)

Una de les possibles explicacions a la baixa reproductibilitat de l'experiment és que l'esperma conté DNAsa, un enzim que hidrolitza el DNA, i, per tant, degrada i fragmenta el DNA forà. L'enzim DNAsa és abundant en el plasma seminal, es troba associat a l'esperma en quantitats variables i és activat pel DNA forà, ja que l'enzim DNAsa s'encarrega de protegir a l'esperma de qualsevol tipus de contaminació. A més, fenòmens com l'electroporació, és a dir, l'exposició a un camp elèctric per augmentar la permeabilitat de la membrana plasmàtica, o la transfecció amb agents químics milloren l'absorció del DNA d'interès en l'esperma. (Houdebine, 2003)

2.1.1.2.1.1.2. MITJANÇANT ICSI

D'altra banda, existeix una segona tècnica, la transgènesi mitjançant la injecció espermàtica intracitoplasmàtica (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection – ICSI o ICSI-Tr) que permet transferir transgens de gran mida, com per exemple de 500 kb, i produir animals transgènics de forma eficaç i menys costosa en comparació amb altres tècniques, ja que potencia la creació d'embrions modificats genèticament en diverses espècies de mamífers (Gibbons et al., 2014). Es tracta de la injecció directa d'esperma als oòcits que es fa servir en humans per dur a terme la fecundació in vitro. De forma experimental, la tècnica ha estat aplicada als *Xenopus*, un tipus de granotes molt utilitzades pels biòlegs per estudiar el desenvolupament, a les quals no els funcionava l'aplicació del mateix protocol que en el cas dels mamífers. També ha resultat un mètode exitós en ratolins, però el seu rendiment no és més elevat que el de la microinjecció al pronucli, una tècnica que es veurà més endavant. La ICSI també és molt útil per transferir fragments de DNA en construccions com el BAC o el MAC (Mammalian Artificial Chromosome), un cromosoma artificial de mamífers que es fan servir com a vector i vehicle de gens nuclears. (Houdebine, 2003)



Representació del funcionament de l'ICSI (Fernández-González et al., 2012)

En el cas dels *Xenopus*, per millorar la integració del DNA, es pot tractar l'esperma amb *Triton*, un detergent apolar suau, o congelant-lo i descongelant-lo, per provocar la desestabilització de la membrana de l'esperma i, per tant, deixant que el DNA forà pugui entrar lliurement a l'esperma. Una alternativa és la integració mediada per l'enzim de restricció (Restriction Enzyme Mediated Integration - REMI). Consisteix en descondensar el DNA genòmic, dividint la cromatina de l'esperma, el DNA nuclear, amb un enzim de restricció que reconeix unes localitzacions determinades, donant lloc al mecanisme de

reparació i millorant la possibilitat del DNA forà d'integrar-se al genoma de l'embrió. No obstant això, s'ha de tenir en compte que els tractaments esmentats poden reduir la capacitat dels espermatozoides de fecundar oòcits. (Celebi et al., 2003; Houdebine, 2003)

Com a resposta a totes les complicacions detallades, s'ha creat un nou possible mètode que es basa en l'adhesió del DNA d'interès a un anticòs monoclonal, un tipus d'anticòs produït per un sol clon de limfòcits B, cèl·lules especialitzades en el sistema immunitari. El complex és capaç d'associar-se de forma estable a l'esperma a partir del reconeixement d'una proteïna a la superfície del fluid i és utilitzat per fecundar ratolins, gallines i porcs, donant peu a recent nascuts, el 30% dels quals són animals transgènics. (Houdebine, 2003)

Cal destacar que també és possible la combinació de les dues tècniques principals explicades, és a dir, la transferència genètica mediada per espermatozoides combinada amb la injecció intracitoplasmàtica de l'esperma (SMGT-ICSI) (Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014).

2.1.1.2.1.2. IN VITRO MITJANÇANT CÈL·LULES DE PRECURSORS DE L'ESPERMA

En segon lloc, es troba l'ús de cèl·lules de precursors de l'esperma per la transferència de gens *in vitro*. Per posar en pràctica el protocol que es tracta, les cèl·lules mare (Stem Cells) són aïllades, cultivades sota unes condicions determinades per prevenir la seva diferenciació, transfectades pel DNA forà escollit, seleccionades i introduïdes al testicle receptor, on es diferencien. L'esperma resultant hoste del DNA forà es fa servir per fecundar oòcits mitjançant el mètode ICSI, entre d'altres. Cal dir que les cèl·lules mare són aquelles capaces de donar lloc a una o més cèl·lules diferenciades, és a dir, amb unes característiques i funcions concretes. És per això que s'anomenen precursors de l'esperma a aquells conjunts de cèl·lules que estan parcialment diferenciades. (Celebi et al., 2003; Houdebine, 2003)

2.1.1.2.1.3. IN VIVO DIRECTA A CÈL·LULES DE PRECURSORS DE L'ESPERMA

En tercer lloc, es troba la transferència directa del gen d'interès a les cèl·lules de precursors de l'esperma *in vivo*. Es basa en la injecció directa d'un fragment de DNA als túbuls seminífers, uns túbuls que es troben a l'interior dels testicles i s'encarreguen de produir espermatozoides i la hormona de la testosterona masculina. Després de dur a terme el procés de fecundació, les cèl·lules que tenen el DNA forà integrat poden generar animals transgènics, concretament s'han fet servir per obtenir ratolins transgènics amb un grau d'eficiència moderat i un grau d'integració independent en diferents cèl·lules, i, per tant, diferent en diferents animals. (Celebi et al., 2003; Houdebine, 2003)

2.1.1.2.2. ALS OÒCITS

L'altre tipus de transferència genètica als gàmetes consisteix en la transferència als oòcits. En primer lloc, trobem la microinjecció als nuclis dels oòcits, a l'interior dels quals, el DNA no es replica, el DNA forà té poques possibilitats de ser integrat i no es manté al nucli fins la primera replicació de DNA a l'embrió. És per això que el mètode en qüestió dona lloc a un baix grau de naixement d'animals transgènics.

En segon lloc, existeix una tècnica basada en l'ús dels vectors retrovirals utilitzats en teràpia gènica amb algunes modificacions, l'aplicació de la qual resulta exitosa en vaques i micos, encara que no és comparable al grau d'èxit del mètode basat en clonació animal. Malgrat això, els vectors retrovirals que tenen una capa d'un retrovirus no són capaços d'infectar oòcits, ja que hi ha una absència de receptors de virus a la superfície dels oòcits. Per posar-hi remei, es fa servir la capa del virus de la estomatitis vesicular (Vesicular Somatitis Virus - VSV), la qual reconeix fosfolípids de membrana en tots els tipus de cèl·lules, permetent infeccions eficients independentment de l'origen de les cèl·lules. A més, la zona pel·lúcida (ZP), la capa que envolta els oòcits dels mamífers, és impermeable als complexos moleculars tan grans com els retrovirus. Les partícules retrovirals s'injecten entre la zona pel·lúcida i la membrana de l'oòcit quan es troba en la metafase II, moment en el qual la membrana nuclear és absent, deixant que els vectors retrovirals tinguin accés lliure a la cromatina. El mètode té algunes limitacions a causa dels vectors retrovirals, com l'eficiència limitada, l'espai limitat per a introduir gens exògens, un baix grau d'expressió dels transgens i la necessitat de controlar els diferents passos per evitar l'esplai dels vectors. (Houdebine, 2003)

Per últim, és necessari ressaltar que és possible realitzar la transferència del gen d'interès, prèviament clonat en bacteris, als gàmetes mitjançant la microinjecció de moltes còpies del DNA forà dissolt en un dels dos pronuclis, ja sigui en el del espermatozoide o en el de l'oòcit de ratolins recentment fecundats, justament abans de la fusió dels pronuclis masculí i femení que dona lloc al nucli de l'embrió unicel·lular, el zigot. Després, l'embrió obtingut s'allotja per fecundació *in vitro* a l'úter de la mare per donar peu al desenvolupament embrionari. Així, el DNA exogen s'integra en la línia germinal resultant en entre un 10% i 30% de zigots supervivents, i entre un 2% i 40% d'individus evolucionats amb presència del gen d'interès. (Jouve, 2000)

2.1.1.3. Transgènesi als embrions

La transferència del DNA forà a embrions d'una única cèl·lula permet transmetre el transgen a totes les cèl·lules que formaran l'organisme que en derivarà i a la seva descendència. A diferència de la microinjecció de DNA, les tècniques de transfecció, que es veuran més endavant, basades en vectors són més apropiades en el cas de transferència de gens en cèl·lules cultivades al laboratori. (Houdebine, 2003)

2.1.1.3.1. MITJANÇANT MICROINJECCIÓ PRONUCLEAR

La microinjecció pronuclear consisteix en la introducció del DNA recombinant en un òocit acabat de fecundar, és a dir, en injectar una solució de DNA amb una microxeringa controlada per un micromanipulador que es basa en un equip d'òptiques i braços mecànics mòbils. Es tracta d'un procés dirigit amb un microscopi. (Bueno i Torrens, 2011; Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003)

Quan la reproducció natural dels animals té lloc, el nucli de l'espermatozoide s'introdueix dins de l'òocit i durant un breu període de temps, hi coexisteixen els dos nuclis que s'anomenen pronuclis a causa de l'estadi en el qual es troben. El nucli del zigot s'acaba formant a través de la fusió dels pronuclis. Just abans del pas descrit és quan, mitjançant la fecundació in vitro, s'introdueix el DNA recombinant i es microinjecten entre 500 i 5000 còpies del gen d'interès en un dels dos pronuclis. Normalment, encara que no existeixin diferències significatives entre l'ús del pronucli femení i el del masculí en el procés de microinjecció, el DNA es microinjecta al pronucli masculí, ja que és més gran que el femení. El mètode en qüestió va demostrar que era possible fer servir un plasmidi recombinant com a vector per transferir gens forans directament a l'embrió.

Quan els pronuclis es fusionen, sovint el DNA recombinant queda incorporat al genoma, donant lloc a un zigot transgènic que es desenvolupa al laboratori al llarg d'un parell de dies i que, posteriorment, es transplanta a l'úter d'una femella receptora preparada i sincronitzada hormonalment per desenvolupar embrions a causa del seu aparellament amb un mascle amb vasectomia o de la realització d'un tractament hormonal, també anomenades pseudogestants. (Albareda, 1982; Bueno i Torrens, 2011; Felmer, 2004; Houdebine, 2003; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

Si el transgen s'ha inserit amb èxit, l'individu que evolucionarà a partir del zigot transgènic serà un animal transgènic. Aleshores, l'organisme obtingut es farà servir per efectuar aparellaments selectius successius per obtenir una soca completament transgènica. Cal recordar que una soca és un grup d'organismes d'una

mateixa espècie que comparteixen determinades característiques genètiques específiques, per exemple, el fet de ser transgènics i contenir un mateix transgen. (Bueno i Torrens, 2011)

A. Microinyección pronuclear



Representació de la microinyección pronuclear (Órgano de divulgación de la Academia Colombiana de Ciencias, 2007)

La microinyección pronuclear és el mètode més utilitzat per generar animals transgènics. Només s'aplica en el cas de cèl·lules individuals cultivades quan la resta de tècniques han resultat ser ineficients, de tal manera que se'n generen clons i poden ser amplificades

Es tracta d'un mètode que es fa servir en ratolins i altres mamífers des de l'any 1980. Concretament, com ja s'ha esmentat abans, el primer ratolí transgènic es va obtenir a partir de la microinyección del DNA viral SV-40. L'eficàcia de l'obtenció de ratolins transgènics mitjançant la tècnica de la microinyección es situa entre el 5% i el 25%, quan es microinyecten molècules lineals. De fet el seu èxit com a tècnica i mitjà d'integració d'un transgen de forma global és molt variable, es tracta d'una de les seves principals limitacions. Alguns el localitzen entre l'1% i el 20%, altres per sota del 5% en animals de granja, altres consideren que entre el 10% i el 30% d'embrions contindrà fins a 100 còpies del DNA forà per cèl·lula en tots els teixits incloent la línia germinal, altres associen un 1% d'èxit a l'àmbit dels animals domèstics i un 3% als animals de laboratori, o que un 3% i 5% dels animals nascuts són portadors del transgen. En el cas dels conills i les rates, s'obtenen valors més inferiors i en el cas dels porcs, ovelles, cabres, aus i peixos un nombre encara més inferior, sobretot en el cas de les vaques.

Cal destacar que els ratolins transgènics es fan servir per estudiar diferents aspectes dels mamífers, presenten un sistema de model per estudiar processos de malalties i com a eines de seguiments de canvis. (Albareda, 1982; Clark & Whitelaw, 2003; Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003; Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014; Palmiter & Brinster, 1985)

Els òvuls microinyectats que donaran lloc a animals transgènics fundadors s'identifiquen mitjançant la tècnica del Southern blot després del seu naixement (Clark & Whitelaw, 2003). Es tracta d'un mètode utilitzat per identificar la presència d'un gen determinat i la seva mida mitjançant l'ús d'una sonda o un

polinucleòtid que pot realitzar marques radioactives o unions amb un reactiu fluorescent, fet que permet rastrejar-la. El mètode d'electroforesi, que es basa en la separació de molècules segons la seva mobilitat en un camp elèctric, i la transferència a un filtre de nitrocel·lulosa, també hi juguen un paper important. (Vigara Fernández, Javier; Vega Piqueres, 2016)

Una alternativa per saber si el gen ha sigut transferit amb èxit consisteix en la introducció d'un "marker gene" que es microinjecti amb el gen d'interès i que tingui un producte visible sota el microscopi. Sovint, es fa servir la proteïna de fluorescència verda (Green Fluorescent Protein - GFP), ja que els embrions que apareguin de color verd sota llum ultraviolada (UV) voldrà dir que contenen el gen de la GFP. Malgrat això, el resultat visual que s'obté no vol dir que el gen d'interès s'hagi integrat, ja que podrien haver-se separat en el procés d'integració. (Houdebine, 2003)

Les diferències en els nivells d'expressió dels transgens en les diferents espècies poden tenir lloc com a conseqüència de diferents factors, entre els quals trobem la dificultat de controlar el lloc on s'integrarà el transgen que es regeix per la concentració i la forma (circular o linear) del DNA, les diferències de l'activitat dels mecanismes de reparació del DNA involucrats en la integració del transgen, o la opacitat dels òvuls i embrions en animals domèstics, concretament en porcs i remugants, a causa de la presència de lípids, que impedeix la visualització dels pronuclis. Això obliga a fer servir tècniques de microscòpia especials o a realitzar un procés de centrifugació per separar els lípids i permetre que es vegin els pronuclis. Un exemple de la complexitat de l'aplicació de la tècnica en qüestió en els animals domèstics esmentats es basa en uns estudis de transferència de gens en bovins en els quals va ser necessari injectar 36500 zigots per poder generar 18 vedells transgènics. (Albareda, 1982; Felmer, 2004; Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003)

A més, en general, són xifres molt baixes, ja que una gran part dels embrions moren posteriorment a la microinjecció principalment a causa de la presència d'un fragment de DNA mutagènic, que dona lloc a mutacions, i a causa de l'alteració del DNA endogen al lloc d'integració del DNA forà. La microinjecció pronuclear no pot ser utilitzada per introduir gens en cèl·lules en nivells de desenvolupament avançats, però presenta l'avantatge de no tenir límit en la mida o seqüència del DNA que es vol introduir. (Houdebine, 2003; Jaenisch, 1988; Palmiter & Brinster, 1985)

A més, una gran part dels embrions, s'obtenen després del procés de superovulació, l'alliberació de molts òvuls madurs en un sol cicle menstrual, que sovint s'aconsegueix a través de l'estimulació dels ovaris pel subministrament de medicaments (Houdebine, 2003).

La majoria dels animals transgènics fundadors obtinguts amb microinjecció pronuclear, més del 62%, són mosaics, és a dir, que només una part de les seves cèl·lules són portadores del transgen, probablement a

causa del fenomen del mosaïcisme en les cèl·lules germinals dels seus progenitors, ja esmentat anteriorment. Es creu que el mosaïcisme es produeix a causa de la integració del transgen en el genoma després de la primera replicació del DNA cromosòmic, després de la primera divisió del zigot. Els animals mosaics poden transmetre el transgen a la descendència però amb una freqüència menor al 50%. (Albareda, 1982; Felmer, 2004)

2.1.1.4. Transgènesi mitjançant les cèl·lules

2.1.1.4.1. MITJANÇANT CÈL·LULES PLURIPOTENTS

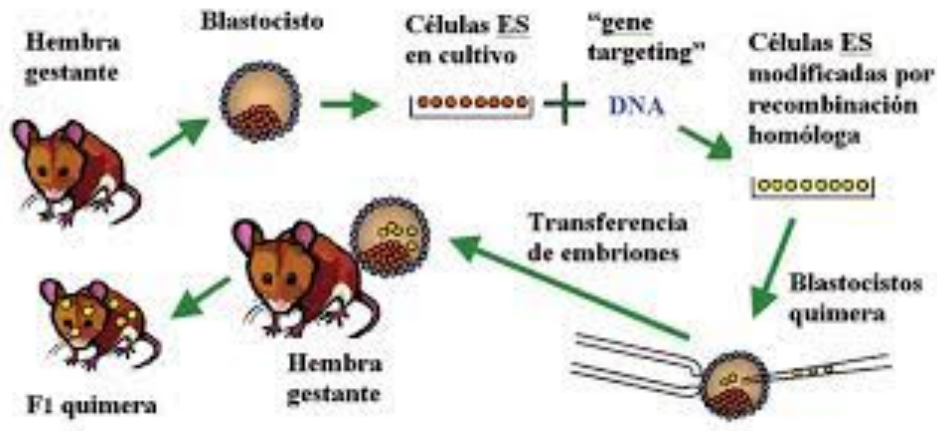
L'ús de cèl·lules mare embrionàries, també anomenades cèl·lules ES (Embryonic Stem Cells – ESC o ES cells), com a tècnica de transferència d'un transgen es basa en la seva capacitat de donar lloc a diversos tipus de cèl·lula, teixits i òrgans d'un organisme, gràcies a la seva propietat pluripotent. D'altra banda, també tenen la capacitat d'auto-renovar-se.

Es tracta d'un tipus de cèl·lules que provenen del massís cel·lular intern dels blastòcits, les cèl·lules que formen l'estructura dels embrions en una etapa molt primària del seu desenvolupament, anomenada blastocist, ja esmentada anteriorment. També es fa referència al període descrit amb el nom d'estadi de blàstula que succeeix abans que comencin a formar-se els diversos teixits de l'individu i abans que l'embrió s'implanti a l'úter de la mare.

Un cop obtingudes les cèl·lules mare embrionàries de l'espècie que es desitja modificar, se'ls microinjecta el gen d'interès a través d'una transfecció de DNA o per una transducció mediada pels retrovirus. Aleshores, són cultivades in vitro per comprovar que l'han incorporat al seu genoma correctament, sempre mantenint la seva pluripotència i el seu estat indiferenciat gràcies a la presència de factors inhibitoris de la diferenciació en el medi de cultiu. Llavors, es seleccionen les cèl·lules mare embrionàries que presentin el DNA forà per un fenotip específic, les transplanten a un embrió receptor que es trobi al mateix estat de desenvolupament que l'embrió original, i que, per tant, també estigui format per cèl·lules mare embrionàries, és a dir, a una mòrula, un estat encara més previ al blastocist, o a un blastocist. Cal esmentar que les cèl·lules mare embrionàries modificades són identificades mitjançant la tècnica del Southern blot. (Albareda, 1982; Bueno i Torrens, 2011; Clark & Whitelaw, 2003; Felmer, 2004; Houdebine, 2003; Jaenisch, 1988; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

El blastocist o la mòrula hoste es desenvoluparan donant lloc a organismes quimèrics, és a dir que contenen tantes cèl·lules mare embrionàries modificades com de no modificades. Per tant, quan l'organisme neixi, no serà completament transgènic, sinó que serà una barreja de cèl·lules mare embrionàries original i les transferides. Cada cèl·lula d'un organisme quimèric, incloent els gàmetes, s'origina a partir de les cèl·lules mare embrionàries del donant, les quals han sigut modificades, o de l'embrió receptor. Per tant, una quimera només serà fundadora d'una línia transgènica si la seva línia germinal ha sorgit de les cèl·lules mare embrionàries modificades genèticament. L'alternativa per

aconseguir una generació transgènica a partir dels individus obtinguts és la realització d'aparellaments selectius successius. (Bueno i Torrens, 2011; Clark & Whitelaw, 2003; Houdebine, 2003)



Representació de la transgènesi mitjançant cèl·lules pluripotents (Peñaranda & Asensio, 2019)

La tècnica de les cèl·lules mare embrionàries és l'única que permet dirigir per recombinació homòloga o *gene targeting*, és a dir, l'intercanvi de seqüències de DNA entre dues molècules, la integració del transgen en una localització genòmica concreta favorable, transcripcionalment activa, permetent un millor control de la seva expressió i de la quantitat de còpies introduïdes. A més, possibilita la modificació dels gens endògens, ja que la precisió de la tecnologia en qüestió permet substituir un gen per una versió seva modificada al laboratori, així com inactivar l'expressió d'un gen a través del procés de "knock-out" i mitjançant un marcador de selecció o gens selectors.

El major desavantatge de la transgènesi mitjançant cèl·lules pluripotents és l'absència del transgen en la línia germinal de molts dels organismes obtinguts, de tal manera que molts d'ells pateixen el mosaïcisme. A més, la transgènesi mitjançant les cèl·lules embrionàries només s'ha aplicat en ratolins, també referits com a murins, ja que de moment és totalment impossible aconseguir l'aïllament de cèl·lules mare embrionàries d'altres espècies que conservin la seva capacitat de pluripotencialitat.

Entre d'altres utilitats, els diversos models de ratolins transgènics produïts mitjançant la tècnica en qüestió es fan servir per estudiar la funció gènica, "knock-out" s'han fet servir com a models de malalties genètiques en humans i com a models per analitzar la funció de gens endògens.

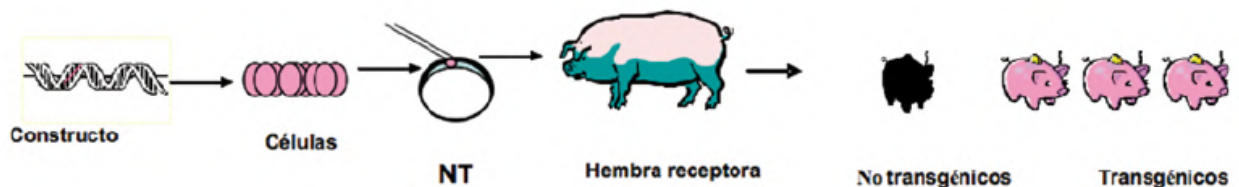
Cal esmentar que en els últims anys, s'ha estudiat la derivació de cèl·lules mare pluripotents induïdes (Induced Pluripotent Stem Cells - iPSCs) que consisteix en la reprogramació de cèl·lules somàtiques per tal d'obtenir cèl·lules mare pluripotents i que és aplicable a espècies ramaderes. (Albareda, 1982; Bueno i Torrens, 2011; Felmer, 2004; Houdebine, 2003; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

2.1.1.4.2. MITJANÇANT LA TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES SOMÀTIQUES EN CULTIU I TRANSFERÈNCIA NUCLEAR (CLONACIÓ)

La transferència nuclear mitjançant cèl·lules somàtiques (SCNT) requereix l'obtenció prèvia de clons cel·lulars a partir d'una cèl·lula diferenciada que conté el gen d'interès, ja que se li ha transferit mitjançant mètodes de transfecció. Posteriorment, es transfereixen els nuclis de les cèl·lules somàtiques clonades a oòcits enucleats, precursors immadurs de l'òvul als quals se'ls ha eliminat el nucli i, per tant, el seu material genètic. La fusió entre la membrana del nucli transferit i l'oòcit receptor s'aconsegueix mitjançant impulsos elèctrics als quals són sotmesos. Llavors, es produeix una activació química o elèctrica de la divisió cel·lular per a poder aconseguir la formació dels embrions. (Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003)

El zigot generat és activat per tal que s'iniciï el desenvolupament embrionari i, després de ser cultivat in vitro o in vivo, és transferit a una femella receptora sincronitzada hormonalment que du a terme el procés de gestació. Cal recordar que els nuclis de les cèl·lules del blastocist són capaços de dirigir el desenvolupament embrionari amb normalitat dels oòcits reconstituïts, donant lloc a un organisme.

C. SCNT



Representació de la transgènesi mitjançant la transformació de cèl·lules somàtiques en cultiu (SCNT) (Órgano de divulgación de la Academia Colombiana de Ciencias, 2007)

L'inici de l'aplicació de la clonació en animals domèstics es situa a l'any 1977 amb el naixement de la Dolly, una ovella clonada resultant de la fusió d'un nucli d'una cèl·lula provinent de la glàndula mamària d'una ovella adulta, és a dir, de les seves mames o pits femenins, amb un oòcit enucleat. Per fer possible un mètode de transferència nuclear és clau la coordinació del cicle cel·lular de la cèl·lula receptora i el de la cèl·lula donant de nuclis. Amb l'experiment descrit, no només es va demostrar que la reprogramació nuclear és possible en cèl·lules adultes i especialitzades, sinó que, a més, va permetre la clonació en totes les espècies d'animals domèstics i mamífers, com els conills, els ratolins, els porcs, les ovelles, els bovins, les cabres, els cavalls i les mules, i en altres com les fures o els camells.

Es tracta del mètode més utilitzat en la producció d'animals transgènics de granja, ja que permet generar diversos organismes transgènics alhora i és entre un 20% i un 50% més eficient que la microinjecció de DNA. A més, els animals fundadors mai pateixen mosaïcisme i sempre transmeten el transgen a la línia germinal, ja que es realitzen anàlisis moleculars abans de la transferència nuclear sobre l'estructura i l'expressió del transgen en les cèl·lules donants per assegurar que totes les cèl·lules de tots els animals clonats produïts contenen el transgen.

La clonació fa possible la realització de modificacions genètiques precises, entre elles els "knock-out", mitjançant l'aplicació de la recombinació homòloga o *gene targeting* en els gens endògens de les cèl·lules somàtiques de forma prèvia a la transferència nuclear, de tal manera que obre noves possibilitats de modificació genètica en animals de granja que fins al moment havien estat limitades a les cèl·lules mare embrionàries en ratolins, com s'ha vist en l'apartat anterior.

D'altra banda, els donants nuclears poden mantenir-se congelats fins al moment que es decideixi fer-los servir i es pot escollir el sexe de l'animal clonat, el qual serà el mateix que el de l'animal que es faci servir com a donant de nucli. (Clark & Whitelaw, 2003; Felmer, 2004; Gibbons et al., 2014; Houdebine, 2003; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

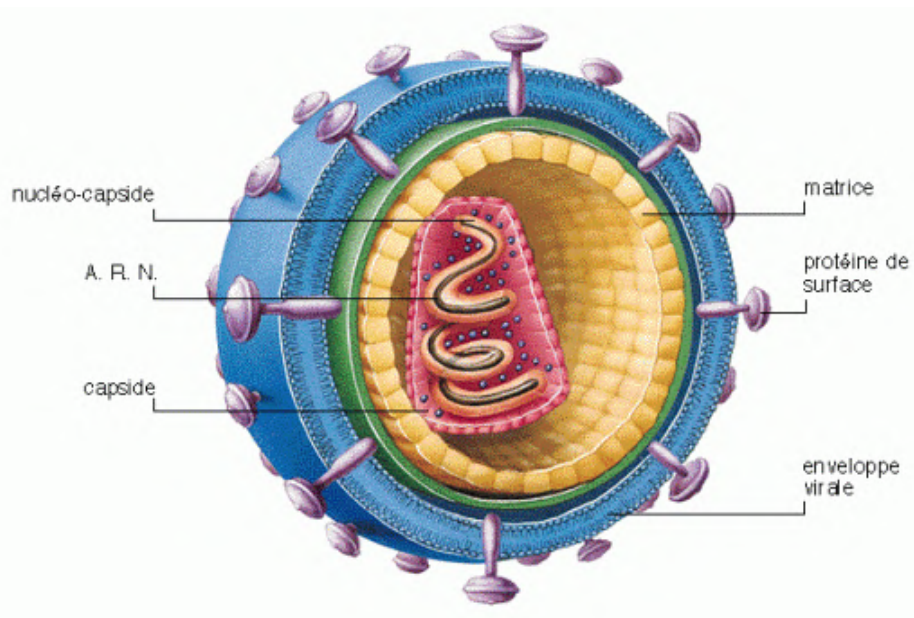
El principal problema del mètode mencionat és que genera un elevat nombre d'anormalitats embrionàries, fetals i perinatales, és a dir, en períodes immediatament anteriors o posteriors al naixement del descendent (Gibbons et al., 2014). En segon lloc, amb la clonació de la ovella Dolly, es va descobrir que es pot produir un escurçament dels telòmers, els extrems dels cromosomes, de tal manera que quedin d'una llargada similar a la dels del donant nuclear. El problema és que l'escurçament dels telòmers està directament associat amb una disminució de la capacitat de replicació i amb l'envelliment. Per tant, la SCNT podria, en un principi, reduir els anys de vida de l'animal. Malgrat això, alguns estudis assenyalen que els animals poden ser clonats a través de la transferència nuclear a partir de cèl·lules d'animals adults d'edat avançada i que l'escurçament dels telòmers determinat per l'edat pot ser invertit. (Larrick & Thomas, 2001)

El percentatge d'embrions transgènics produïts a través del mètode en qüestió es troba al voltant d'un 20%, mentre que el dels animals mamífers nascuts vius és d'entre l'1% i el 3% dels embrions transferits. Malgrat això, en l'espècie bovina s'han aconseguit valors d'entre el 15% i el 20%, i en les ovelles d'entre el 8% i el 10%. (Gibbons et al., 2014; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

2.1.1.5. Transgènesi mitjançant vectors virals

La transgènesi mediada per vectors virals és molt eficient, ja que els virus ho són a l'hora d'incorporar el seu RNA o DNA en el genoma d'una cèl·lula. De fet, els vectors virals són més eficaços que la tècnica de microinjecció, encara que la integració del transgen sigui a l'atzar i que, per tant, l'expressió del transgen es vegi alterada. A més, tenen una limitació pel que fa a la mida del transgen que és possible incorporar i es fan servir en algunes teràpies a causa de l'elevada eficàcia de transferència i introducció que tenen de gens correctors al genoma de les cèl·lules que es desitja. (Gibbons et al., 2014; Jouve, 2000)

En primer lloc, cal aclarir que els virus són elements genètics infecciosos que poden replicar-se de manera independent als cromosomes de la cèl·lula que infecten. El seu genoma pot ser RNA o DNA i està envoltat per una capa proteica o càpsida. L'àcid nucleic i la càpsida formen la nucleocàpsida, o el core, del virus, que alhora pot estar envoltada per una altra capa. En la seva fase extracel·lular, el virus rep el nom de virió i és una partícula submicroscòpica inerta que adopta una estructura que li permet traslladar-se des de la cèl·lula en la qual ha sigut produït fins a una altra en la qual es pugui introduir.



Representació de l'estructura viral (vector)

Tot el conjunt de proteïnes associades al material genètic, com ara la càpsida, l'embolcall i les proteïnes reservori encapsulades, al llarg de la infecció, juguen un paper que depèn del tropisme cel·lular de cada virus, que és la interacció entre les proteïnes de fixació de la superfície de la partícula vírica i els receptors de membrana de la cèl·lula diana o cèl·lula *target*, les quals tenen una important funció receptora i reguladora.

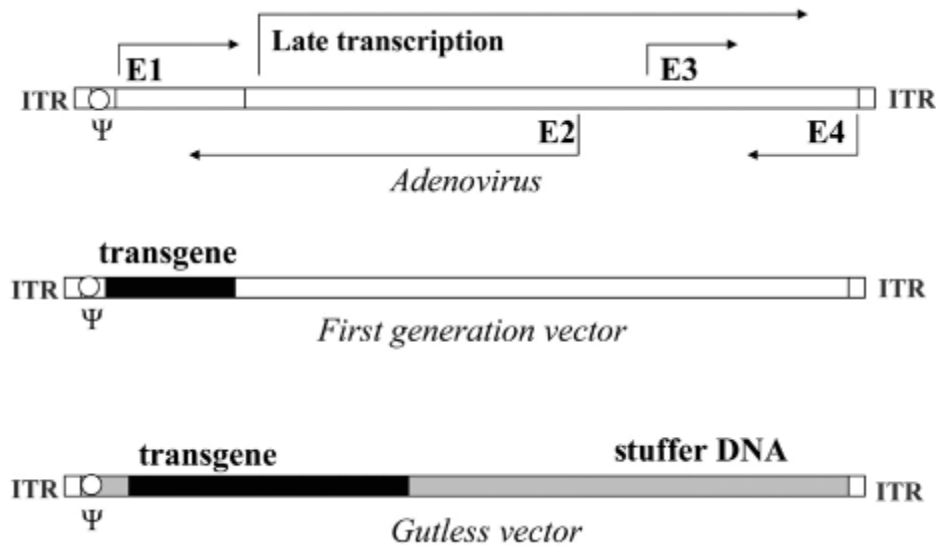
Un cop el virus s'ha fixat a la cèl·lula, la nucleocàpsida entra al citoplasma i l'àcid nucleic s'allibera de la càpsida i es dirigeix envers els llocs de la biosíntesi cel·lular. Quan el genoma viral s'introdueix a una nova cèl·lula s'inicia la fase intracel·lular, en la qual té lloc la replicació vírica. És necessari remarcar que la mida, l'origen i la forma del genoma viral influeixen en l'èxit i l'especificitat de la infecció.

Els vectors virals funcionen a partir de virus recombinants, que transfereixen material genètic a una cèl·lula diana. Es tracten de virions que poden infectar i transferir el seu material genètic, transfectar, però que no poden replicar-se sota determinades condicions. Els virus recombinants o vectors virals amb aplicacions en transgènesi més importants són els adenovirus, els retrovirus, els virus adenoassociats i els lentivirus. (Legorreta-herrera et al., 2012)

2.1.1.5.1. MITJANÇANT VECTORS ADENOVIRALS

Els vectors adenovirals són els elements clau d'un mètode utilitzat per transferir gens a embrions, generalment de ratolins, en estat de pronuclis, als quals se'ls ha retirat la zona pel·lúcida, és a dir, la capa fina que recobreix els oòcits dels mamífers (Albareda, 1982).

Es tracta d'un tipus de virus que va ser aïllat per primer cop a les amígdales i a les glàndules adenoides, també anomenades vegetacions, d'humans. Tant les adenoides, unes masses de teixit ubicades a la part posterior del conducte nasal, com les amígdales, unes masses de carn que es troben a ambdues bandes de la part posterior de la gola, ajuden a mantenir el cos sa, atrapant els bacteris i virus que l'organisme inhala o empassa.



Representació de la transgènesi mitjançant vectors adenovirals (Jozkowicz, 2017)

Els adenovirus contenen quatre gens, amb funcions reguladores, en el seu genoma, anomenats: E1, E2, E3 i E4. Per exemple, el gen E1 és clau per unir partícules virals, mentre que el gen E3 codifica proteïnes involucrades en la fugida del sistema immunitari de la cèl·lula hoste, és a dir, la fugida de la defensa de l'organisme contra infeccions com els virus o els bacteris. Per tal d'aconseguir la millora d'una característica determinada del vector, es manipulen les quatre regions de l'adenovirus, com per exemple, per augmentar la seva efectivitat, s'eliminen les regions E3, ja que no són essencials per a la replicació.

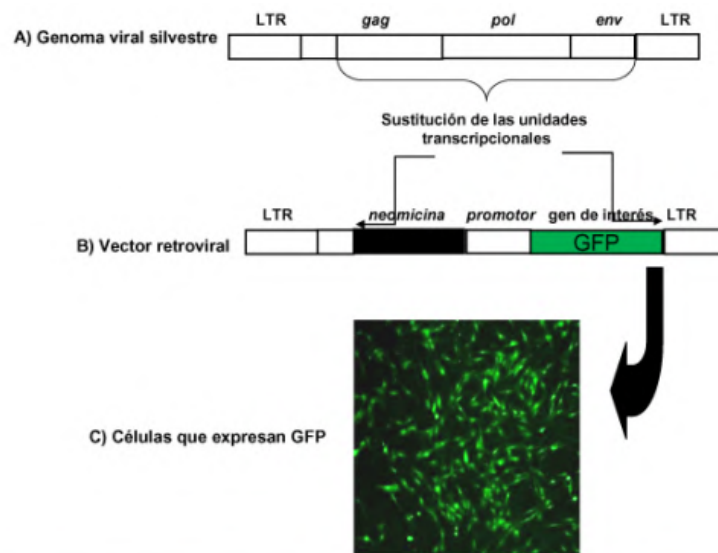
A més, els vectors adenovirals poden produir fàcilment grans quantitats de virus i inserir gens d'una mida considerable en les construccions. De fet, es fan servir en teràpia gènica *in vivo* perquè poden infectar tant cèl·lules que no es troben en fase de divisió, com cèl·lules que sí que s'hi troben, de manera eficaç a través de la seva replicació.

Els adenovirus, a part de ser virions sense embolcall altament estables, poden causar infeccions respiratòries, oculars, com les conjuntivals, i gastrointestinals. A més, algunes de les proteïnes virals poden ser tòxiques per la cèl·lula, i per tant, la seva expressió pot afavorir una resposta immune, de defensa, intensa contra les cèl·lules diana, les portadores de les construccions virals. (Legorreta-herrera et al., 2012)

2.1.1.5.2. MITJANÇANT VECTORS RETROVIRALS

Els vectors retrovirals poden ser modificats per clonar fragments de DNA i fets servir com a vectors per infectar embrions animals (Albareda, 1982). Són els vectors més útils per a la majoria d'experiments de teràpia gènica i són capaços d'infectar una ampli grup de cèl·lules. Per tal d'aplicar la tècnica dels vectors retrovirals és necessari que les cèl·lules es trobin en divisió perquè el transgen pugui integrar-se en el genoma hoste. Quan els retrovirus infecten una cèl·lula, el material genètic del virus es retrotranscriu de RNA a DNA de doble cadena. El DNA obtingut pot integrar-se de forma precisa com a còpia simple en el genoma de la cèl·lula hoste. (Legorreta-herrera et al., 2012)

Malgrat això, tenen una limitació en la mida del DNA que pot ser introduït als retrovirus. A més, la integració del DNA es produeix en diferents etapes de l'embrió en desenvolupament, fet que implica que el DNA no s'integri en totes les cèl·lules somàtiques o en la línia germinal i, per tant, que no hi hagi transmissió del transgen a la descendència. Conseqüentment, gran part dels animals obtinguts mitjançant la tècnica dels vectors retrovirals són mosaics, ja que només es produeix la integració del transgen en algunes cèl·lules de l'embrió. És per això que els animals resultants no transmeten el transgen a la descendència o ho fan amb una freqüència baixa.



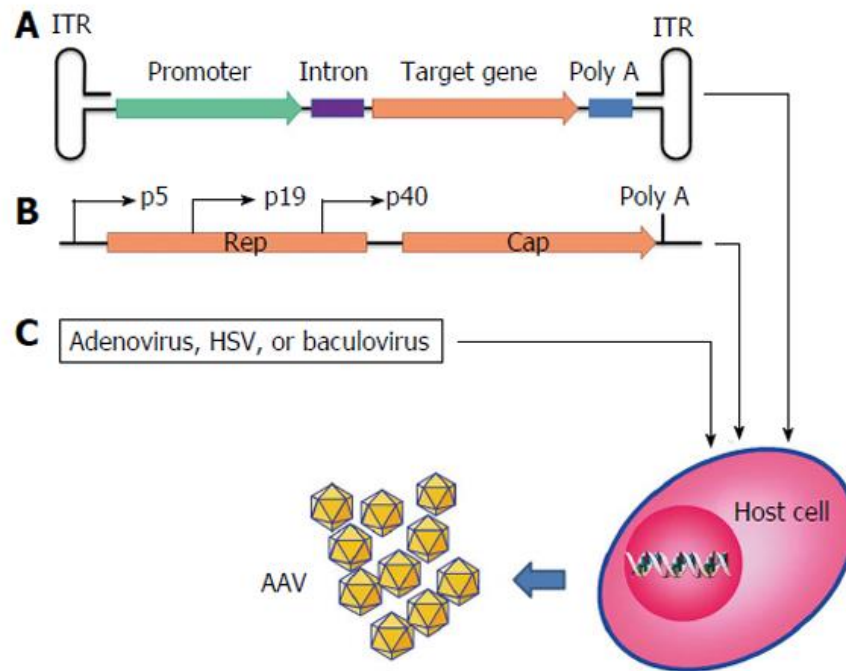
Representació de la transgènesi mitjançant vectors retrovirals (Legorreta-herrera et al., 2012)

La transgènesi mitjançant vectors retrovirals ha permès la obtenció d'animals transgènics com ratolins, aus, porcs, ovelles, gallines, vaques i micos. No obstant això, el tipus de vectors esmentats posseeixen una capacitat limitada de DNA forà que pot ser-hi acomodat i, per tant, impossibilita molts experiments. (Albareda, 1982; Felmer, 2004; Houdebine, 2003)

2.1.1.5.3. MITJANÇANT VECTORS DE VIRUS

ADENOASSOCIATS

Els virus adenoassociats (AAV) estan formats per cadenes senzilles de DNA i necessiten un adenovirus o un virus herpes per poder-se replicar. En cas d'absència d'un dels dos virus esmentats, anomenats virus cooperadors, la doble cadena de DNA viral s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste.



Representació de la transgènesi mitjançant vectors de virus adenoassociats (H. Chen, 2015)

Els AAV són un dels vectors més utilitzats, ja que donen peu a una expressió eficient de transgen al llarg de molt de temps en teixits diferents com ho són: el fetge, el múscul, la retina i el sistema nerviós central. A més, els AAV no són patògens, és a dir, que no causen malalties i se'ls elimina la major part del seu DNA, només deixant únicament les repeticions terminals invertides (Inverted Terminal Repeats - ITRs).

Malgrat això, existeix una immunitat als humans pels vectors AAV i la seva integració en el genoma humà és a l'atzar, fet que porta a una activació inesperada o inhibició de l'expressió del gen endogen.

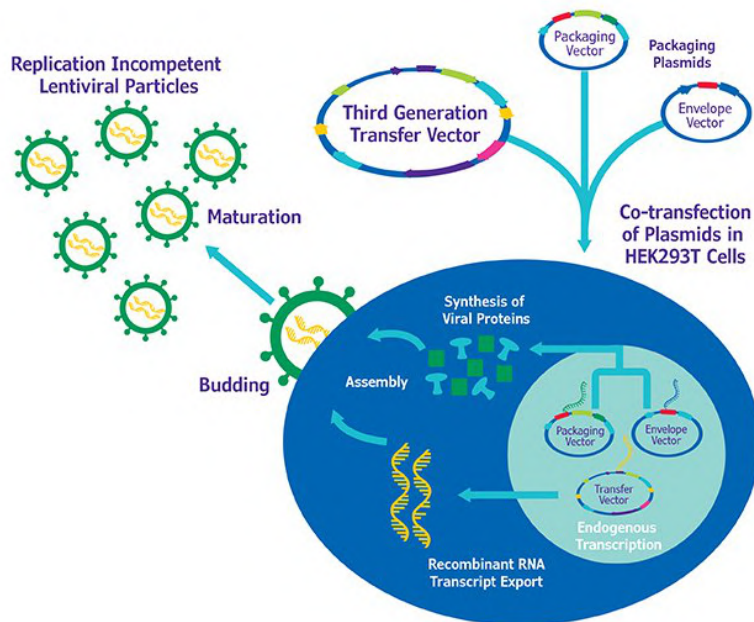
Existeixen diversos subtipus, anomenats serotipus, dels AAV, alguns d'ells s'expliquen a continuació. El serotipus AAV1 és adequat per a promoure l'expressió en el múscul esquelètic i la retina, mentre que el

serotipus AAV5 transfecta eficientment les neurones i les cèl·lules del pulmó. Contràriament, el serotipus AAV2 es caracteritza perquè és el que té una expressió que es manté la major quantitat de temps possible, però genera nivells d'expressió pobres. (Legorreta-herrera et al., 2012)

2.1.1.5.4. MITJANÇANT VECTORS LENTIVIRALS

Els lentivirus són un tipus de retrovirus i, en teràpia gènica, molts dels vectors lentivirus que es fan servir, es basen en el virus de la immunodeficiència humana (HIV). A més, els lentivirus poden introduir gens de grans mides i promoure la seva expressió durant un major temps, ja que s'integren al cromosoma. Poden infectar de forma eficient tant a cèl·lules que s'estiguin dividint, com a cèl·lules en procés de divisió. (Legorreta-herrera et al., 2012)

Els lentivirus contenen un element regular de la post-transcripció, que afavoreix l'expressió del transgen, i un fragment del virus HIV per permetre que el genoma viral entri al nucli de cèl·lules que no es troben en procés de divisió i que s'integri al DNA hoste (Houdebine, 2003). Concretament, els lentivirus es poden injectar en l'espai perivitellí del zigot o bé en l'oòcit per després realitzar la fecundació *in vitro*. L'espai perivitellí és l'espai situat entre l'òvul i la zona pel·lúcida dels mamífers. (Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

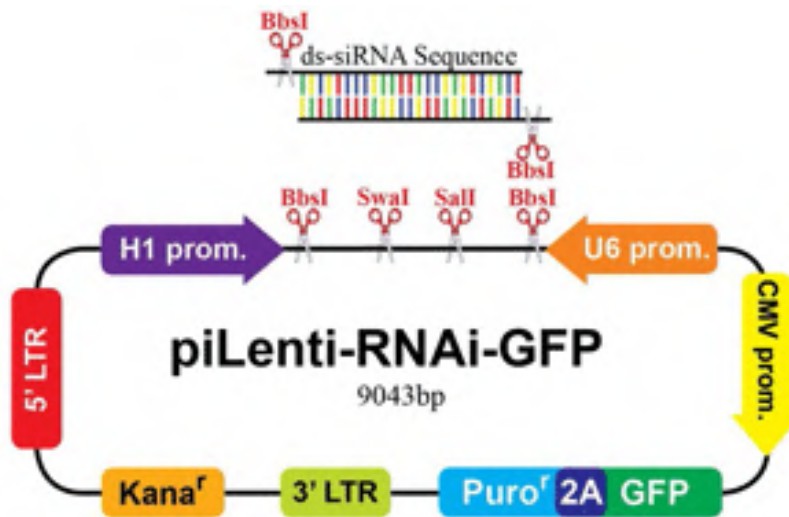


Representació de la transgènesi mitjançant vectors lentivirals

A l'hora d'aplicar un procés de transgènesi mitjançant vectors lentivirals, al voltant del 80% o entre el 80% i el 100% dels ratolins nascuts eren transgènics i al voltant del 90% dels ratolins expressaven els seus transgens al llarg de diferents generacions, sense que cap fenomen de silenciament de la seva expressió tingués lloc (Clark & Whitelaw, 2003; Houdebine, 2003). A part de ser una tècnica aplicable en ratolins, també ha estat aplicada en porcs, gallines i vaques amb una elevada eficiència resultant (Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014).

Malgrat els resultats exposats, integracions independents dels vectors de lentivirus tenen lloc en un mateix embrió, donant peu a la generació d'animals transgènics mosaics (Houdebine, 2003).

Mitjançant la combinació entre la tècnica en qüestió i els mètodes que es basen en la interferència de RNA (RNA Interference - RNAi) per suprimir l'expressió de gens específics es podria donar lloc a una tècnica innovadora per ampliar el coneixement actual sobre la funció gènica en diverses espècies animals i generar animals de granja menys susceptibles a malalties infeccioses (Clark & Whitelaw, 2003).



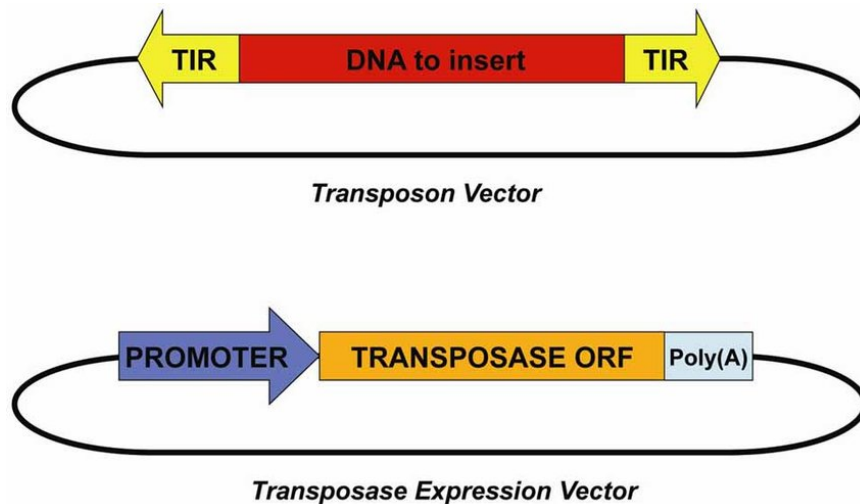
Representació de mètodes d'interferència en el RNA (RNAi)

2.1.1.6. Transgènesi mitjançant vectors d'addició gènica

2.1.1.6.1. MITJANÇANT VECTORS TRANSPOSONS

Els transposons són seqüències de DNA capaces de moure's al llarg del genoma, fet que es fa servir per utilitzar-los com a vectors a través de la preparació de construccions que es basen en la unió d'un transposó i un transgen, les quals es microinjecten als embrions alhora que es subministra la transposasa, un tipus d'enzim. Alguns exemples de vectors transposons són *Sleeping Beauty* i *piggyBac*.

En l'aplicació dels vectors transposons no existeix cap mena de control sobre el nombre de còpies del transgen que s'integren ni sobre el seu lloc d'integració. Per tant, no existeixen gaires probabilitats que l'animal transgènic fundador i la seva descendència expressin el transgen. De fet, poden originar-se animals mosaic. (Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014)

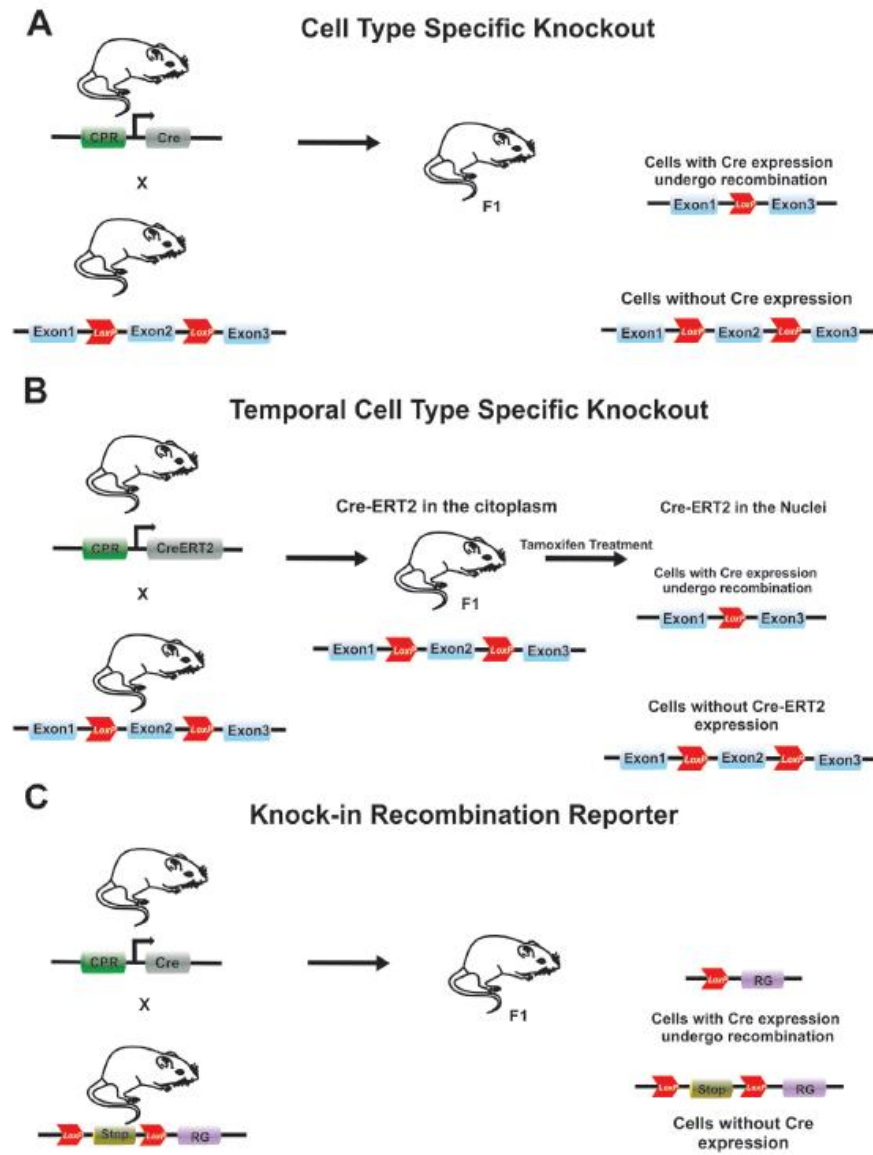


Representació de la transgènesi mitjançant vectors transposons (Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010)

2.1.1.6.2. MITJANÇANT VECTORS EPISOMALS

Alguns organismes tenen genomes episomals, és a dir, que contenen fragments de cromosomes que provenen d'una degradació parcial d'un cromosoma, anomenats "minuts dobles", els quals es repliquen de manera autònoma i són transmesos a les cèl·lules filla, les resultants de la divisió de cèl·lules mare. Alguns exemples d'organismes com els descrits són els bacteris, els quals tenen una gran varietat de plasmidis en el seu genoma, o els virus, sobretot els que formen part de la família dels herpes. (Houdebine, 2003)

2.1.1.7. Transgènesi mitjançant vectors de substitució



Representació de la transgènesi mitjançant vectors de substitució (Rocha-Martins et al., 2015)

2.1.1.7.1. GENS KNOCK-OUT

Es tracta d'una tècnica per generar animals "knock-out" a través de la transformació genètica mitjançant la recombinació homòloga o *gene targeting* en cèl·lules mare embrionàries. Amb l'ús del sistema esmentat és possible anul·lar la funció de gens endògens d'un animal com, per exemple, el ratolí, mitjançant la integració d'un marcador de selecció, fet que permet la generació de diversos centenars de ratolins anomenats "knock-out" que serveixen com a models de malalties genètiques en humans i com a models per analitzar la funció de gens endògens. (Felmer, 2004)

2.1.1.7.2. GENS KNOCK-IN

Es tracta d'un mètode per substituir un gen funcional per un altre gen funcional mitjançant un procés de diverses recombinacions homòlogues. No obstant això, també es poden aplicar altres tipus de tècniques més eficients, com, per exemple, l'ús del cèl·lules mare mutants desproveïdes del gen HPRT (Hypoxanthine Phospho-ribosyl Transferase), el qual és introduït al lloc d'integració per una doble recombinació homòloga, seguit de la realització d'una altra recombinació homòloga amb un vector que conté el gen exogen. (Houdebine, 2003)

2.1.2. Plantes

L'enginyeria genètica de plantes té com a principal objectiu la producció de genotips que expressin propietats d'interès. Això s'aconsegueix mitjançant l'adequada integració en el genoma de l'individu de segments de DNA forà provinent d'origens molt diversos.

El DNA inserit altera les característiques de la planta, mitjançant la modificació dirigida i controlada del seu genoma quan s'afegeixen, s'eliminen o es modifiquen els seus gens. Cal tenir en compte que no hi ha limitació per a la transferència de gens entre plantes de la mateixa espècie i espècies properament emparentades, ja que gens d'espècies no relacionades evolutivament també poden ser introduïts. Això permet utilitzar gens que siguin de diferents espècies, gèneres i regnes, de manera que s'eliminen les barreres d'incompatibilitat sexual i de fertilitat. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)

La transformació de plantes utilitza una àmplia varietat d'eines mitjançant les quals és possible la introducció d'informació genètica forana. A més, ho fa sense afectar les qualitats agronòmiques i de màrqueting dels cultius, de manera que la transformació de plantes s'ha definit com la incorporació estable de gens forans i la seva expressió a les plantes transformades.

Per tant, el principal avantatge de l'enginyeria genètica és que no implica la transferència de centenars de milers de gens, alguns amb característiques no desitjades, sinó que involucra el traspàs d'un o pocs gens que confereixen la característica d'interès. És a dir, que és concisa, precisa i exacta. Per això, l'enginyeria genètica de plantes comprèn una sèrie de tècniques complementàries amb els procediments de la millora genètica convencional. (Vasil, 2008)

Des de 1983, quan es va reportar per primera vegada la producció d'una planta transgènica, s'ha assolit la transformació de més de 120 espècies i 35 diferents famílies vegetals. Això no significa que el procés sigui senzill. Contràriament, és un procés que involucra diverses etapes, com ara la identificació i aïllament del gen d'interès, el desenvolupament d'expressió, vectors apropiats que permetin el clonatge o la transferència de la construcció, un mètode per a la introducció de el DNA de manera estable en el genoma de la cèl·lula vegetal, un sistema de cultiu de teixits que permeti la regeneració completa de les plantes, un procediment per a la distinció dels individus transformats dels que no són transgènics i, finalment, mètodes analítics per a la detecció del gen introduït i els resultats en la planta després de la transformació.

Per tant, resumidament, per a la obtenció d'una planta transgènica han d'ocórrer tres processos indispensables en la mateixa cèl·lula: la transferència del casset d'expressió a l'interior de la cèl·lula; la integració del casset d'expressió al DNA cel·lular i l'òptima regeneració de la planta. (Jauhar, 2006)

Els mètodes de transformació utilitzats en l'actualitat es basen en l'obtenció de cèl·lules transgèniques i en la posterior recuperació de les plantes completes i fèrtils. Això es fa mitjançant el cultiu de teixits i la selecció *in vitro*. Un cop s'aconsegueix la regeneració de les plantes transgèniques a partir de cèl·lules transformades, s'ha de realitzar la verificació del seu estatus transgènic amb tècniques moleculars com la PCR (per determinar la inserció del transgen), l'RT-PCR (per verificar l'òptima transcripció) o l'ELISA (per detectar la codificació de la proteïna). (Danilova, 2007)

L'origen dels segments gènics que componen el casset d'expressió és sovint indiferent, pot correspondre a fonts biològiques molt diverses. El casset d'expressió s'ha de transportar necessàriament a través d'un vector que en permeti la clonació i transferència. Això es realitza mitjançant els mètodes de transformació. Els vectors més utilitzats en la transformació de plantes solen ser els plasmidis, el funcionament dels quals s'explica en el subapartat de "transgènesi amb bacteris". (Vasil, 2008)

En tots els casos, és essencial disposar d'un gen d'interès, el qual s'insereix a l'organisme del vegetal. Ha de complir alguns requisits, com ara la disposició d'una **regió promotora**, la qual permet el reconeixement del lloc d'unió de la DNA i, per tant, l'inici de la transcripció gènica en RNAm, i una **regió terminadora**, la qual dona la senyal de finalització de la transcripció, i s'encarrega de mantenir l'estabilitat del RNAm durant el seu transport al citoplasma per a la seva posterior traducció en una molècula proteica. La construcció esmentada de regió promotora, regió codificant (gen d'interès) i regió terminadora és coneguda, en conjunt, com a casset d'expressió.

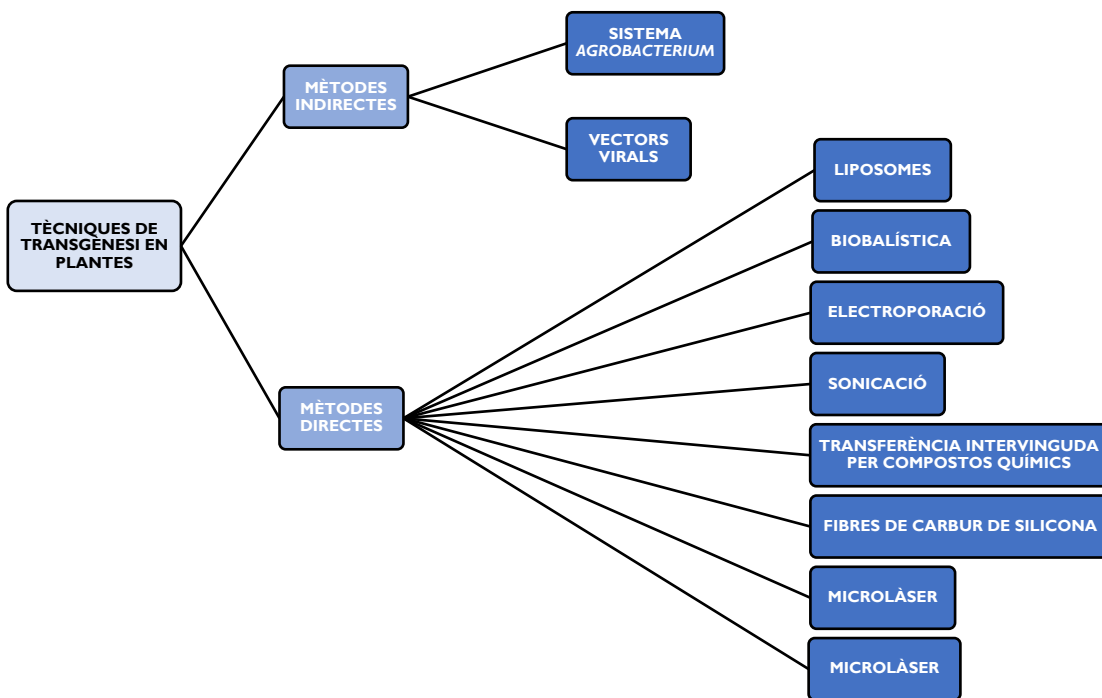
L'obtenció de plantes transgèniques ha permès el desenvolupament de noves varietats de plantes, les quals són cultivades amb característiques concretes i designades, com és ara la resistència a factors biòtics i abiòtics, l'augment de la seva qualitat i uns rendiments més elevats. A més, s'ha corroborat la possibilitat i relació de les plantes transgèniques amb la producció de vacunes i altres substàncies de finalitat terapèutica, com també per a l'obtenció de matèries primeres d'ús industrial, com els plàstics biodegradables. Per això, les plantes transgèniques tenen un alt potencial i una àmplia aplicabilitat, no només en agricultura sinó en la indústria en general. (Sharma et al., 2002)

Per a poder obtenir i generar plantes transgèniques, s'han desenvolupat diversos mètodes al llarg dels últims anys, en què la transgènesi ha adquirit el seu punt àlgid, amb el propòsit d'augmentar l'eficiència de la transferència de DNA cap a cèl·lules o teixits vegetals. Tot i que tinguin el mateix objectiu, la modificació genètica es pot dur a terme a través de diverses tècniques, que es classifiquen en **indirectes** i **directes** d'acord amb el tipus de mecanisme utilitzat per a la transferència del material genètic cap a la cèl·lula vegetal. (Babu et al., 2003)

Els **mètodes indirectes** es basen en la utilització de vectors biològics i empen les seves pròpies característiques naturals de patogenicitat en plantes. Així, es pot produir la introducció dels gens d'interès al genoma vegetal i, entre els diversos sistemes de transformació, se'n destaca l'ús del bacteri *Agrobacterium tumefaciens* i l'ús de virus.

En canvi, degut a les dificultats que causa la transformació de plantes monocotiledònies (d'un sol cotiledó, el conjunt de fulles embrionàries de la planta en germinació) mitjançant els bacteris com l'*Agrobacterium*, s'han desenvolupat diversos sistemes de transferència de gens, els **mètodes directes**, en els quals s'empren procediments de naturalesa química, fisicoquímica i mecànica, els quals es basen en les tècniques físiques usades en la transformació de cèl·lules animals en cultiu.

Cal tenir en compte, però, que alguns procediments com la cisgènesi, la qual consisteix en la introducció de gens amb els seus promotors nadius aïllats des de la planta conreada en ella mateixa, no és considerada un mètode de transformació genètica, sinó una de les formes d'enginyeria genètica de plantes. Per això, la cisgènesi pot usar qualsevol dels mètodes redactats a continuació. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)



Esquema de les tècniques de transgènesi en plantes que es redacten a continuació.

2.1.2.1. Mètodes indirectes

2.1.2.1.1. SISTEMA AGROBACTERIUM

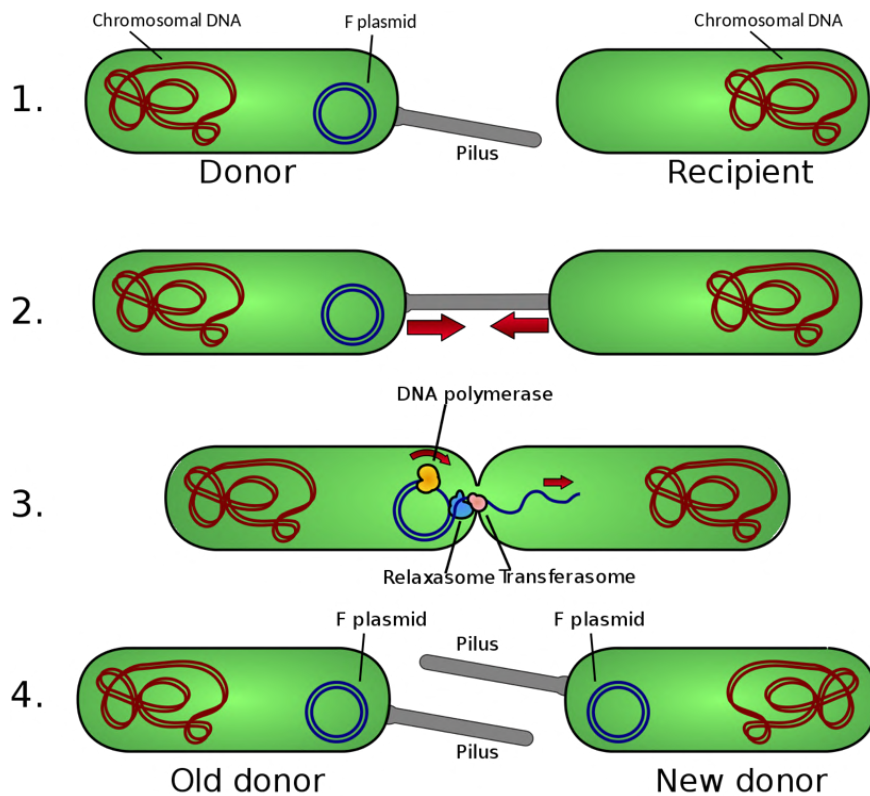
Un dels procediments més efectius i utilitzats és el “sistema *Agrobacterium*”. Degut a l'enorme capacitat del bacteri per a infectar diversos organismes vegetals, va sorgir la idea d'utilitzar l'*Agrobacterium* com a mediador o vector per a la introducció dels gens d'interès en plantes. El sistema en qüestió va ser el primer sistema de transferència de gens que va ser capaç de produir una planta modificada genèticament el 1983. Alhora, es va descobrir la transferència de gens bacterians a plantes i l'intercanvi entre espècies vegetals.

Per tant, la infecció per *Agrobacterium* en una planta és el resultat d'un procés evolutiu d'alta especialització, concretament anomenat “transferència horitzontal de gens des de bacteris cap a plantes”. Del procés, cal saber-ne que el segment de DNA que es transfereix rep el nom de “regió DNAt” o “DNA de transferència”, el qual es troba en el plasmidi resident del bacteri anomenat plasmidi Ti o inductor de tumors. La regió conté gens que codifiquen per a la biosíntesi de fitohormones i carbohidrats únicament metabolitzables pel bacteri. Per això, cal que es produeixi una transferència efectiva de la regió. Per a afavorir-ho, és necessària l'expressió dels "gens Vir", els quals es troben en la regió Vir o regió de virulència, la qual també es troba en el plasmidi. (Gelvin, 2000)



Laboratoris del MónNatura Pirineus proporcionats per La Pedrera i el programa Joves i Ciència el 2021. Mètode: Agrobacterium per agroinfecció amb xeringa sense agulla.

El procés en qüestió s'inicia quan es produeixen ferides en les cèl·lules de la planta i s'alliberen a l'ambient, entre d'altres, compostos fenòlics (compostos amb grups hidroxil i anells aromàtics) i monosacàrids, els quals són reconeguts per *Agrobacterium*, induint una unió entre el bacteri i les cèl·lules vegetals. Les diferents variables, concretament els compostos fenòlics, els monosacàrids i algunes condicions com la del pH, la qual presenta el medi circumdant, són importants per a l'activació del sistema de regulació, el qual inicia la transcripció del *Vir*. Seguidament, la creació o codificació de proteïnes *Vir*, de les quals en destaquen la *VirD1* i la *VirD2* permet la síntesi del DNA_t. Concretament, la proteïna *VirD2* s'uneix mitjançant un enllaç covalent a l'extrem 5' del DNA_t, mentre altres proteïnes *Vir* cobreixen el DNA_t. Finalment, es produeix la translocació del complex a les cèl·lules vegetals mitjançant un sistema de secreció que està constituït per un tipus de flagel molt petit anomenat pili, el qual es troba sovint en bacteris i arqueobacteris, i un canal de secreció. Les proteïnes *Vir* s'encarreguen, també, de regular i crear el sistema de secreció. El pili compleix la funció de vincle entre medis, de manera que permet la transmissió entre el donant i el receptor per a obtenir ambdós la informació continguda en el plasmidi. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)

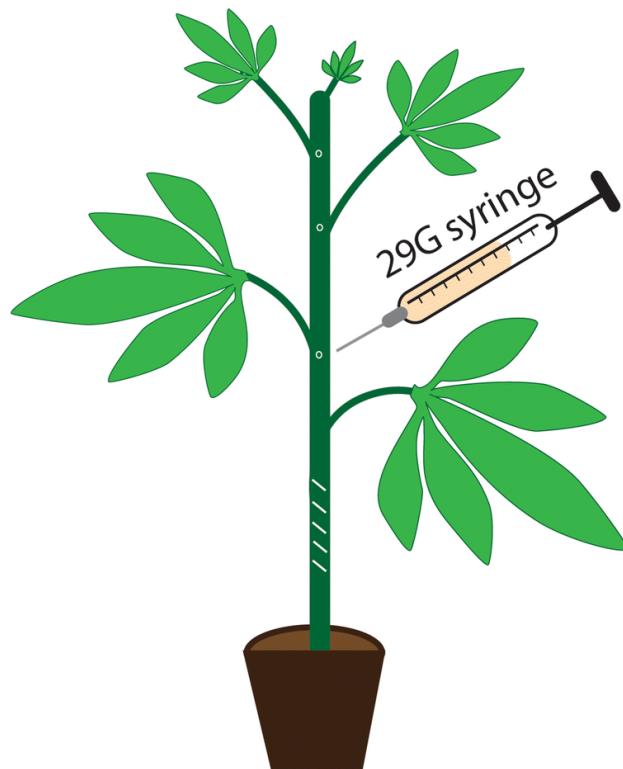


Transmissió entre dos bacteris.

Un cop el DNAt arriba a la cèl·lula vegetal, les proteïnes VirE2 i VirD2 contribueixen a l'adreçament de la DNAt cap al nucli i a la posterior integració en el genoma vegetal.

Cal anotar que, durant tot el procés d'infecció d'*Agrobacterium*, hi ha una contínua interacció amb les proteïnes i sistemes propis de la cèl·lula vegetal a ser infectada, de manera que s'homogeneïtza el procediment d'integració. (Kohli et al., 2003)

- ① *Agrobacterium* inoculum preparation (days #1-5)
- ② Agroinoculation (day #5)



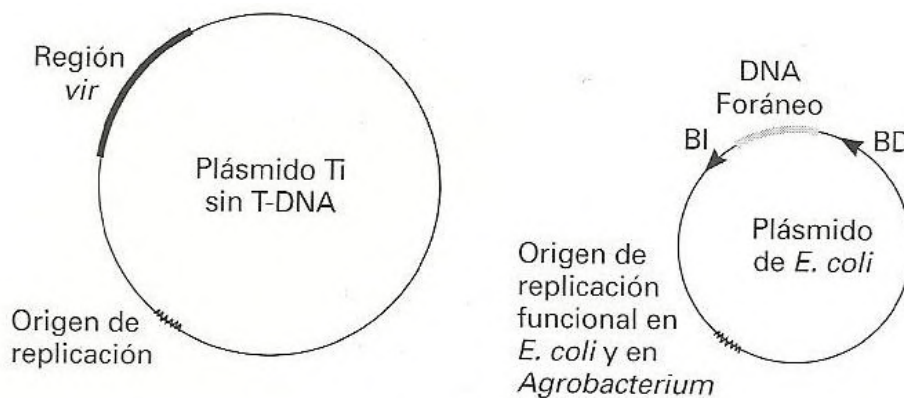
- ③ Post-agroinfection recovery (days #5-9)
- ④ Appearance of symptoms (3-4 weeks after day #9)
- ⑤ Phenotype evaluation

Representació de la transgènesi amb el mètode *Agrobacterium* (Lentz et al., 2018)

Per utilitzar el sistema de transformació mediat per *Agrobacterium*, es requereix de variants en què el DNAt hagi estat eliminat, les quals es produeixen modificant el plasmidi Ti mitjançant un procés de recombinació, que permet treure els gens responsables de la formació de tumors a la planta, denominats **ONC** (oncogens). Seguidament, s'introdueix un plasmidi forà a la soca d'*Agrobacterium* que es vol neutralitzar o desarmar. El plasmidi contindrà regions d'homologia amb el DNAt i un gen per a resistència a antibiòtics. Un cop es produeix la recombinació entre el plasmidi Ti i el forà, s'elimina el DNAt i s'introdueix en el plasmidi Ti el gen per a resistència a antibiòtics per a identificar el bacteri "buit" i el forà s'extreu.

En distingeixen dos tipus de vectors *Agrobacterium*: els de co-integració (sistemes en cis) i els binaris (sistemes en trans).

Els vectors **co-integrats** són el resultat de la integració d'un plasmidi forà d'una mida reduïda al plasmidi Ti de la soca desarmada d'*Agrobacterium* mitjançant un procés de recombinació i d'entrecreuament de regions homòlogues dels dos plasmidis. Conseqüentment, s'obté un únic plasmidi.

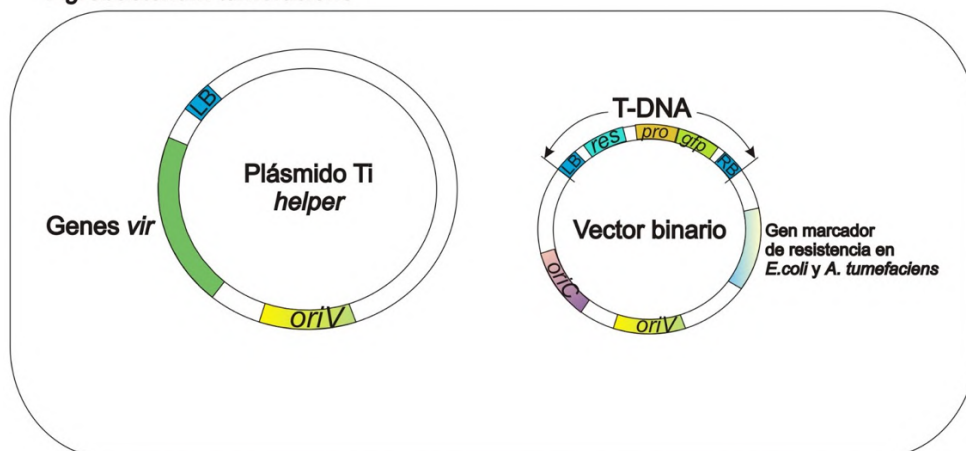


Vector binario de transformación genética con *Agrobacterium*. BD: borde derecho, BI: borde izquierdo

Representació estructural del plasmidi

En canvi, els **vectors binaris** són més emprats i provenen de plasmidis que es repliquen en *E. coli* i en *A. Tumefaciens*, els quals no requereixen la integració en el plasmidi Ti i es mantenen independentment dins de la cèl·lula bacteriana. L'estratègia és diferent i consisteix en la dualitat de plasmidis en el bacteri. Un dels dos, per tant, és el vector binari, el qual té la informació genètica en DNAt del casset d'expressió o gens d'interès. El plasmidi resident, en canvi, conté els gens "Vir", els quals intervenen en optimitzar la transferència del casset d'expressió cap a les cèl·lules vegetals. (Hellens R & Philip M, 2000)

Agrobacterium tumefaciens



Representació del plasmidi del mètode *Agrobacterium*

La transformació, intervinguda per *Agrobacterium*, requereix d'un període de co-cultiu, en el qual la soca d'*Agrobacterium*, que conté el vector amb els gens d'interès, és posada en contacte amb el teixit vegetal a transformar.

Així, es pot realitzar la transferència de DNA a algunes de les cèl·lules vegetals que es mostren exposades a la infecció. S'usen diversos tipus de teixit vegetal en funció de les seves característiques. Normalment, es valora la capacitat de regeneració i de manipulació. És important esmentar que el co-cultiu s'ha de realitzar en un medi que sigui apropiat i que afavoreixi la transformació.

Després del co-cultiu, el teixit vegetal és transferit a un mitjà de cultiu de teixits vegetals que propiciï la regeneració, la qual consisteix en l'obtenció d'una planta completa a partir d'una cèl·lula vegetal. Per a que es regeneri una planta completa, és essencial que s'adhereixin diverses hormones vegetals o reguladors de creixement al mitjà de cultiu, és a dir, que hi hagi presència molecular de creixement positiu. Un exemple són les citocinines, unes fitohormones que s'encarreguen de promoure la divisió cel·lular i d'induir la formació d'òrgans. (Leiser et al., 1992)

Resumidament, el factor fonamental per a la regeneració és el balanç adequat dels reguladors de creixement, però cal assegurar-se que les condicions de llum i de temperatura a què es sotmet l'individu són òptimes. També és necessari que els medis continguin antibiòtic per a afavorir l'eliminació de l'*Agrobacterium* deguda la seva inutilitat al punt en què es troba. (Bhat & Srinivasan, 2002)

Com s'ha explicat anteriorment, els **avantatges** que posseeix el sistema *Agrobacterium* en comparació d'altres sistemes el converteixen en el més emprat en la producció de plantes transgèniques. Els principals beneficis que proporciona l'ús del mètode són la simplicitat tècnica dels protocols (no requereix la

disposició d'equips altament sotificats), l'elevada versatilitat d'emprament en diferents tipus de teixits vegetals, la notable precisió d'integració del DNAt, l'excel·lent definició en la transferència de la regió de DNA, la improbabilitat d'error i la possibilitat d'introduir segments llargs de DNA, entre d'altres. (Hansen G & Wright M, 1999)

Simultàniament, el sistema *Agrobacterium* mostra alguns inconvenients. Els **desavantatges** més reportats són l'essencialitat de ferir el teixit infectat, la limitació que ofereix el sistema per estar específicament dissenyat per la infecció nuclear i la necessitat d'ús d'antibiòtics per l'eliminació del bacteri dels teixits infectats, entre d'altres.

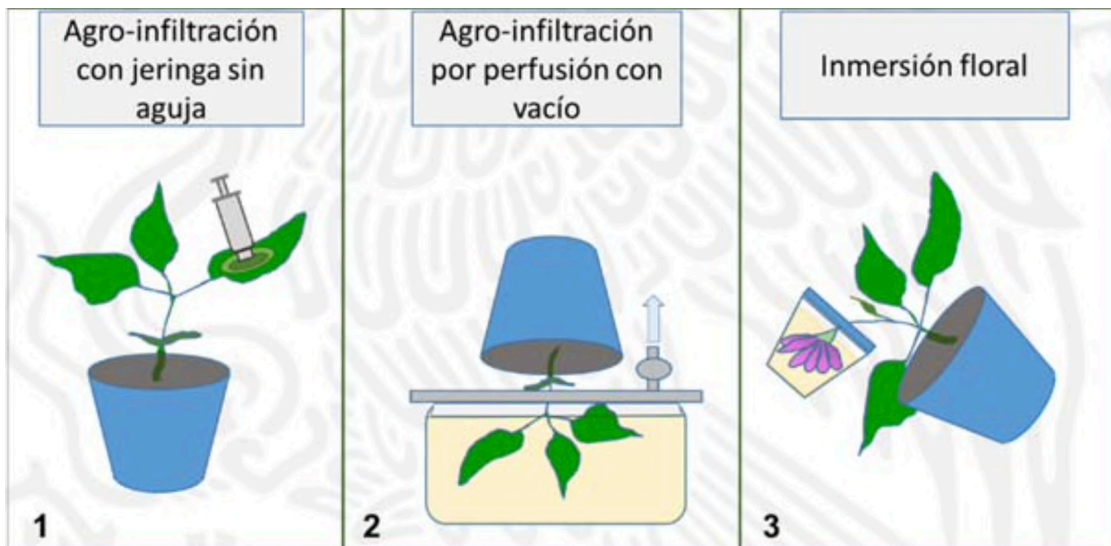
No obstant, gran part de les deficiències han estat resoltes amb la posterior implementació de tècniques i procediments. (Babu et al., 2003)

El temps i el desenvolupament de noves tècniques ha portat al propòsit de millorar el sistema *Agrobacterium*.

S'ha proposat la seva combinació amb altres tècniques de transformació, com és l'**Agroinfiltració**, la qual combina el sistema *Agrobacterium* amb l'aplicació de buit.

Mentre el teixit es troba submergit en una solució concentrada d'*Agrobacterium*, es produeixen ferides, les quals faciliten i incrementen la infecció.

Bàsicament, el que s'aconsegueix el mètode és la infecció del teixit floral femení, a partir del qual s'han obtingut llavors transgèniques.



Representació del mètode Agroinfiltració (CIBIOGEM, 2018)

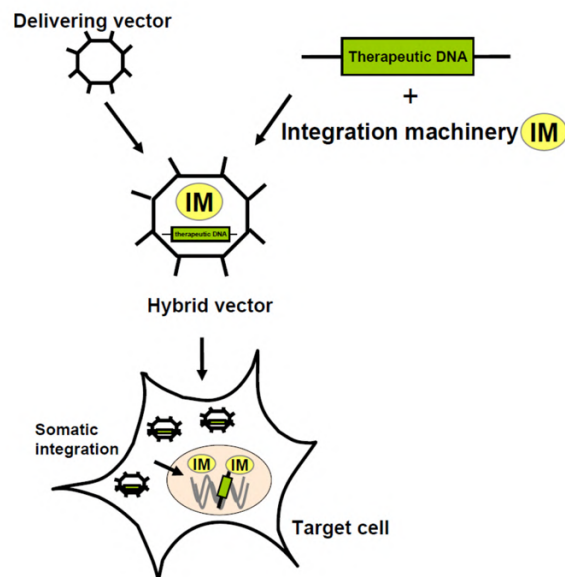
El SAAT o "transformació intervinguda per *Agrobacterium* assistida amb sonicació" és un altre mètode en el qual es combina el sistema *Agrobacterium* amb ultrasò. El sistema en qüestió comporta el sotmetiment del teixit a transformar a períodes breus d'ultrasons, ocasionant petites fissures o ferides en el teixit vegetal, les quals faciliten la infecció per *Agrobacterium*. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)

2.1.2.1.2. VECTORS VIRALS

Els vectors virals són un sistema de transgènesi usats en molts organismes. Per això, els vectors virals aplicats a la transgènesi en plantes mostren similituds amb la seva aplicació en animals, la qual ha sigut explicitada anteriorment.

Els virus emprats com a vectors per a la transformació de plantes són els que afecten les plantes. L'entrada del patogen es realitza amb l'objectiu de produir proteïnes d'interès, en altres paraules, per l'expressió transitòria de gens forans. El procés es realitza mitjançant la replicació dels virus en les plantes, en què els virus han d'haver estat modificats genèticament per a aportar-los la capacitat de transportació del gen d'interès a l'interior de la cèl·lula vegetal.

Els vectors virals que han resultat ser més efectius han estat el *Geminiviridae* i *Caulimoviridae*. L'optimització del procés amb els virus esmentats ve donada per la composició del seu material genètic, el qual es troba expressat en DNA i, per tant, es poden clonar directament. Per exemple, amb el virus del mosaic de coliflor s'ha aconseguit la transferència de gens amb resistència a antibiòtics. De manera diferent, els virus RNA també s'han emprat com a vectors virals. No obstant, han de ser clonats com DNAC (complementari), i els més emprats són el del mosaic de l'ordi i el virus del mosaic del tabac.



Representació del funcionament del vector viral en la transgènesi en plantes (Müther et al., 2009)

A grans trets, s'han desenvolupat dues estratègies per a la construcció de vectors virals.

La primera és la més emprada i implica la introducció completa del gen forà dins el virus. Generalment, va precedida pel promotor duplicat de la proteïna de la càpsida del virus perquè el gen d'interès sigui expressat com un RNA aliè, per separat.

La segona estratègia ha estat recentment desenvolupada. Consisteix en la completa reconstrucció del virus eliminant o substituint regions virals. Alhora, s'insereix el gen d'interès. (Gleba et al., 2004)

Hi ha un altre sistema de transformació que resulta de la combinació de les característiques dels vectors vírics i del sistema *Agrobacterium*. El mètode en qüestió s'anomena **Agroinfecció**. En la metodologia, s'empra el sistema de transferència del DNA de l'*Agrobacterium* per a infectar cèl·lules vegetals amb vectors virals. El vector viral és introduït en el DNA, el qual és transferit a les cèl·lules pel procés normal d'infecció, intervinguda per *Agrobacterium*. El sistema és emprat quan els vectors virals provenen de virus que no són transmissibles mecànicament. (Danilova, 2007)

Els vectors virals en la transgènesi de plantes mostren diversos **avantatges**, com ara la facilitat en la infecció, la grandària del rang d'hostes, els elevats nivells de producció de proteïnes, l'escampament dels gens transmesos per tota la planta i la gran velocitat d'expressió, entre d'altres. Tot i els beneficis, hi ha diverses limitacions i **desavantatges** rellevants, com ara la disminució de la mida del gen d'interès per a no afectar la infectivitat, l'aparició de símptomes específics de malaltia, la possible letalitat per a la planta hoste, l'alta freqüència d'errors durant la síntesi de l'ARN vírica que pot resultar en l'expressió incorrecta el gen introduït, la manca d'integració en el genoma vegetal i, conseqüentment, la impossible transferència directa a la descendència del gen d'interès, entre d'altres. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)

2.1.2.2. Mètodes directes

Els mètodes directes són, normalment, menys recurrents o bé s'usen per a acompanyar o complementar-ne d'altres. Per això, s'expliquen a continuació de manera breu.

2.1.2.2.1. LIPOSOMES

Els liposomes, també coneguts com vesícules lipídiques, es troben conformats per diverses bicapes lipídiques que encapsulen aigua o gas. A més, posseeixen diàmetres microscòpics, amb diferents formes i mides. La seva composició pot estar basada o bé en fosfolípids, fosfatidiletanolamina, àcids grassos o cations bivalents.

Els liposomes tendeixen a vincular-se amb cèl·lules i teixits interactuant amb ells per absorció, fusió o intercanvi lipídic, una característica molt similar que presenten les membranes biològiques, amb una tendència natural.

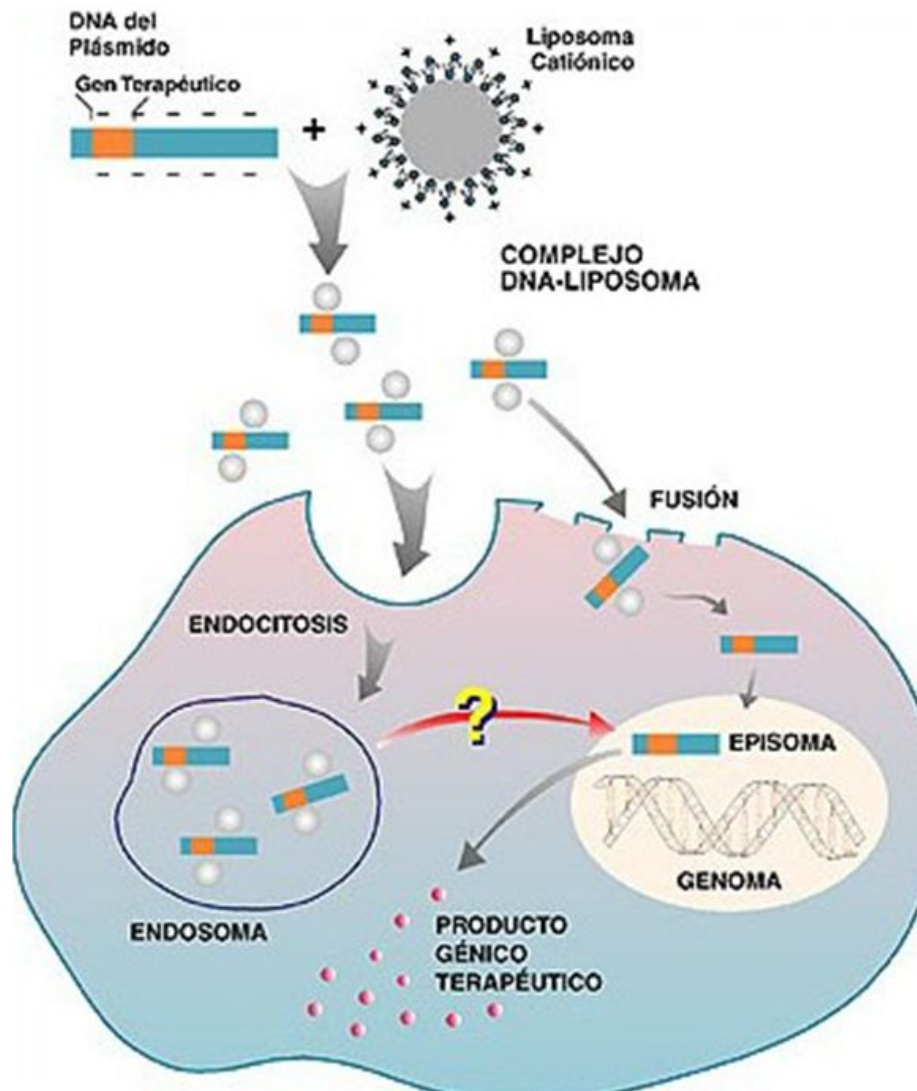
Hi ha diversos procediments de transgènesi amb liposomes. Entre els mètodes per a la transformació vegetal, l'ús de liposomes és un dels més difícils i, per això, el seu ús és molt limitat, tot i que es va mostrar eficaç al principi. El mètode en qüestió comporta que el casset d'expressió sigui encapsulat en una esfera lipídica, el liposoma, el qual permetrà o facilitarà el seu pas, a través de la cèl·lula vegetal per endocitosi. El pas pot ser o bé pel plasmodesma o directament per la paret cel·lular, fins al nucli. (Morigaki & Walde, 2007)

El mètode mostra tant avantatges com desavantatges.

La transferència mitjans per liposomes posseeixen alguns **beneficis**, com ara la protecció contra la degradació per nucleases, la capacitat de portar fragments molt grans de DNA, la biocompatibilitat amb membranes i l'autosuficiència de la seva estructura per a portar el DNA.

En canvi, s'han reportat diversos problemes, com ara una freqüència de transformació molt baixa, la inserció de l'ADN en tàndem, l'essencialitat de preparació dels liposomes i l'encapsulació del material genètic a transferir. Els inconvenients s'han pogut resoldre de manera parcial quan s'han implementat tècniques innovadores i amb l'ús de compostos i substàncies diferents per a la preparació dels liposomes. s'han solucionat parcialment amb la implementació de noves tècniques i la utilització de nous compostos, per a la preparació de liposomes.

No obstant, els problemes que presenta el mètode no l'han previngut de estar ben establert en la producció de plantes transgèniques gràcies a la fusió de liposomes que contenen ADN amb protoplasts. Tot i això, amb menys freqüència, es dona la fusió dels liposomes amb teixits i cèl·lules vegetals intactes. L'eficàcia augmenta quan es combina el procediment amb altres tècniques, com ara l'electroporació, la qual es redacta en els següents apartats. (Vasil, 2008)



Representació del funcionament dels liposomes en la transgènesi

2.1.2.2. BIOBALÍSTICA

El terme “biolística” és el resultat de la unió de “biologia” i “balística”. El mètode va ser ideat i refinat en la dècada de 1980 i introduït el 1987. La tècnica consisteix en la utilització de microprojectils recoberts del DNA forà que es vol transferir a l'individu. Els projectils són disparats sobre els teixits vegetals a velocitats molt elevades, de manera que aconseguen travessar la paret i la membrana cel·lular. Seguidament, porten a l'interior de la cèl·lula els gens d'interès o casset d'expressió. Finalment, s'integra el DNA en el genoma vegetal. (Vasil, 2008)

El sistema de transformació requereix d'un dispositiu mecànic que permeti realitzar el bombardeig dels teixits vegetals, usualment referit com a canó. Perquè els microprojectils siguin capaços de travessar les membranes cel·lulars i arribar al nucli de les cèl·lules, l'impuls ha de ser propi de velocitats supersòniques.

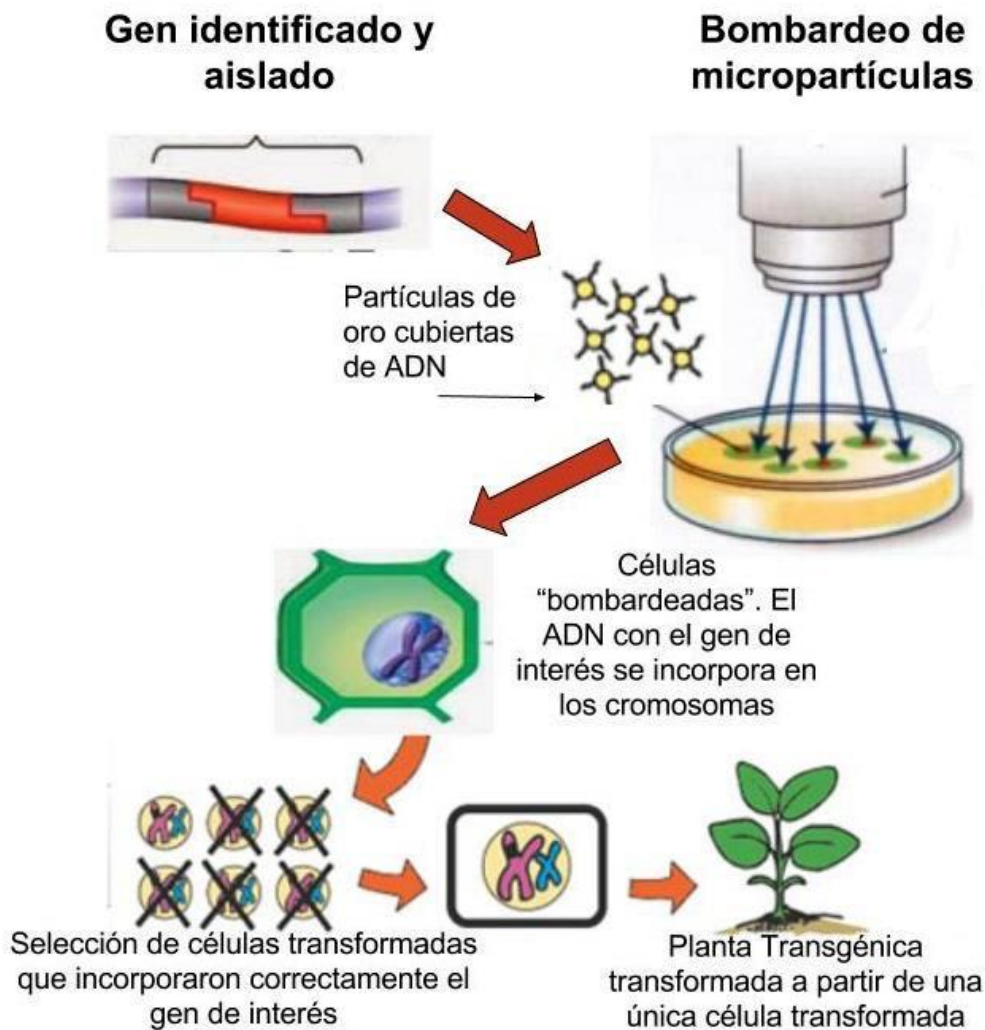
Per això, s'han desenvolupat diversos sistemes de biobalística: per explosió de pólvora seca, per variació de força d'acceleració, a través de descàrrega elèctrica i per l'alliberament de gas comprimit a alta pressió, concretament aire, He, CO₂ o N₂.

El casset d'expressió que conté els gens d'interès pot anar o no en un vector. Això és degut a que no es requereix la seva presència per al procés de transformació. El casset d'expressió s'adhereix als microprojectils i, per això, s'han dissenyat diverses metodologies. Els projectils emprats són partícules que es caracteritzen per ser aproximadament esfèriques (microesferes), formades per materials densos (or, tungstè) i de diàmetres variats. (Sharma et al., 2002)

Concretament, el mecanisme de tret es basa en una pistola que dispara les partícules a més de 400m·s⁻¹ sobre el teixit. L'elevada velocitat permet la penetració sense la destrucció de la membrana cel·lular. Tot el sistema funciona en un buit moderat per evitar el fregament amb l'aire. Les condicions a què s'exposen són suportades temporalment per les cèl·lules vegetals.

Un cop s'ha realitzat el bombardeig, el DNA es desprèn dels projectils a causa de les modificacions de l'entorn iònic, que interacciona i permet l'alliberament del material genètic. En funció de la localització dels microprojectils en la cèl·lula, el DNA es pot integrar de forma estable a nucli, als cloroplasts o als mitocondris de les cèl·lules vegetals. L'endinsament del material genètic, en tots els casos, es farà mitjançant una recombinació a l'atzar.

Finalment, els teixits són col·locats de nou de manera adequada. Així, la planta pot regenerar-se gràcies a les tècniques de cultiu. Cal destacar que els teixits vegetals són sotmesos a un tractament osmòtic previ i de bombardeig, de manera que s'evita el dany.



Representació del funcionament de la biobalística en la transgénesi (Ballester, 2016)

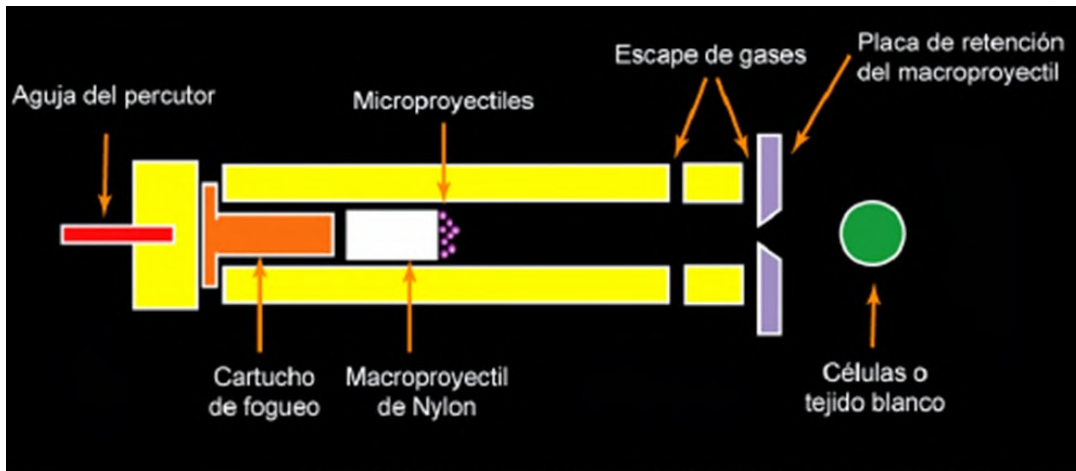
El bombardeig de micropartícules es considera un mecanisme universal per la seva naturalesa física, que permet introduir DNA sense necessitat de vectors especialitzats. A més, es pot realitzar en qualsevol tipus de teixit o cèl·lula, de manera que s'aconsegueix penetrar a capes profundes. Amb un sol tret, es poden produir múltiples integracions. No obstant, el mètode mostra efectivitat tot i la simplicitat de les construccions. Simplement s'inclouen els gens d'interès i de selecció amb les seves seqüències reguladores respectives, les quals poden anar incloses en plasmidis o en forma de molècula lineal. (Sanford, 1999)

Inicialment, es va proposar la tècnica amb la finalitat d'introduir material genètic al genoma nuclear de plantes, però recentment ha estat usada també per a la transformació de bacteris, protozous, fongs, algues,

insectes, teixits animals i plantes *in vivo*. No obstant, és l'únic mètode que permet transformar orgànuls cel·lulars.

El sistema presenta diversos **desavantatges**, com ara un percentatge d'èxit variable, el freqüent silenciament gènic, la probable inestabilitat en la introducció d'un transgen, el malmetement dels teixits i l'elevat cost.

Com passa en altres mètodes, hi ha un sistema de transformació que ha sorgit a partir de la integració de les característiques de la biobalística amb el sistema *Agrobacterium*, el qual ha sigut explicat en apartats anterior. El resultat rep el nom de **biolística** o **agrolística**, en què la biobalística és usada per la creació de danys en el teixit vegetal amb els microprojectils sense DNA. Posteriorment, s'empra el sistema *Agrobacterium* per a la transmissió gènica. (Sharma et al., 2002)



Representació del funcionament de la biobalística i els microprojectils

2.1.2.2.3. ELECTROPORACIÓ

La següent metodologia que s'explica és l'electroporació, amb la qual s'intenta aconseguir la permeabilització de la membrana mitjançant l'augment significatiu de la conductivitat elèctrica. Això s'aconsegueix quan s'afegeix un camp elèctric de manera externa que pugui proporcionar l'energia necessària pel procés.

Concretament, el procediment inicia amb la desestabilització de la membrana, de manera que, temporalment, es creen porus reversibles. A través d'ells, és possible el pas d'elements diversos, com ara macromolècules, ions, metabòlits i DNA. (Gelvin, 2000)

Al llarg del procés, les cèl·lules reben impulsos elèctrics que estan controlats per alt voltatge i polsos curts de durada instantània.

S'usen camps d'entre els 200V/cm fins als 600V/cm. Un cop la membrana plasmàtica és travessada pel voltatge, excedeix la seva rigidesa dielèctrica, la qual és la resistència que oposen els materials quan es transmet l'electricitat, de manera que s'originen una mena de porus a la membrana.

En cas que la durada d'exposició al camp elèctric i la seva força siguin les adequades, els porus que es formen pel pols elèctric es clausuren després d'un període breu temporal, al llarg del qual els compostos extracel·lulars han pogut endinsar-se a l'interior cel·lular. Malgrat això, l'excessiva exposició a camps elèctrics sol ocasionar a la membrana danys irreversibles a les membranes. Les ferides, en alguns casos, causen la mort de la cèl·lula. (Weaver & Chizmadzhev, 1996)

L'efectivitat del procés d'electroporació és aproximadament deu vegades major que la transformació intervinguda per mètodes químics, el mètode que s'explica en apartats posteriors.

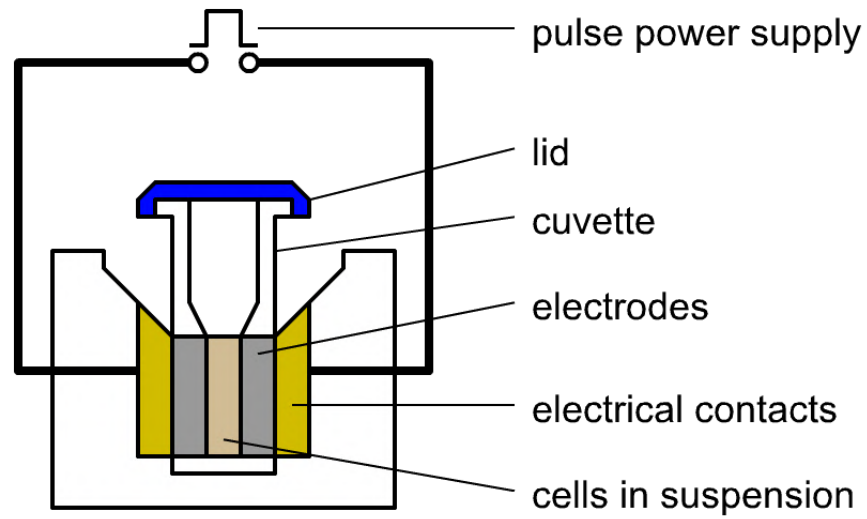
El principal **avantatge** del mètode és la seva simplicitat relativa.

En canvi, la **limitació** que presenta per a la transformació de plantes és la necessitat d'emprar protoplasts, les quals són cèl·lules sense paret. Sense els protoplasts, no es pot dur a terme a la membrana plasmàtica la permeabilització.

Per a poder dur a terme el mètode, es requereix un dispositiu anomenat electroporador, el qual desprèn descàrregues de condensadors per produir polsos d'alt voltatge.

Així, s'origina un corrent elèctric que, mitjançant la suspensió, passa a través de les cèl·lules a què desitja permeabilitzar.

Així, la membrana cel·lular permet i facilita l'entrada de DNA forà contingut en un plasmidi o en forma de molècula lineal, amb el qual es pretén transformar les cèl·lules. (C. Chen et al., 2006)



Representació del funcionament de l'electroporació

2.1.2.2.4. SONICACIÓ

La sonicació és un mètode relativament recent de transferència de gens. És utilitzat principalment amb èxit en la transformació de teixits vegetals, cèl·lules intactes i protoplasts.

Concretament, s'empra ultrasò amb freqüències superiors a 20KHz. Conseqüentment, gràcies a la inducció de porus transitoris, es genera permeabilitat a les membranes. Seguidament, a través dels porus creats, el DNA forà pot ingressar a l'interior de la cèl·lula vegetal.

El fenomen és conegut també com sonoporació. (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)

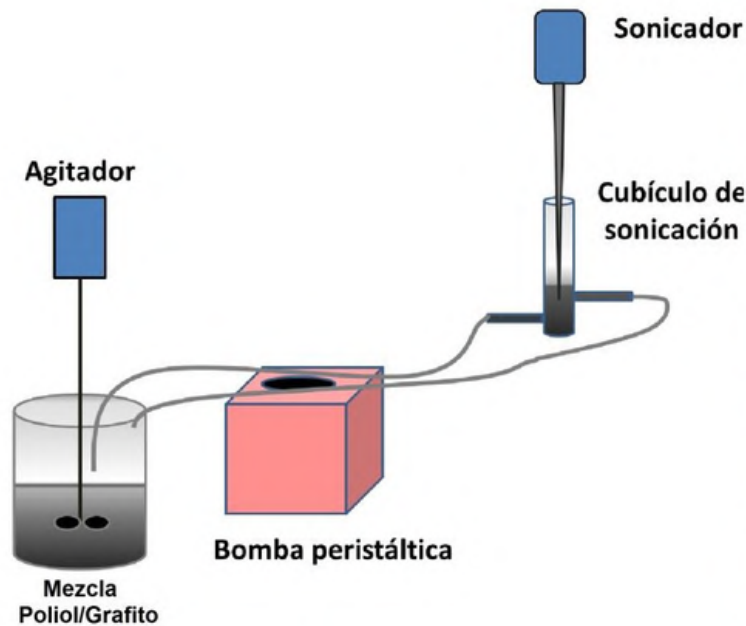
Per a poder dur a terme el procediment, és necessari el dispositiu emprat per a la producció dels polsos d'ultrasò, anomenat sonicador.



Representació de l'aparell usat en la sonicació, el sonicador

El mecanisme que es duu a terme per tal de produir la permeabilització de les membranes per l'acció d'ultrasò és pot precís. De fet, es creu que el major efecte de la sonicació és degut a la cavitació acústica, la qual, per mitjà d'un mitjà líquid en repòs, pot produir-la. Particularment, les condicions necessàries són a baixes energies acústiques.

A causa de la sonicació, hi ha una producció constant de bombolles, les quals mostren un creixement positiu i incessant. La seva grandària oscil·la veloçment, de manera que col·lapsen i ocasionen ones de xoc d'alta intensitat, produint danys severos en la superfície d'objectes sòlids propers. (Mehier-Humbert et al., 2005)



Representació del funcionament del sonicador i la sonicació (Fernández-d'Arias et al., 2014)

Cal tenir en compte que, com tots els mètodes, hi ha efectes secundaris. En el cas de la sonicació, els efectes fisicoquímics que el procés pot ocasionar a les cèl·lules vegetals són la formació de radicals lliures, diversos danys a la paret cel·lular, constants alteracions en la permeabilitat de la membrana, mutacions cromosòmiques i canvis fisiològics sobtats.

Gràcies a la sonicació s'ha aconseguit introduir DNA forà de manera eficient. A més, la versatilitat que ofereix com a objectes d'estudi la converteix en una tècnica potencialment prestigiosa i amb futur. (Babu et al., 2003)

2.1.2.2.5. TRANSFERÈNCIA INTERVINGUDA PER COMPOSTOS QUÍMICS

La transferència intervinguda per compostos químics és una tècnica molt emprada per a la introducció de DNA forà en protoplasts i en cèl·lules intactes.

A grans trets, es basa en l'ús de compostos químics que indueixen permeabilitat a la membrana, és a dir, que causen porus a través dels quals s'introdueix el DNA. Els porus que s'indueixen són transitoris i, per tant, els danys que causa són reversibles, la qual cosa afavoreix el pas del DNA forà i de macromolècules a través de la membrana cap a l'interior de la cèl·lula.

Per això, és necessari que les cèl·lules vegetals siguin tractades amb la substàncies químiques específiques i amb concentracions i condicions preestablertes i estudiades. Alguns dels compostos químics que més s'usen per a la permeabilització són el polietilenglicol (PEG) i el fosfat de calci, entre d'altres.

Sovint s'empra un pH alcalí perquè contribueix al dany de la membrana. A més, s'addicionen ions de calci, els quals faciliten l'entrada del DNA forà a l'interior de la cèl·lula.

Tot i que el sistema de transferència intervinguda per compostos químics presenta diversos desavantatges com ara baixa eficiència, la reduïda reproductibilitat, el requeriment de protoplasts i la toxicitat per a les cèl·lules, és un dels mètodes que s'empren de manera més intensiva gràcies a la seva disponibilitat de material i facilitat de rèplica. (Danilova, 2007)

El compost més emprat és el Polietilenglicol (PEG). Específicament, és un agent de fusió que modifica químicament les membranes quan interacciona amb els fosfolípids i altres biomolècules que componen la membrana cel·lular.

Durant el tractament amb PEG, la membrana de la cèl·lula es deforma a causa de diverses forces de tensió superficial. Les tensions són resultat de les diferències de densitat entre ambdues solucions: la de PEG i la que conté els protoplasts que s'han de transformar i el DNA forà s'ha d'introduir. (Hansen G & Wright M, 1999)

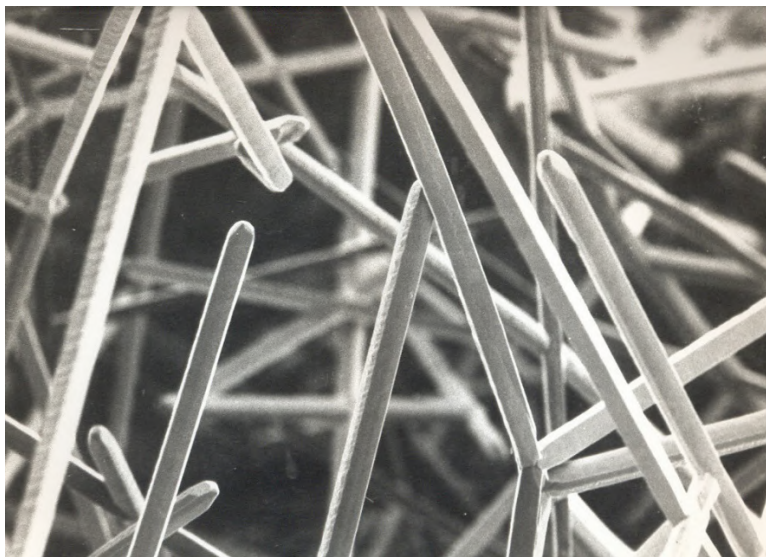
2.1.2.2.6. FIBRES DE CARBUR DE SILICONA

Les fibres de carbur de silicona són una tècnica relativament nova. Per a realitzar-la, es requereixen fibres de carbur de silicona de 10 a 80 micres de longitud, amb un diàmetre de 0,5µm. Seguidament, el DNA forà és introduït en les cèl·lules vegetals mitjançant les fibres a través dels porus ocasionats per la permeabilització.

Els porus causen que les fibres de carbur de silicona actuïn com microagulles ja que és la mida, la forma i la composició química de les fibres de carbur de silicona el que permet la penetració directa a l'interior cel·lular sense ocasionar-li danys greus.

El procediment que es realitza per a la transgènesi amb fibres de carbur de silicona es caracteritza per la seva simplicitat. Resumidament, a causa d'una forta agitació del cultiu cel·lular en suspensió i en presència del DNA plasmídic i les fibres de carbur de silicona, s'aconsegueix, per forces hidrodinàmiques, la penetració del DNA forà i les fibres a les cèl·lules.

És una tècnica breu, efectiva, de cost baix i senzilla, de manera que és recurrent en diversos casos. No obstant, cal l'assaig amb nous materials fibrosos està pendent en la recerca científica ja que s'ha identificat una relació directa entre el material carbur de silicona i la seva toxicitat. (Danilova, 2007)



Representació de les fibres de carbur de silicona

2.1.2.2.7. MICROINJECCIÓ

Dins de la comunitat científica, es considera que la microinjecció és una de les tècniques més concises per a la introducció de DNA forà o de macromolècules a les zones intracel·lulars específiques cel·lulars.

Per a dur a terme la microinjecció, es requereixen microcapil·lars o microagulles de vidre. També són necessaris els sistemes de microscòpia per a poder dipositar el DNA forà a l'interior vegetal.

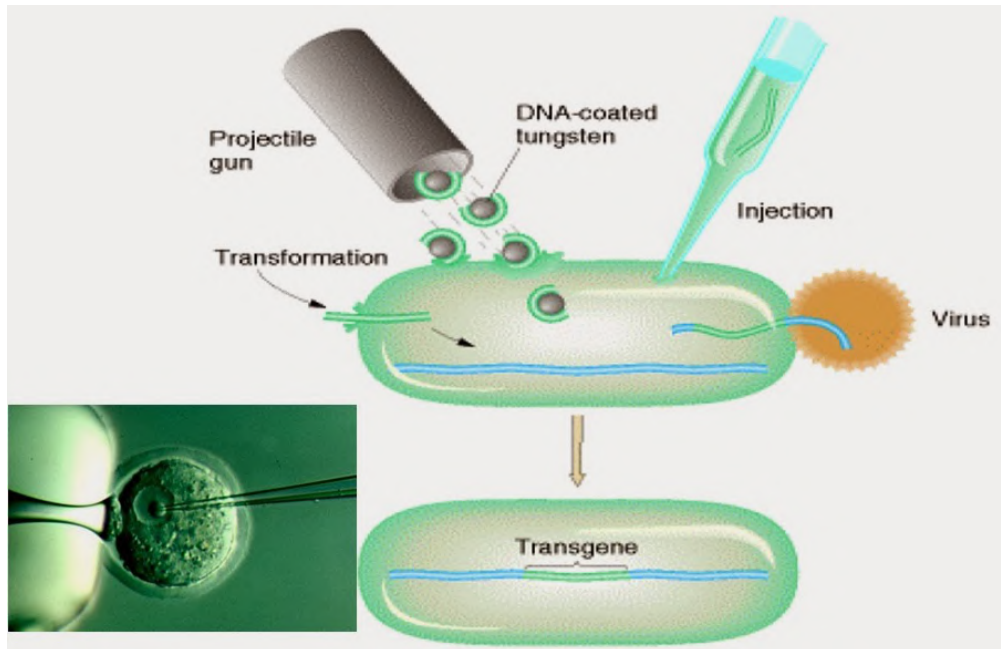
La característica que al DNA nu sigui possible la injecció d'altres elements genètics com els plastidis, els mitocondris o els cromosomes, converteix el mètode en una innovació realment útil per a la transformació de plantes. El material necessari pel procediment és un microscopi i diversos accessoris de guia que permeten realitzar els desplaçaments. El mètode és realment senzill, però els successos interiors són de gran complexitat. (Babu et al., 2003)

Com els altres mètodes, la microinjecció també té avantatges i desavantatges.

Per una banda, el mètode presenta la possibilitat d'optimització de la quantitat de DNA que es descarrega en el medi cel·lular, la llibertat d'elecció sobre la cèl·lula que es vol transformar, una gran precisió a l'hora de descarregar el DNA forà a l'interior cel·lular i la possibilitat de visualitzar cada fase del procediment a vista.

Per altra banda, la microinjecció mostra diversos desavantatges com ara la limitació que causa el fet que només una cèl·lula rebi DNA forà en cada injecció i el requeriment d'experiència i material professional per a dur a terme la tècnica, els quals sovint no es troben a disposició.

Cal remarcar que el mètode a permès certs descobriments i grans avenços que cap altra metodologia ha aconseguit oferir. Per exemple, la microinjecció ha fet possible la implementació en liposomes, de manera que es combinen ambdós mètodes. En els liposomes, es diposita el DNA d'interès o casset d'expressió i, així, la integració del DNA forà és molt més simple. (Sharma et al., 2002)



Representació del funcionament de la microinjecció

2.1.2.2.8. MICROLÀSER

La tècnica del microlàser té un objectiu compartit amb tots els altres mètodes esmentats anteriorment: la permeabilització de les membranes.

En el cas concret esmentat, la permeabilització es realitza mitjançant un microlàser que emet rajos amb un mètode semblant al sistema d'il·luminació d'un microscopi. Així, és possible la creació d'orificis o porus transitoris a la paret cel·lular i en la membrana plasmàtica de les cèl·lules vegetals.

Com en els altres mètodes, la creació dels porus facilita la posterior entrada del DNA forà cap a l'interior cel·lular.

Degut a que el sistema de microlàser no requereix de vectors o portadors del DNA d'interès pel procés de transformació, es poden emprar molècules de DNA lineals.

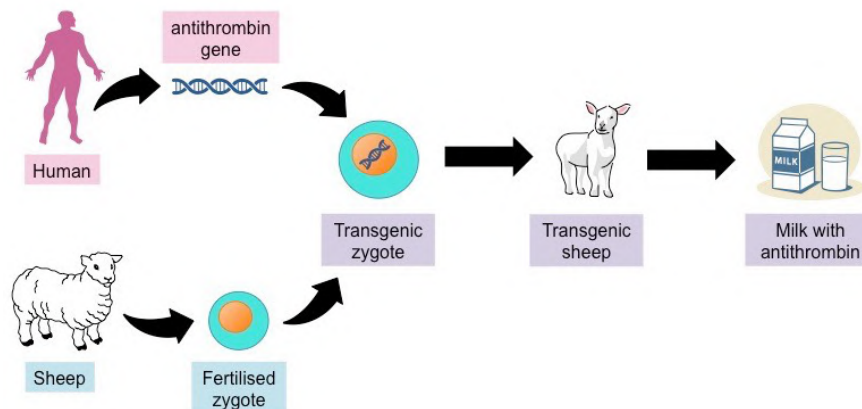
Tot i que no hi ha evidència conclouent sobre l'efectivitat del mètode, s'ha demostrat que la combinació del microlàser amb la biobalística dona lloc a èxits importants en processos de transformació. Quan es du a terme la barreja de tècniques esmentada, el microlàser s'usa per a l'obertura de porus en els teixits vegetals, a través dels quals els microprojectils del sistema de biobalística penetraran amb el DNA forà, de manera que s'integrarà a l'interior cel·lular vegetal. (Kajiyama S et al., 2007)

2.2. Impacte econòmic

Per poder entendre l'impacte econòmic dels transgènics és necessari conèixer les aplicacions i utilitats pràctiques que tenen els organismes modificats genèticament.

En primer lloc, els animals, els bacteris, els llevats i les plantes transgèniques són organismes utilitzats com a “biorreactors” per a l'obtenció de productes d'elevat valor afegit, és a dir, per a l'obtenció de proteïnes recombinants, les quals s'anomenen així, ja que són proteïnes obtingudes en una espècie o línia cel·lular diferent a l'original. Les proteïnes en qüestió són utilitzades generalment amb interès terapèutic, és a dir per al tractament de malalties. En el cas dels animals de granja, la producció de proteïnes humanes es coneix com a “biopharming” o “pharming” com a unió de les paraules granja (“farm”) i farmàcia (“pharmacy”) en anglès. (Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014; Sánchez, A.; Gadea, 2015) De fet, existeixen granges biofarmacèutiques en les quals, de forma experimental, vaques, ovelles i cabres transgèniques produeixen substàncies d'ús terapèutic de tal manera que, purificant la llet que produeixen, s'elaboren medicaments contra el càncer, la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA), l'artritis... (Legorreta-herrera et al., 2012)

Concretament, l'any 2009, l'antitrombina III humana va ser la primera proteïna recombinant produïda per animals transgènics comercialitzada i es produeix en la llet de cabra transgènica obtinguda mitjançant el procés de transferència nuclear. A més, es fa servir com a tractament de la profilaxi de tromboembolisme venós en pacients amb deficiència congènita d'antitrombina sotmesos a cirurgia, és a dir, amb una deficiència des del seu naixement de la proteïna reguladora de la coagulació de la sang. La profilaxi de tromboembolisme venós és una malaltia que consisteix en la formació de coàguls de sang en venes profundes.



Representació de l'obtenció de llet de cabra transgènica amb antitrombina

D'altra banda, dos exemples de proteïnes utilitzades amb fins terapèutics obtingudes mitjançant l'ús de bacteris i llevats que són comercialitzades actualment són, respectivament, "Krytexxa" que prové de la proteïna recombinant pegloticase i que es fa servir en el tractament del dolor i la inflamació d'un tipus d'artritis anomenat "la gota crònica", i "Liraglutide" que prové de la proteïna recombinant victoza i que es fa servir en el tractament de la diabetis. (Sánchez, A.; Gadea, 2015)

En el cas de les plantes transgèniques, destaca la producció de la immunoglobulina A secretora (SIgA), un tipus d'anticòs, és a dir, una proteïna produïda pel sistema immunitari del cos quan detecta substàncies nocives anomenades antigens. La SIgA és un dels anticossos produït pel nostre cos de forma més abundant i és clau en la protecció de toxines i patògens en les secrecions de les mucoses del nostre organisme com la saliva, les llàgrimes... La SIgA és un "plantibody" que es fa servir per prevenir càries dentals. (Larrick & Thomas, 2001)

A part de l'interès terapèutic de les proteïnes recombinants, també es poden fer servir industrialment, per exemple, mitjançant la producció de la proteïna de seda d'aranya en la llet de cabres transgèniques per tal d'obtenir fibres lleugeres i molt resistents per a components militars i espacials. Es tracta d'un producte ja comercialitzat com a "BioSteel". (Sánchez, A.; Gadea, 2015)



Representació del producte "BioSteel"

La segona aplicació important és la clonació d'animals elit, és a dir, la multiplicació il·limitada de races d'animals seleccionades mitjançant la transferència nuclear, la clonació, i, per tant, donant lloc a animals genèticament idèntics i augmentant l'eficiència de la productivitat del bestiar (Felmer, 2004). Mitjançant la millora de caràcters productius, es modifiquen caràcters d'importància econòmica amb objectius com, per

exemple, la millora de la producció de llana d'ovella modificant les propietats de la seva fibra, la reducció de lactosa a la llet per permetre'n el consum a persones intolerants a la lactosa, la maternització de la llet de vaca per fer-la més apropiada al consum dels bebès, l'increment del valor nutricional de la llet, l'augment del rendiment en la producció del formatge o la manipulació de la producció càrnica d'animals de granja mitjançant la transferència del gen de la hormona del creixement (GH), com es fa per obtenir els salmons transgènics "AquaAdvantage" desenvolupats per "AquaBounty Technologies", ja comercialitzat al continent americà, permetent que el salmó transgènic creixi durant tot l'any, en lloc de només durant la primavera i l'estiu (Albareda, 1982; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014). La millora dels continguts nutricionals també té lloc en plantes, com per exemple a través de la previsió de crear plantes que produeixin vacunes ingeribles (Legorreta-herrera et al., 2012).

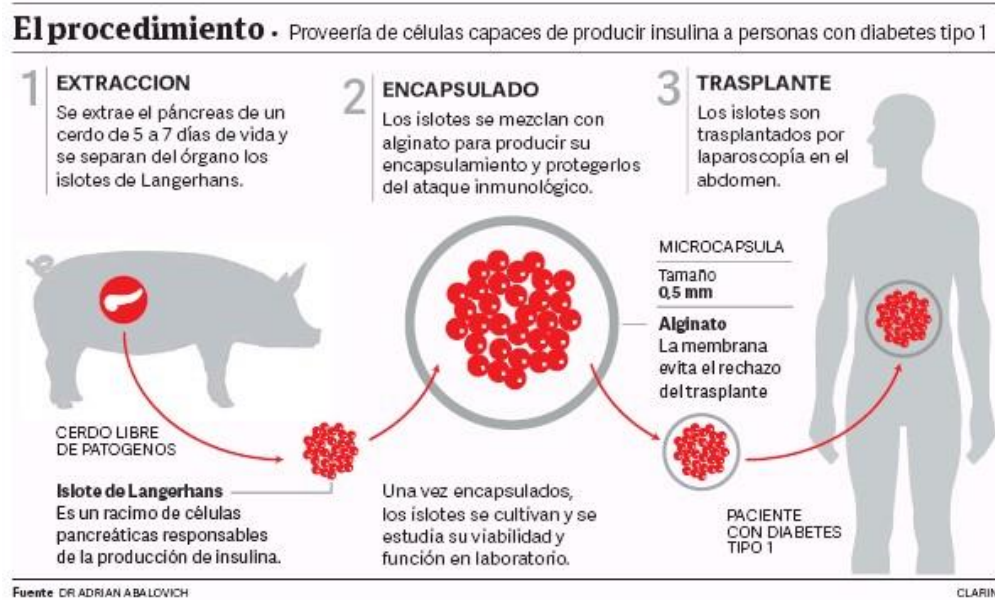


Representació del salmó transgènic "AquaAdvantage" darrere d'un salmó no transgènic

En tercer lloc, s'ha de tenir en compte la conservació genètica, ja que la clonació, encara que sovint s'associï amb la pèrdua de diversitat genètica, pot ser clau per conservar espècies en perill d'extinció (Felmer, 2004).

La quarta aplicació consisteix en l'eliminació de gens, els gens *knock-out*, la qual pot permetre conèixer millor la funció gènica, investigar en quins tipus cel·lulars i en quin moment del desenvolupament s'expressen diferents gens, estudiar la funció dels gens eliminats i fer servir els organismes obtinguts com a models de determinades malalties humanes, en els quals és possible analitzar més directament i

efectivament els mecanismes moleculars de la malaltia i els efectes de noves teràpies (Felmer, 2004; Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, 2014). També es poden utilitzar animals transgènics com a donants d'òrgans per a pacients humans mitjançant "xenotrasplantaments", ja que les donacions humanes no cobreixen les demandes d'òrgans. No obstant això, els "xenotrasplantaments" es veuen limitats pel refús d'òrgans entre espècies (Felmer, 2004).



Representació d'un "xenotrasplantament" entre porc i un ésser humà

En cinquè lloc, existeix la teràpia gènica, l'aplicació de la transgènesi en humans per tractar malalties hereditàries monogèniques, és a dir, provocades per l'alteració d'un sol gen. La teràpia gènica consisteix en la introducció d'un gen dissenyat per subministrar una nova propietat a les cèl·lules que freni el progrés de la malaltia. (Legorreta-herrera et al., 2012)

Finalment, existeix la creació d'organismes resistents a diverses malalties mitjançant la transferència de gens de resistència d'anticossos i de proteïnes de la membrana vírica. En el cas de les plantes, cal destacar la resistència a plagues. (Albareda, 1982; Felmer, 2004)

Malgrat tot el seguit d'aplicacions útils esmentades, cal conèixer el que suposen econòmicament més enllà dels seus avantatges (Greenpeace, 2009).

En primer lloc, els cultius transgènics contaminen els cultius convencionals, posant en risc la biodiversitat (Greenpeace, 2009; Mosquera, 2001). De fet, existeix el terme bioseguretat per fer referència als efectes

ecosistèmics que poden causar plantes sexualment compatibles amb altres plantes que pertanyen a l'àmbit natural en el qual les primeres són cultivades. Es tracta de la situació que es creu que té lloc entre els cultius transgènics i els no transgènics de tal manera que els primers causen la destrucció dels segons. (Mosquera, 2001) El problema principal que en deriva és el fet que no existeix cap llei que exigeixi a les companyies biotecnològiques causants dels danys esmentats i propietàries dels cultius de llavors transgèniques a pagar als agricultors per les pèrdues econòmiques que els causen.

A nivell espanyol, cada any, hi ha un important nombre de contaminacions i danys causats per organismes transgènics, com és el cas de la contaminació provocada pel blat de moro transgènic de l'empresa "Monsanto" anomenat "MON 810" que té conseqüències mediambientals i econòmiques greus en els camps rurals i agraris. (Greenpeace, 2009)

En segon lloc, com es podria deduir a partir de les aplicacions descrites anteriorment, el nivell de costos econòmics en producció animal, en mà d'obra, en màquines i en herbicides pels cultius hauria de disminuir, ja que es creen organismes resistents a insectes, a virus i herbicides, a sequeres, a la humitat, a l'acidesa del terra, amb tolerància a l'alumini i amb un retard en el període de maduració, entre molts altres exemples (Greenpeace, 2009; Mosquera, 2001; Parada et al., 2001). No obstant això, s'ha observat que encara que es dissenyin plantes resistents contra plagues específiques, els cultius transgènics no estan lliures de pesticides, ja que han de ser utilitzats per eliminar noves plagues. Per tant, sovint, els agricultors que compren les llavors transgèniques a les empreses venedores no només paguen més per les llavors manipulades genèticament respecte el preu de les llavors del producte convencional, sinó que, a més, han de comprar pesticides per combatre les noves plagues, tal i com va succeir l'any 2007 a l'Índia amb alguns cultius transgènics del cotó Bt, un tipus de cotó transgènic. (Greenpeace, 2009) Cal esmentar que els herbicides aplicats als cultius transgènics són més fàcilment degradables (Parada et al., 2001).

Per consegüent, es detecta un tercer i principal problema econòmic, la monopolització de la producció de llavors transgèniques per part de diverses empreses multinacionals, entre les quals hi ha "Novartis", "DuPont-Pioneer", "Syngenta", "Bayer" i "Monsanto", de les quals, les deu més importants, l'any 2006, controlaven el 57% del subministrament de llavors que es comercialitzen a tot el món, un 20% més del que venien l'any 1996. De fet, les llavors transgèniques produïdes per part de "Monsanto", a qui sovint es fa referència com el monopoli del sector, estan presents en el 86% dels cultius transgènics del món. A més, "Monsanto" és la propietària de la soja transgènica "Roundup Ready", el cultiu transgènic més estès per tot el món.

El clar augment de la concentració empresarial, redueix les varietats i, per tant, la llibertat d'elecció dels agricultors, causant l'augment dels preus, ja que l'oferta del producte és molt reduïda. Al cost dels preus

tan elevats cal afegir situacions com el fet que “Monsanto” demanda a centenars d'agricultors estatunidencs cada any per guardar les llavors transgèniques que els proporcionen i han estat condemnats a pagar a la multinacional més de 21 milions de dòlars, una quantitat que pot arribar fins els 160 milions tenint en compte acords extra-judicials.

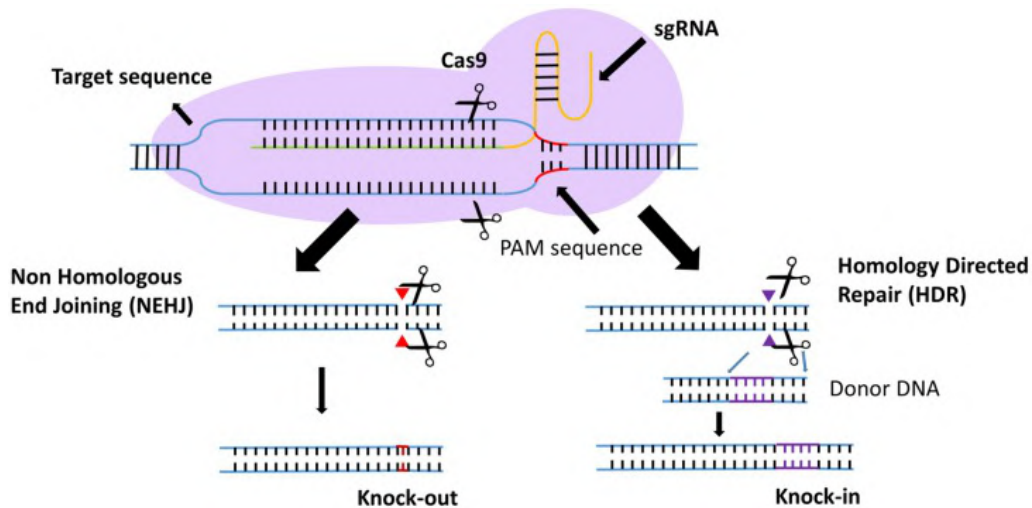
Com a conseqüència, es produeix un augment de la bretxa que separa pobres i rics, no només a causa de la concentració empresarial, sinó que també a causa del fet que la major part dels cultius transgènics es destinen a l'alimentació ramadera per abastir, per exemple, el consum de carn excessiu dels països rics, o a la producció de fibra, com és el cas de les explotacions industrials a gran escala de la soja i el cotó, respectivament. Per tant, els cultius transgènics no són una solució ni per la pobresa, ni la fam, ni el canvi climàtic, així com va afirmar l'ONU amb la presentació de l'Avaluació Internacional del Coneixement, Ciència i Tecnologia en el Desenvolupament Agrícola (IAASTD) duta a terme entre els anys 2005 i 2007. (Greenpeace, 2009)

És clar que és necessària l'aplicació de la biotecnologia per tal d'augmentar la producció d'aliments per cobrir l'augment en la demanda a causa de la superpoblació mundial, ja que els recursos naturals del planeta tenen límits, una situació que és encara més greu en els països pobres i subdesenvolupats, en els quals les taxes de natalitat són les més elevades, mentre que l'accés a quantitats d'aliments raonables i de bona qualitat és limitat, donant lloc a la inseguretat alimentària (Mosquera, 2001). De fet, l'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO) i altres organitzacions internacionals reconeixen que la crisi alimentària i l'augment dels preus dels aliments i els pinsos es deuen a l'augment de la demanda a quasi tot el món, a les nefastes condicions meteorològiques i a l'especulació sobre les matèries agrícoles, entre altres factors (Greenpeace, 2009).

Es calcula que aconseguir una espècie transgènica té un cost que varia entre els 20 i els 50 milions de dòlars. Conseqüentment, les empreses que treballen en el desenvolupament de llavors transgèniques tenen un gran capital, el qual principalment és privat. És per això que els països que més necessiten els processos tecnològics clau per obtenir organismes transgènics no tenen els mitjans per adquirir-les ni les poden desenvolupar i, per tant, l'opció més fàcil és la compra dels desenvolupaments realitzats fins al moment, ja que controlar les tècniques no és una opció. (Mosquera, 2001)

Tècniques de transgènesi més innovadores com el CRISPR-Cas9 poden ser útils per posar-hi remei, ja que, l'exemple posat es tracta d'una tècnica considerablement menys costosa que les dissenyades fins al moment i fàcilment aplicable degut a la seva capacitat d'adaptació a diversos organismes, inclòs l'ésser humà, a l'hora d'utilitzar-lo de forma dirigida per a l'edició genètica.

Resumidament, el CRISPR-Cas9 consisteix en l'ús d'una seqüència RNA guia que transporta l'enzim Cas9 per complementaritat de bases a la seqüència de DNA que es vol modificar. L'enzim Cas9 talla la doble hèlix de DNA, la qual és reparada per un mecanisme de reparació cel·lular, ja sigui amb l'eliminació de gens perjudicials (“knock-out”) o l'addició aleatòria de nucleòtids mitjançant la recombinació no homòloga o unió d'extremos no homòlegs (Non-Homologous End Joining – NHEJ), o amb la replicació d'una seqüència model corregint una seqüència existent a través de la recombinació homòloga (Homologous Recombination o Homology-directed Recombination-mediated Repair – HR o HRR), processos que s'explicaran més endavant. Normalment, es fa servir el mecanisme de reparació HR per introduir una seqüència desitjada en el genoma de l'organisme, fet que s'aconsegueix amb l'afegiment d'una seqüència model a prop de l'RNA guia i de la proteïna Cas9. El CRISPR-Cas9 és una tècnica que procedeix d'un mecanisme natural present aproximadament al 50% dels bacteris i al 90% d'arqueobacteris i que es pot fer servir per substituir una única base del DNA per una altra, per detectar seqüències per diagnosticar malalties, per editar l'RNA o per activar o reprimir la transcripció, evitant la modificació directa del genoma i, per tant, augmentant la seguretat de la modificació. (Gómez-Tatay & Aznar, 2019)



Representació del funcionament de la tècnica CRISPR-Cas9

L'avantatge econòmic que podria suposar el desenvolupament de tècniques barates com el CRISPR-Cas9 pels països subdesenvolupats, d'altra banda, pot donar lloc a compradors individuals, ja que són noves tècniques de transgènesi amb preus assequibles.

Així, destaca clarament el “biohacking” o “biopunk”, un moviment que apropa el coneixement de les ciències biològiques del món acadèmic i dels laboratoris privats a un públic no especialitzat amb la filosofia del “Fes-ho tu mateix” (Do-It-Yourself – DIY).

Concretament, darrere del “biohacking” hi ha la voluntat de democratitzar el coneixement mitjançant la creació de manuals, fòrums per compartir experiències i el *hackeig* de documents acadèmics i processos especialitzats, d’acord amb els principis del *hacktivisme*. També s’hi troba l’ús del cos humà com a material d’una obra d’art amb l’aplicació de diverses tecnologies per tal d’augmentar les capacitats humanes, i, per tant fusionant els conceptes de “body art”, transhumanisme, el qual sovint s’anomena transhumanisme casolà o de garatge, i “grinder”, l’autoexperimentació (“selfexperiment”).

En la comunitat *biohacker* es desenvolupen equips de baix cost, tallers, cursos introductoris, conferències, alternatives barates d’equips científics, *kits* de fermentació, compartició de dades genòmiques en bases de dades de lliure accés, extracció de DNA, elaboració de microscopis casolans per a l’anàlisi del flux vaginal, *crackeig* de codis de DNA, creació d’un tipus d’empreses anomenat “start-ups”, dispositius per a l’exploració del coll uterí, etc. Per tal d’aconseguir-ho fan servir diverses tècniques, entre les quals hi ha el CRISPR-Cas9.

Josiah Zayner, fundador de “The Odin”, una *start-up* que ven DNA modificat i *kits* de CRISPR-Cas9 per a *biohackers*, va transmetre en viu un vídeo en el qual es va injectar una solució elaborada amb tecnologia CRISPR-Cas9 per eliminar el gen inhibidor de la miostatina i augmentar la seva musculatura. La miostatina és una proteïna que s’encarrega de limitar el creixement dels músculs. Un altre exemple, és Aaron Traywick que és el fundador d’una *start-up* anomenada “Ascendance Biomedical” i que és conegut per injectar-se una vacuna experimental per a l’herpes produïda amb CRISPR-Cas9 en la conferència BDYHAX a Texas. Mesos després del fet, la seva empresa va proporcionar una teràpia gènica a un pacient infectat amb la SIDA. (Gayozzo, 2021)

Per concloure, cal remarcar que les aplicacions dels organismes transgènics podrien ser utilitzades positivament per aconseguir importants objectius socials i econòmics, però, com s’ha pogut veure, la seva injusta apropiació per part de grans multinacionals determina la impossibilitat de fer-ho realitat. D’altra banda, cal pensar si posar la seva gestió en mans de qualsevol ciutadà hauria de tenir límits ètics.

2.3. Visió social

La transgènesi ha estat molt qüestionada des de la seva aparició fins l'actualitat degut a la seva recent invenció. Tant els efectes secundaris que puguin causar com les finalitats dels procediments han estat els principals objectes de crítica entre la població. Concretament, s'estima que el desconeixement general sobre l'àmbit és la causa més rellevant que ha promogut inseguretats en la societat.

Quant a la promoció de les metodologies i la seguretat dels procediments, s'han realitzat diversos estudis que mostren una clara manca d'informació i problemes de comunicació científica a nivell internacional. La transgènesi, específicament, ha estat un dels casos que s'han estès de manera menys uniforme entre la comunitat científica, la qual cosa ha donat lloc a confusions que, avui en dia, repercuteixen en l'acceptació de, per exemple, la presència d'aliments transgènics en un supermercat.

Hi ha diverses organitzacions que s'han dedicat a estudiar-ho, com ara *Concise*, la qual ha publicat articles i altres documents que es basen en dades verídiques extretes de la població per a poder-ne realitzar les conclusions pertinents. En una de les publicacions plantejaven quin paper exerceix la comunicació de la ciència en l'opinió de la ciutadania espanyola.

En els resultats, s'explica que són els mitjans de comunicació convencionals i digitals els que solen ser consultats per la població. Alhora, les xarxes socials com Twitter, Facebook, Instagram o WhatsApp han guanyat molta rellevància en la promulgació d'idees i fets durant els últims anys, sobretot entre la joventut i, per tant, les properes generacions. Els podcasts, els vídeos de YouTube i altres blogs especialitzats són altres fonts d'informació usades. No obstant, on es solen cercar més notícies i articles és a Google perquè les xarxes socials no es poden considerar completament fiables. La televisió és un altre mitjà que arriba a moltes persones, tot i que està caient en desús i sol influenciar més en les generacions adultes. A més, algunes persones que van ser objecte d'estudi en l'article de *Concise* expliquen que les empreses privades, com ara les farmacèutiques, són fiables, tot i que no tant com les organitzacions internacionals com ara l'ONU o l'OMS, les quals van ser classificades com a extremada o moderadament fiables. En l'estudi es conclou que les idees i percepcions de les persones estan críticament influenciades pels seus voltants i les opinions més populars. L'interès, la sensibilitat i el nivell de conscienciació respecte els temes tractats també es veuen modificats per la seva formació, professió o situació laboral.

En l'estudi es va realitzar una anàlisi que abastia un llarg nombre de temàtiques, tot i que els OMG van mostrar grans contradiccions entre les opinions. En altres paraules, va ser l'àmbit que més diversitat de pensaments va mostrar. Els organismes modificats genèticament van ser percebuts com a interessants, tot i que no solen despertar molta inquietud entre els ciutadans perquè són vists com un tema de caràcter

tecnològic i, per tant, d'alta complexitat, la qual cosa dona lloc a un distanciament entre la comprensió de la transgènesi i el públic. Els canals dels quals les persones n'obtenen més informació són Google Acadèmic i la Wikipedia, dues de les fonts més consultades actualment degut a la seva accessible disposició i aparent fiabilitat.

A més, els principals resultats obtinguts sobre els aspectes que les persones consideren per a garantir la confiança de la font mostren que l'entitat que proporciona i finança la investigació és un punt important. També cal tenir en compte el tipus d'emissor que proporciona la informació. Els científics, els portaveus d'institucions científiques i els periodistes científics o generalistes són clars exemples. Tanmateix, el format en què es presenta la informació és un aspecte molt rellevant, ja que la subjectivitat oferta per la font i percebuda pel receptor pot causar un decantament cap a una postura o una altra. Alhora, cal tenir en compte que moltes entrades a Google no estan completament filtrades i regulades, de manera que hi ha fonts que són "fonts de fonts" i, per tant, poden contenir errors, dels quals Google no se'n responsabilitza. És per això que la indexació és generalment acceptada com un control de qualitat per la societat. Els participants explicaven també que les xarxes socials han de ser usades amb responsabilitat i amb una mirada crítica i sospitosa per a filtrar la qualitat de les publicacions. Per això, les xarxes obertes com YouTube o Facebook tenen molta importància tot i que únicament proporcionen informació que l'usuari selecciona seguint a comptes o temàtiques concretes, mentre que les xarxes tancades com ara WhatsApp o Telegram es limiten a difondre informació que s'intercanvia entre usuaris i que no pot ser filtrada tan fàcilment.

Malgrat l'excessiu ús de les fonts esmentades anteriorment, es segueixen considerant més fiables les pàgines oficials, tot i que solen ser menys consultades a causa de l'atractivitat en què es presenta la informació i la facilitat per a accedir-hi. Per tant, el coneixement visual sol ser més amè que el textual i, per tant, més consultat.

Concretament, els OMG són ben rebuts per una gran majoria de la ciutadania, tot i que la informació que es rep d'ells sol ser difosa i anecdòtica. És per això que molts dels participants manifesten una absoluta desconfiança envers els científics i responsables de la difusió de la transgènesi com una enorme confusió dels termes emprats en els articles i fonts més fiables. En altres paraules, tant la falta de claredat com el llenguatge tècnic han causat que una considerable proporció de la societat es mostri distant als procediments de modificació genètica.

Finalment, els participants de l'estudi realitzen diverses recomanacions per a millorar la comunicació científica. Concretament, suggereixen que les institucions i els científics siguin els principals promotors de la informació que creen i troben, de manera que no hi hagi interpel·lacions que modifiquin el discurs i en

disminueixi la credibilitat. A més, expressen inconformitat envers la manera en què la televisió pública exprimeix el seu potencial. Mentre podria ser usada per a la divulgació d'informació fiable, no s'hi solen destinar moments dedicats a això. També es qüestiona la manera en què, des de petits, se'ns inculca la ciència en l'educació, com també les limitacions de l'adaptació de revistes i articles en altres llengües que resulten ser incomprensibles per la majoria de la població. Més específicament, en l'àmbit dels OMG, la ciutadania reclama la clarificació de les qüestions bioètiques com un etiquetat senzill, clar i precís en els seus productes. Alhora, manifesten trobar a faltar l'accés a coneixement rigorós i neutral basat en estudis independents sobre els impactes dels transgènics tant en l'organisme com en el sistema social establert. (Moreno-Castro et al., 2020)

S'han realitzat altres estudis sobre la veracitat de les fonts d'informació de la comunicació científica en què es plantegen els passos per a adquirir coneixement científic. En l'article del JCOM, concretament, s'estudien dues consultes públiques realitzades a Itàlia i Eslovàquia sobre temes polèmics relacionats amb la ciència. El contingut analitzat qualitativament ha donat lloc a uns resultats que mostren que el coneixement científic impregna diversos àmbits de comunicació, creant camins diferenciats de confiança en la ciència, els quals són determinats per l'entorn, la salut, les fonts d'informació i les preferències personals sobre les xarxes o pàgines consultades.

Recentment, i sobretot degut a casos com la pandèmia de la Covid-19 o Sars-Cov-2, han aparegut conflictes polítics i científics sobre les veritats científiques derivades d'actituds populistes i creences difoses. Malgrat les controvèrsies i l'intens debat als mitjans de comunicació, diverses enquestes mostren que la confiança del públic en les institucions científiques segueix en creixement.

Algunes enquestes, com ara la realitzada als Estats Units l'any 2016, mostra que els científics segueixen sent el grup pel qual el nivell de confiança s'ha mantingut estable des dels anys setanta del segle passat, tot i que els nivells poden variar en funció del tema considerat. Per exemple, sobre les vacunes, el Wellcome Global Monitor ha determinat que més de tres quartes parts de la població mundial està d'acord que les vacunes són segures i efectives, obtenint un 79% i un 84% a Itàlia i a Eslovèquia, respectivament. A més, la recent enquesta de l'Eurobaròmetre sobre la percepció de les vacunes i les fonts d'informació posa de manifest que la ciència i la tecnologia estan indubtablement influenciades per les ecologies de la comunicació i els sistemes polítics en diferents contextos nacionals.

L'estudi és interessant pel fet que contraposa dues mentalitats molt diferents de dos països llunyans. Itàlia és un país mediterrani del sud d'Europa amb 60 milions d'habitants que té com a principals potències el comerç, el transport, els serveis d'allotjament i alimentació, la indústria i l'administració pública, la defensa, l'educació, la salut humana i les activitats de treball social, entre d'altres. A més, és un país centrat en la

televisió i en emissions públiques i privades, en què la difusió de diaris i revistes s'ha reduït dràsticament. Eslovàquia, en canvi, és un país continental de l'est d'Europa amb 5,4 milions d'habitants, tot i que té com a principals potències econòmiques les mateixes que s'han esmentat en el cas d'Itàlia.

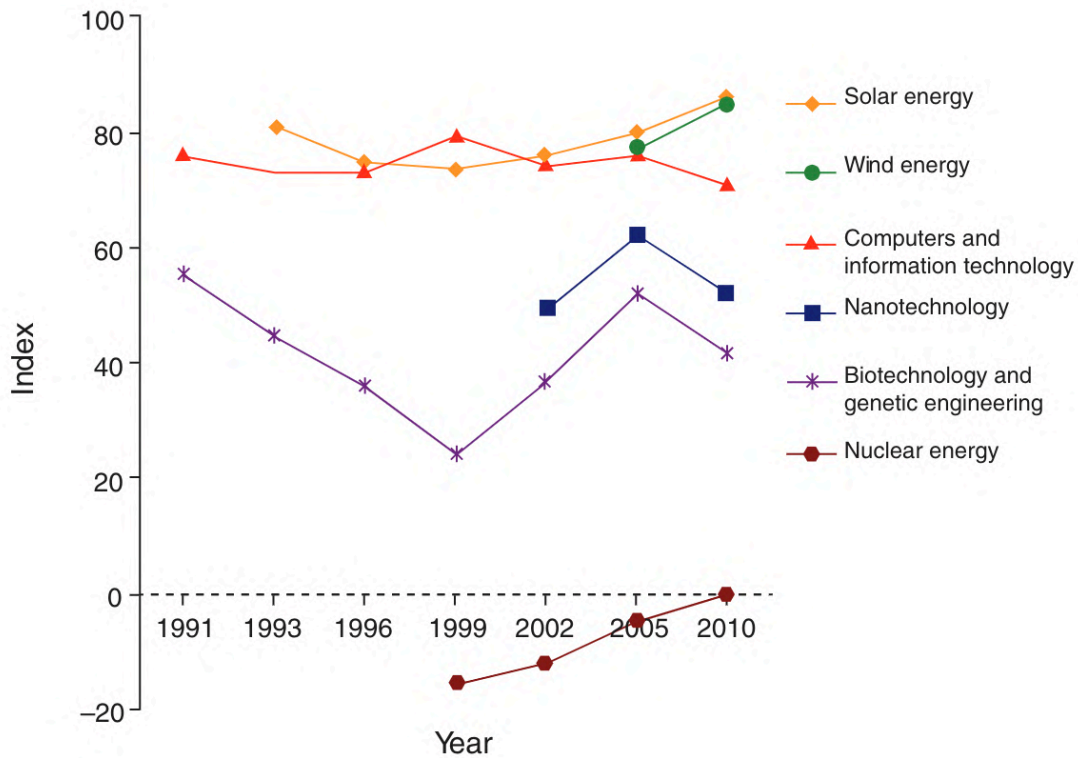
A més, a Eslovàquia la ciutadania s'informa principalment a través de la televisió tenint en compte les qüestions polítiques nacionals. A diferència d'Itàlia, el segon canal d'informació és Internet, pensat com la font principal d'informació sobre qüestions polítiques nacionals. Per això, la confiança en els canals de comunicació convencionals és superior a la confiança en els mitjans digitals més utilitzats.

Les conclusions extretes en l'article evidencien que, en absència d'informació fiable, les persones cerquen contactes personals amb experts en la matèria, els quals són una font de coneixement molt estesa. No obstant, l'escenari més freqüent és la transmissió d'informació entre familiars, amics i coneguts, acostant-s'hi menys freqüentment a desconeguts i professionals aliens al cercle immediat i proper. Ambdós països mostraven similituds a l'hora d'obtenir informació, tot i que l'estat i les facilitats que proporciona juguen un paper important en el camí de la desinformació.

L'estudi pretenia identificar les dimensions comunes de la confiança en la ciència i la comunicació científica i investigar com les fonts d'informació i els canals utilitzats per adquirir coneixement científic tenen un paper en el desenvolupament de formes diferenciades de comunicació científica. Amb l'estudi s'ha arribat a la conclusió que la incorporació del coneixement científic es caracteritza per múltiples aspectes, tot i que el tema científic que tracta o l'àmbit al qual es refereix és el més important. Sense tenir en compte l'impacte de la font, els cercles familiars i d'amics són àmbits de confrontació i intercanvi en els quals es formen opinions, actituds i visions crítiques envers la ciència i la tecnologia i, en els moments de diàleg, és quan es forja una opinió més personal i alhora influenciada per la d'altres persones, de manera que l'extensió d'una opinió és ràpida i, en alguns casos, completa, amb l'objectiu d'evitar mostrar-se diferent a la multitud. Per tant, breument, els resultats extrets en l'article de JCOM evidencien que la confiança no s'adquireix a través dels mitjans de comunicació. Més aviat, es desenvolupa a causa de les relacions interpersonals i la pertinença a cercles socials concrets, majoritàriament en temes relacionats amb la salut, la confiança en la ciència i en la tecnologia, entre d'altres. (Brondi et al., 2021)

Finalment, l'Eurobaròmetre de 2010 mostra diverses dades que s'adeqüen al pensament i la percepció actual sobre temes semblants a la transgènesi. Els diversos objectes d'estudi es mostren en el següent gràfic, el qual consta d'una llegenda en què apareixen l'energia solar, l'energia eòlica, els ordinadors i la informació tecnològica, la nanotecnologia, la biotecnologia i l'enginyeria genètica i l'energia nuclear, respectivament. Concretament, estan ordenades en ordre de més a menys acceptades per la societat al llarg dels anys, dels quals només se'n contempen dues dècades, del 1990 al 2010, aproximadament,

exceptuant les més recents com la nanotecnologia o l'energia nuclear, les quals han sigut polèmiques un cop produïda la seva aparició posterior.



Representació de l'acceptació dels diferents àmbits en funció del temps

Com es pot visualitzar en el gràfic anterior, la biotecnologia i l'enginyeria genètica no han rebut un gran optimisme per part de la població al llarg del temps, tot i que no és el camp menys acceptat dels que apareixen en la llegenda. Es situa l'inici el 1991, quan la biotecnologia va començar a ser reconeguda com una ciència vàlida i innovadora, de manera que la percepció era positiva i expectant. Posteriorment, amb les inseguretats dels procediments i les mancances de comunicació científica, va haver un decrement en la confiança que es donava als procediments, el qual va tacar la seva imatge, encara a l'actualitat. Posteriorment, l'enginyeria genètica va guanyar rellevància, i les seves utilitats i la garantida seguretat van calmar la societat, la qual va començar a veure els organismes modificats genèticament amb més normalitat, tot i que amb certa distància. Finalment, l'últim període s'ha caracteritzat per la disminució d'optimisme, el qual també s'evidencia en altres àmbits que apareixen al gràfic. Això es pot relacionar amb l'inici de divulgació d'informació a nivell internacional amb més facilitat gràcies a les xarxes socials o altres fòrums, com l'elevat ús d'Internet.

També cal tenir en compte que l'Eurobaròmetre es basa en la informació obtinguda de 32 països diferents d'Europa. A l'inici, la població europea cercava la regulació de l'interès públic i la possibilitat de parlar per a intervenir en factors diversos. A més, l'inici de conscienciació sobre el canvi climàtic i la sostenibilitat de les tecnologies va ser un fet molt rellevant en les dades del gràfic. És per això que l'energia solar i l'eòlica, ambdues fonts d'energia sostenibles, es troben en un nivell tan elevat com els ordinadors i la informació tecnològica.

És destacable la manera en què, actualment, l'optimisme envers la biotecnologia i l'enginyeria genètica es troba, aproximadament, al mateix nivell que el 1933, abans de les controvèrsies sobre els aliments transgènics dels anys 90. Hi ha una clara reconstrucció de la confiança pública en els reguladors i la indústria des del nadir dels anys noranta. En l'índex, els científics universitaris mostren un índex de confiança al voltant del 80%. No obstant, la confiança està en estat decreixent perquè s'espera veure una regulació adequada i no s'està disposat a acceptar la dependència de les forces del mercat. La regulació basada en la ciència és àmpliament acceptada. Tanmateix, quan l'ètica i els valors socials estan en joc, gran part de la societat espera veure la participació del públic en la presa de decisions.

Tot i que el 83% dels europeus mai no ha sentit parlar del concepte de biologia sintètica, les respostes mostren el que s'espera d'una tecnologia nova, concretament conèixer-ne els riscos possibles, els avantatges reclamants i el beneficiant, de manera que només l'aprovarien en circumstàncies molt especials.

Pel que fa a la teràpia gènica, el suport és bastant semblant. Per exemple, el xenotrasplantament, el qual mai havia rebut gaire suport, és actualment aprovat pel 58% dels enquestats, com passa amb les biotecnologies mèdiques i les aplicacions no terapèutiques. Passant de la reparació a la millora, trobem que el 56% del públic europeu aprova la investigació que té com a objectiu millorar el rendiment humà. Però el suport a la medicina regenerativa no és incondicional, l'aprovació depèn de la percepció de supervisió i control adequats.

La recepció, per tant, és un altre tema que s'ha de tractar. El contrast entre la percepció del públic de les biotecnologies mèdiques i les biotecnologies agroalimentàries tradicionals és cada cop més gran. A més, l'enquesta Eurobaròmetre del 2010 va ser realitzada un mes abans que la Comissió Europea de Brussel·les aprovés la patata Amflora de BASF. Tot i això, hi ha controvèrsies en l'enquesta que semblen romandre eternes. A més, la clonació amb la finalitat d'obtenir productes alimentaris dona lloc a preocupacions similars a gairebé tots els països de la Unió Europea, rebent encara menys suport que els aliments transgènics.

Per tant, els aliments produïts mitjançant processos d'enginyeria genètica són presents actualment però no gaire ben rebuts per la societat. No obstant, els cisgènics, cultius transgènics produïts únicament

mitjançant l'afegiment de gens de la mateixa espècie o de plantes que es poden creuar per la millora convencional, evocuen una reacció diferent a l'afegiment de gens pròpies d'espècies llunyanes. De fet, la producció cisgènica de pomes rep un suport del 55%, mentre que les pomes transgèniques reben 33% d'aprovació. Per tant, els cisgènics són més ben acollits pel fet que hi contribueixen a la reducció de l'ús de pesticides i dels residus que creen i no semblen ser tan "antinaturals" com els transgènics. És per això que, en un futur, és probable que els aliments cisgènics substituïssin els tradicionals a nivell de popularitat.

Finalment, es planteja fins a quin punt les creences, la socialització i els valors estan associats amb el suport a la ciència i la tecnologia. La resposta és que, en general, les mentalitats laiques, alliberades de les limitacions de mentalitat que comporten certes religions, mostren més optimisme tecnològic i són més propensos a donar suport a la investigació de cèl·lules mare embrionàries humanes, per exemple, mentre que en temes de medicina regenerativa es divideixen en dos grups, els quals es sustenten en funció de la veritat. No obstant, hi ha moltes persones altament religioses que consideren que la ciència hauria de prevaldre en el conflicte, perquè és l'educació i les troballes les que s'associen a un major optimisme tecnològic i a una més elevada confiança en la delegació científica.

De fet, en funció de la regulació dels valors i el suport a les tecnologies, se'n distingeixen cinc grups basats en dos contrastos fonamentals. El primer és entre els països en què es prioritza la ciència per sobre de l'ètica i viceversa. El segon, en canvi, és entre els països que es preocupen per l'equitat distributiva. Per tant, si s'observen les creences religioses, la socialització i els valors, es troba un patró d'influències complex i jeràrquic, el qual crea un seguit de condicions per a la innovació tecnològica, segons l'Eurobaròmetre. Els aspectes més rellevants són la preservació de la sostenibilitat, els beneficis, una regulació adequada, la seguretat i una distribució justa de beneficis i riscos, de manera que, si es compleixen, hi hauria una gran millora en la percepció dels transgènics a nivell global. Tot i això, al final del treball de recerca, s'ha realitzat una anàlisi exhaustiva mitjançant una enquesta, la qual s'adequa molt a les dades de l'Eurobaròmetre 2010 esmentades anteriorment. (George Gaskell et al., 2011)

3. PART PRÀCTICA

3.1. Investigació amb Aaron New

L'objectiu de la part experimental realitzada amb l'Aaron New, investigador en el Centre for Genomic Regulation (CRG), és valorar la importància de les mutacions i aprendre a treballar amb algunes eines informàtiques en l'àmbit de la genètica. A partir dels articles *Rapid Expansion and Functional Divergence of Subtelomeric Gene Families in Yeasts* i *Finding the sources of missing heritability in a yeast cross* s'han pogut corroborar els resultats obtinguts en el seu moment. No obstant això, primer és necessari establir alguns conceptes teòrics.

3.1.1. Gens perifèrics, gens centrals i mutacions

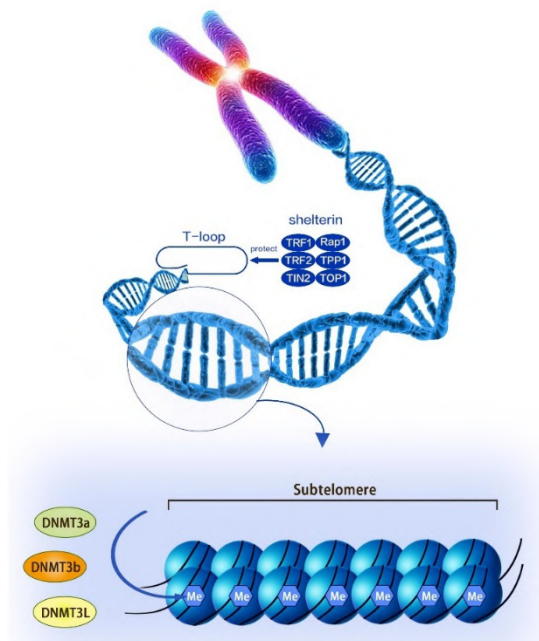
Els éssers vius pertanyents a una mateixa espècie es caracteritzen per tenir en comú un conjunt de gens centrals i per dividir-se en subpoblacions que a més en comparteixen de perifèrics. Els gens perifèrics, també anomenats accessori, tenen un paper important en la diversitat i variació fenotípica entre els individus d'una mateixa espècie.

Ahora, poden patir mutacions genètiques que elles mateixes o, juntament amb d'altres, poden contribuir al desenvolupament de malalties. S'ha de tenir en compte que la identificació de mutacions causants de malalties és clau en l'àmbit de la genètica humana i també complicada, ja que, no només cada individu pot tenir-ne moltes, sinó que, a més, diferents mutacions en diversos gens poden donar lloc al mateix resultat. A causa de les complicacions esmentades, sovint es fan servir models de laboratori a partir dels quals es poden obtenir observacions específiques que permeten arribar a conclusions útils per entendre i predir fenotips.

3.1.2. Pèrdua d'heterozigositat i subtelòmers

D'altra banda, existeixen variacions cromosòmiques d'un major grau que, per exemple, donen peu a la presència o absència de gens sencers i poden ser fàcilment relacionades causalment amb un fenotip, especialment quan ja es sap la funció dels gens afectats. La pèrdua d'heterozigositat (Loss Of Heterozygosity - LOH), normalment la pèrdua d'un braç cromosòmic sencer, és un tipus de variació mutacional de major nivell, la qual sovint no es veu en les línies germinals dels organismes, ja que són letals. (Lee & Sang, 2007)

Els subtelòmers són regions del genoma que es troben als extrems dels cromosomes i que sovint no són completament essencials per a la supervivència de l'individu, però que contribueixen a la variació fenotípica en condicions o per característiques particulars. Els subtelòmers contenen gens perifèrics que són compartits per alguns individus en una espècie, però que no són rellevants en tasques reproductives i cel·lulars bàsiques. Per exemple, en humans, receptors de l'olfacte i el gust estan presents en el subtelòmer i estan correlacionats amb diferents fenotips pertinents. Els subtelòmers es caracteritzen pel silenci epigenètic, és a dir, un mecanisme per defensar el genoma hoste d'infeccions virals i dels efectes d'elements transferits que actua regulant l'expressió de gens altament duplicats i silenciant els transgens. A més, les regions subtelomèriques experimenten una evolució ràpida ja que pateixen esdeveniments de LOH seguits d'un procés de reparació que s'explica més endavant. (Brown et al., 2010)

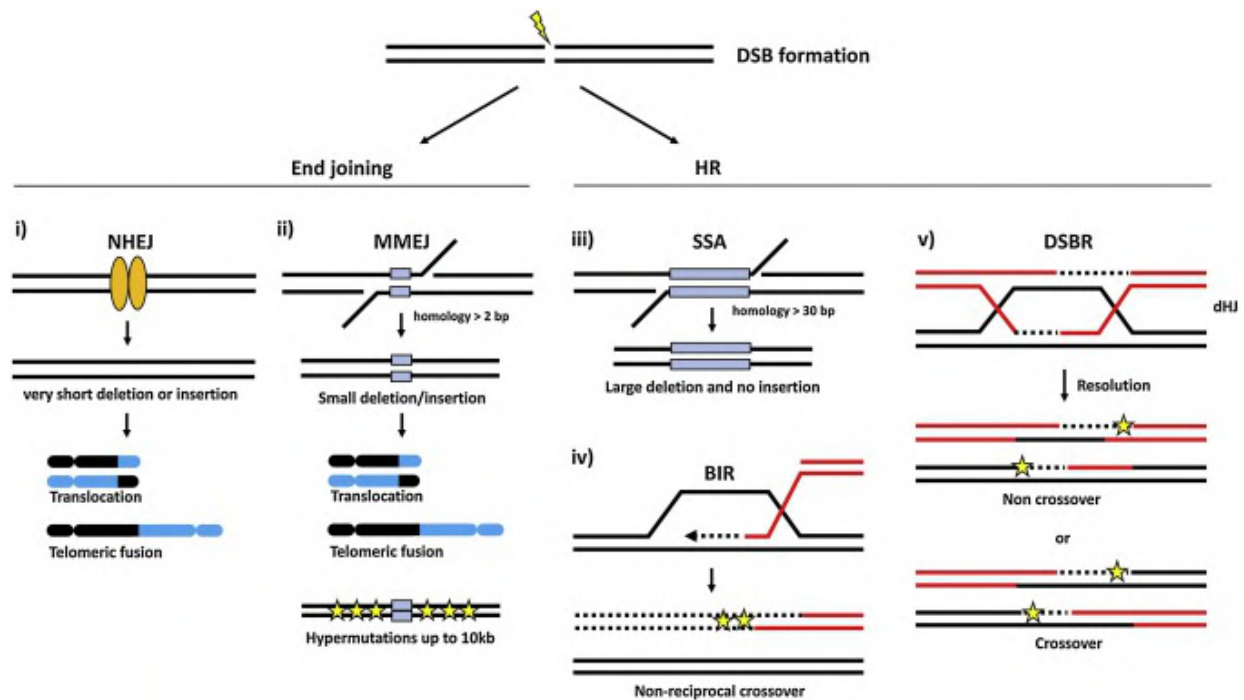


Representació dels subtelòmers (Hu et al., 2019)

En primer lloc, és necessari entendre l'origen d'una LOH: un trencament de doble cadena (Double-Strand Break - DSB). Diverses modificacions químiques, tensions mecàniques, espècies reactives de l'oxigen (Reactive Oxidative Species – ROS, molècules que es produeixen en les cèl·lules resultants de reaccions REDOX incompletes en les quals participa l'oxigen) generades pel metabolisme respiratori normal, i una replicació de DNA interrompuda són alguns factors que poden causar trencaments en una o ambdues cadenes que formen la doble hèlix de DNA. Altres causes poden ser factors externs com la radiació ionitzant (Ionizing Radiation - IR) i alguns medicaments quimioterapèutics. Els DSBs succeeixen i es reparen durant la reordenació de segments del gen de la immunoglobulina (anticossos) en el desenvolupament de

limfòcits (un tipus de glòbuls blancs que s'encarreguen de defensar l'organisme d'infeccions), durant la integració de determinats elements genètics i virus al DNA hoste, i durant el procés de recombinació de la meiosi entre parells de cromosomes homòlegs. (Featherstone & Jackson, 1999)

Els DSBs són perjudicials per a la cèl·lula de tal manera que si no es reparen poden causar la seva mort (Lee & Sang, 2007). En el cas dels mamífers, poden portar a l'eliminació de gens, la pèrdua de cromosomes i altres anomalies cromosòmiques que poden produir càncer (Featherstone & Jackson, 1999). Tots els organismes eucariotes desenvolupen els següents mecanismes per a eliminar els DSBs: recombinació homòloga (Homologous Recombination o Homology-directed Recombination-mediated Repair – HR o HRR), recombinació no homòloga o unió d'extremos no homòlegs (Non-Homologous End Joining - NHEJ), i unió d'extremos mediada per microhomologia (Microhomology-Mediated End Joining - MMEJ) o unió d'extremos no homòloga alternativa (Alt-NHEJ) (Lee & Sang, 2007).



Representació la recombinació homòloga (Seol et al., 2018)

En primer lloc, la recombinació homòloga repara DSBs que tenen lloc en les fases S o G2 del cicle cel·lular i comença amb l'extracció del DNA dels extrems 5' contigus al DSB. L'extracció és catalitzada pel MRN, un complex proteic que conté MRE11, RAD50 i XRS2(en llevats)/NBS1. (Cannan & Pederson, 2016) De forma resumida, la recombinació homòloga és un mètode mitjançant el qual es copia la informació genètica d'un filament patró homòleg a la seqüència contigua al trencament (Lee & Sang, 2007). A través del genoma

dels llevats i fent servir mutants molt sensibles a la IR, ha estat possible identificar els gens i proteïnes principals que actuen en la recombinació homòloga, que són: RAD51 (que forma filaments al llarg de les cadenes de DNA desenrotllades), RAD52 (una proteïna que uneix extrems), RAD54, RAD55, RAD57, RAD50, MRE11 i XRS2. També són necessàries DNA polimerases. Al final del procés, els extrems del DNA són lligats per la DNA ligasa I i les cadenes de DNA entrelaçades són separades per un altre complex proteic. (Featherstone & Jackson, 1999)

La recombinació homòloga es subdivideix en tres tipus de recombinacions: conversió gènica, replicació induïda per trencaments (Break-Induced Replication - BIR) i aparellament monocatenari (Single-Strand Annealing - SSA). L'aparellament és l'acció en la qual el DNA o el RNA s'uneix a una seqüència complementària mitjançant enllaços d'hidrogen donant lloc a un polinucleòtid bicatenari. Tots tres tipus de recombinacions homòlogues depenen de la funcionalitat del grup epistàtic de gens RAD52. L'epístasi és la relació de dependència entre diversos gens a l'hora d'expressar-se de tal manera que l'acció i expressió del gen hipostàtic es veu alterada o suprimida per l'acció i expressió del gen epistàtic. (Lee & Sang, 2007) A més, el SSA té lloc entre dues seqüències de DNA homòlogues juntes i una degradació extensiva d'ambdues desaparellades dona peu a una pèrdua considerable de material genètic (Featherstone & Jackson, 1999).

En segon lloc, el mètode NHEJ, que té lloc al llarg de les fases G0 i G1 del cicle cel·lular, uneix els extrems trencats en el DSB a través d'algunes supressions o insercions de parells de bases al marge de l'homologia de les seqüències (Cannan & Pederson, 2016; Lee & Sang, 2007). En les cèl·lules dels mamífers i en llevats, la primera proteïna en reconèixer un DSB és la Ku70/80, un heterodímer que s'associa als extrems del DNA trencat. Un heterodímer és una molècula formada per dos components diferents. En el cas dels mamífers, els Ku formen un complex amb la proteïna quinasa de DNA (DNA-PK), activant així la seva subunitat catalítica (DNA-PKcs) i donant peu al començament d'un procés que involucra el complex RAD50-MRE11-NBS1 i el complex Cernunnos-X4 (Cer-XFL). (Cannan & Pederson, 2016; Featherstone & Jackson, 1999) Si els extrems del DNA són complementaris i no estan fets malbé, poden ser ajuntats directament per la DNA ligasa IV associada a la XRCC4. La XRCC4 és la proteïna 4 complementària creuada de reparació de raigs X (X-ray Repair Cross-Complementing protein 4). (Cannan & Pederson, 2016) En la configuració i lligament dels extrems també hi actuen factors proteics com el POL4 o el FEN1 (Lee & Sang, 2007).

Al llarg de tot el procés, sempre que un o dos nucleòtids de complementarietat en les dues seqüències de DNA puguin aparellar-se entre si, l'endonucleasa Artemis treu l'excés de DNA monocatenari. Es tracta

d'un fet que genera un substrat que pot ser lligat per la DNA ligasa IV i que actua amb el XRCC4 i el Cer-XLF. (Cannan & Pederson, 2016)

En el cas dels llevats, el complex de proteïnes de reparació principal és MRE11-RAD50-XRS2, el qual uneix els extrems de les seqüències alineant-los i fixant-los per al lligament (Lee & Sang, 2007).

En tercer lloc, el mètode MMJE actua durant la fase S del cicle cel·lular i esdevé la principal opció de reparació quan els dos mètodes explicats anteriorment no estan disponibles per fer reparacions a causa de mutacions en gens necessaris per dur-los a terme, per exemple, o quan es produeix un DSB sense deixar cap seqüència final complementària per a l'alineació ni cap seqüència del filament patró homòloga per a la recombinació (Cannan & Pederson, 2016; Lee & Sang, 2007). La MMJE comença amb l'extracció del DNA que presenta microhomologies dels extrems 5' contigus al DSB, semblant a l'inici de la recombinació homòloga. Les microhomologies són seqüències curtes de bases presents en diferents gens que no permeten que el DNA monocatenari s'aparelli. Com a conseqüència es crea un substrat que, després de l'extracció dels extrems del DNA no aparellat, omple els forats i s'efectua el lligament amb la DNA ligasa IV en el llevat i la DNA ligasa III en els mamífers. (Cannan & Pederson, 2016)

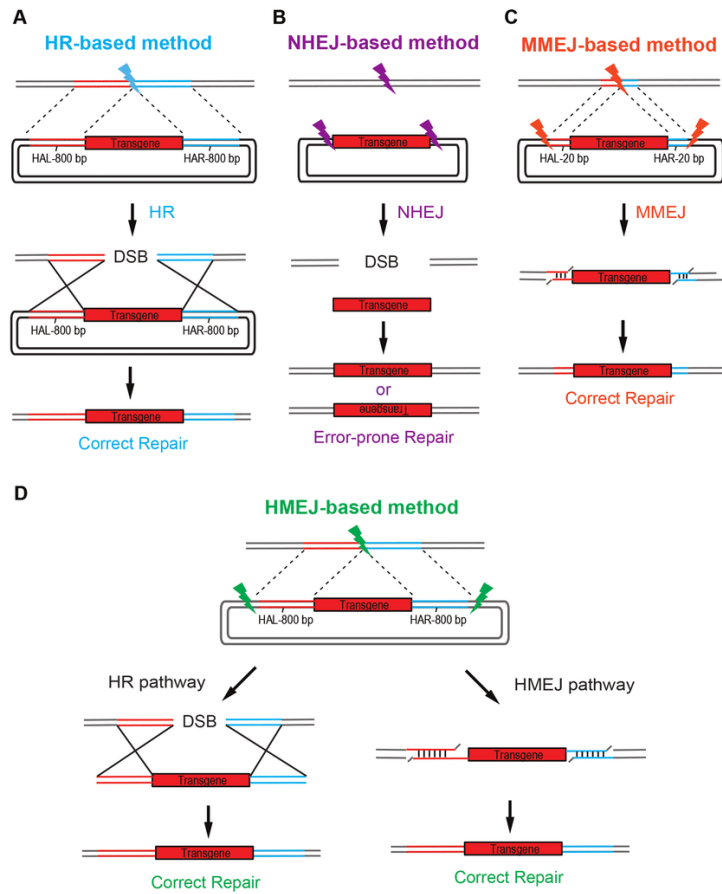
Cal destacar que les tècniques de reparació de DSB explicades també es fan servir com a mètodes d'integració dirigida de transgens.

Un cop el DSB ha tingut lloc, durant el procés de reparació per recombinació homòloga, fragments de DNA exogen poden ser introduïts al voltant del lloc on ha succeït el trencament. No obstant això, la recombinació homòloga només està activa al llarg de la fase final S o G2 del cicle cel·lular, esdevenint ineficient com a eina d'integració de transgens en embrions i teixits animals in vivo.

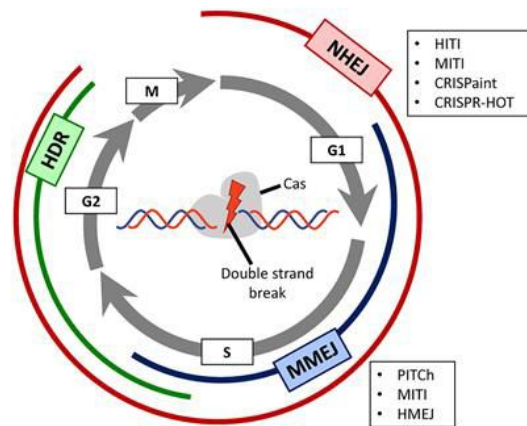
En els casos de la NHEJ i la MMEJ, quan es du a terme un procés de transgènesi, la NHEJ dona lloc a direccions aleatòries en la integració del transgen i a diversos tipus d'insercions i eliminacions de bases en els extrems d'unió. Conseqüentment, es dificulta la construcció de gens de fusió endògens i exògens per a la producció de proteïnes quimèriques o de fusió. D'altra banda, la MMEJ mostra una baixa eficiència d'integració dirigida en cèl·lules cultivades, crescudes al laboratori.

Totes les dificultats que sorgeixen amb els mètodes existents donen peu a la combinació del complex CRISPR-Cas9 amb la recombinació homòloga que millora l'eficiència de la integració dirigida de transgens, i a la invenció d'un mètode, la unió d'extrems mediada per homologia (Homology-Mediated End Joining - HMEJ). La tècnica HMEJ disposa d'uns braços homòlegs més llargs i estables en comparació amb la MMEJ. A més, fa servir un sgRNA (single guide RNA) o gRNA (guide RNA), és a dir, un fragment de RNA creat

per guiar la nucleasa Cas9. Conseqüentment, té una major eficiència, també als teixits i embrions animals in vivo.



Representació dels mètodes HR, NHEJ, MMEJ i HMEJ (Yao et al., 2017)



Representació de la intervenció del CRISPR-Cas9 (Gallego et al., 2020)

El CRISPR-Cas9 és un dels mecanismes que es fan servir per facilitar la introducció del DNA exogen generant un DSB en el genoma de la seqüència que es tracta. (Yao et al., 2017)

Cal destacar que alguns defectes en els mecanismes del mètode NHEJ poden donar lloc a malalties humanes com el càncer a partir de defectes i mutacions en la DNA ligasa IV, en el gen codificador NBS1 o en el gen que codifica la proteïna senyal ATM, entre d'altres, així com un error a l'hora d'aturar el cicle cel·lular. Els fets esmentats causen inestabilitat genètica, un elevat nivell de mutacions en el genoma cel·lular, que porta a una predisposició de l'organisme a tenir càncers, sobretot a tenir càncer limfòcit. Es tracta d'un tipus de càncer que s'origina a cèl·lules que esdevenen limfòcits en la medul·la òssia. (Featherstone & Jackson, 1999)

D'altra banda, la MMEJ és altament mutagènica, és a dir, que produeix moltes mutacions, i probablement també contribueix a la inestabilitat del genoma que es troba en determinades cèl·lules cancerígenes (Yao et al., 2017).

En tot tipus de càncers, el 2-3% de les cèl·lules contenen cromosomes que mostren signes d'haver patit nombrosos DSBs, inversions i delecions. El processament i la reparació dels DSBs poden provocar mutacions, LOH i reordenaments cromosòmics que donen lloc a la mort cel·lular o al càncer. Malgrat això, els mecanismes de reparació dels DSBs són útils en l'àmbit de les teràpies adjuvants per al tractament de determinats càncers, que són tractaments addicionals per a disminuir el risc que el càncer torni a aparèixer després de la finalització del tractament principal. Per exemple, les cèl·lules cancerígenes que contenen mutacions BRCA 1 o BRCA 2 generalment no poden reparar els DSB per recombinació homòloga, i, per tant, depenen dels mètodes NHEJ i MMEJ. Les cèl·lules cancerígenes en qüestió presenten una elevada vulnerabilitat a la IR quan es tracten amb un tipus d'inhibidors necessaris per a realitzar la MMEJ. És per això que es realitzen assaigs clínics amb inhibidors per aprovar-los per al tractament de certs càncers. (Cannan & Pederson, 2016)

En la part experimental que s'ha dut a terme, s'ha fet servir com a model d'organisme el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, també conegut com el llevat del pa, de la cervesa o del vi, ja que es fa servir en els seus processos de fabricació (Steensels et al., 2012). Respecte a tota la informació presentada anteriorment, cal remarcar que el llevat *S. cerevisiae* en desenvolupament realitza la recombinació homòloga per reparar DSBs, mentre que la majoria de cèl·lules d'individus mamífers fan servir la NHEJ. Els sistemes de reparació de DSBs poden posar en marxa processos d'amplificació, sobretot en els subtelòmers. (Featherstone & Jackson, 1999) L'amplificació és la generació de múltiples còpies de gens a dins del mateix braç cromosòmic. Per tant, els gens als subtelòmers es perden així com es dupliquen, és

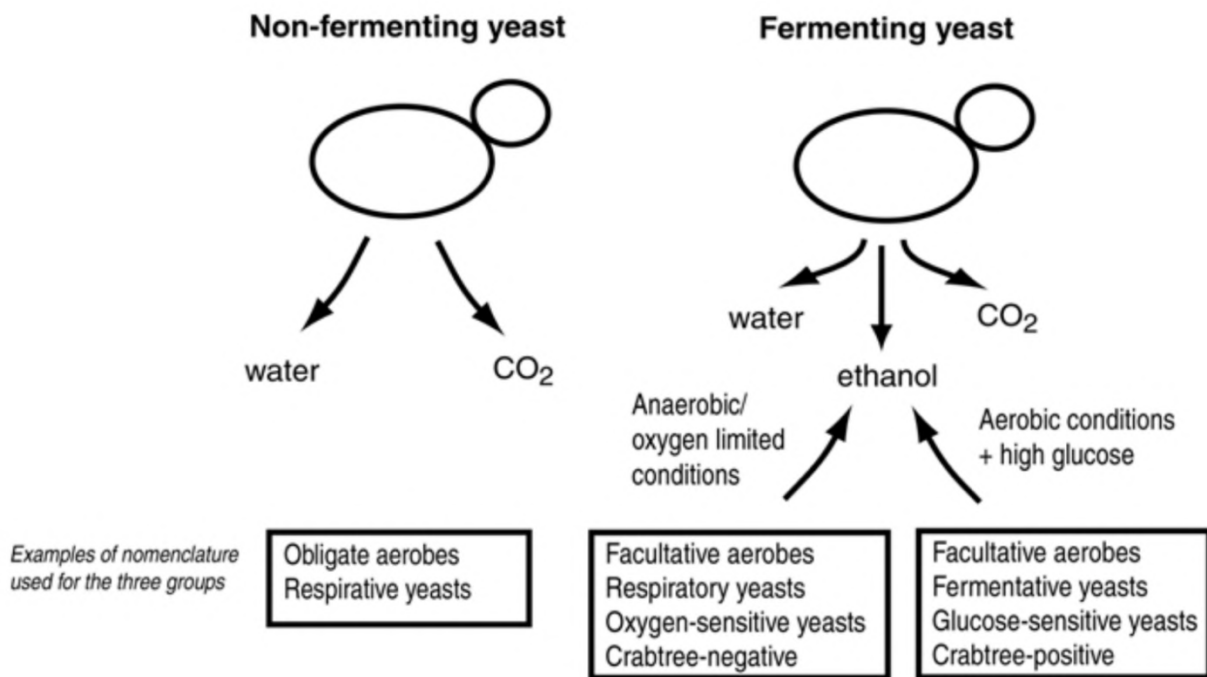
per això que qualsevol individu podria tenir moltes còpies d'una família de gens subtelomèrics o no tenir-ne cap.

Un exemple d'una regió subtelomèrica amb un gran efecte és la que controla el creixement del llevat en maltosa, l'objecte d'estudi de l'experiment que s'ha dut a terme.

3.1.3. Tret quantitatiu i creixement del llevat

En concret, s'han estudiat dues espècies de llevat anomenades BY4741 o S288c i RM11-1A. La principal diferència entre ambdues és la seva capacitat de créixer en un medi constituït per maltosa gràcies a la seva propietat de fermentació del glúcid.

La fermentació de maltosa és un *quantitative trait* o tret quantitatiu, és a dir, un valor o propietat quantificable al laboratori. En el cas que es tracta, el tret varia entre els diferents aïllats salvatges del llevat *S. cerevisiae*, la qual cosa explica el fet que alguns llevats puguin metabolitzar la maltosa més ràpidament que altres. Concretament, s'estudien les diferències causants de la favorable fermentació de maltosa en l'espècie RM11-1A i l'escassa capacitat de fermentar-la en la BY4741 o S288c. Per tant, la variable que s'observa és el consum o metabolisme de la maltosa.



Representació de la diferència entre la possibilitat i la impossibilitat de fermentar la maltosa en llevat (Fredlund, 2004)

La principal importància de la fermentació de la maltosa en un medi salvatge és que garanteix el creixement positiu del llevat en determinades fonts de carboni formades bàsicament de midó. És per això que l'humà, amb el pas del temps, ha mostrat interès en la domesticació del llevat de manera que pugui fermentar midó, compost per la unió de molècules de maltosa, en pa i cervesa per al seu consum.

De fet, el nom *Saccharomyces cerevisiae* està format per dues parts: mentre que "Saccharo" significa "fong del sucre" en grec llatinitzat, "cerevisiae" significa "de cervesa". (Salari & Salari, 2017) Al most de cervesa, els sucres fermentables que més n'abunden són la maltosa (50-60%), la maltotriosa (15-20%) i la glucosa (10-15%) (Zastrow et al., 2001).

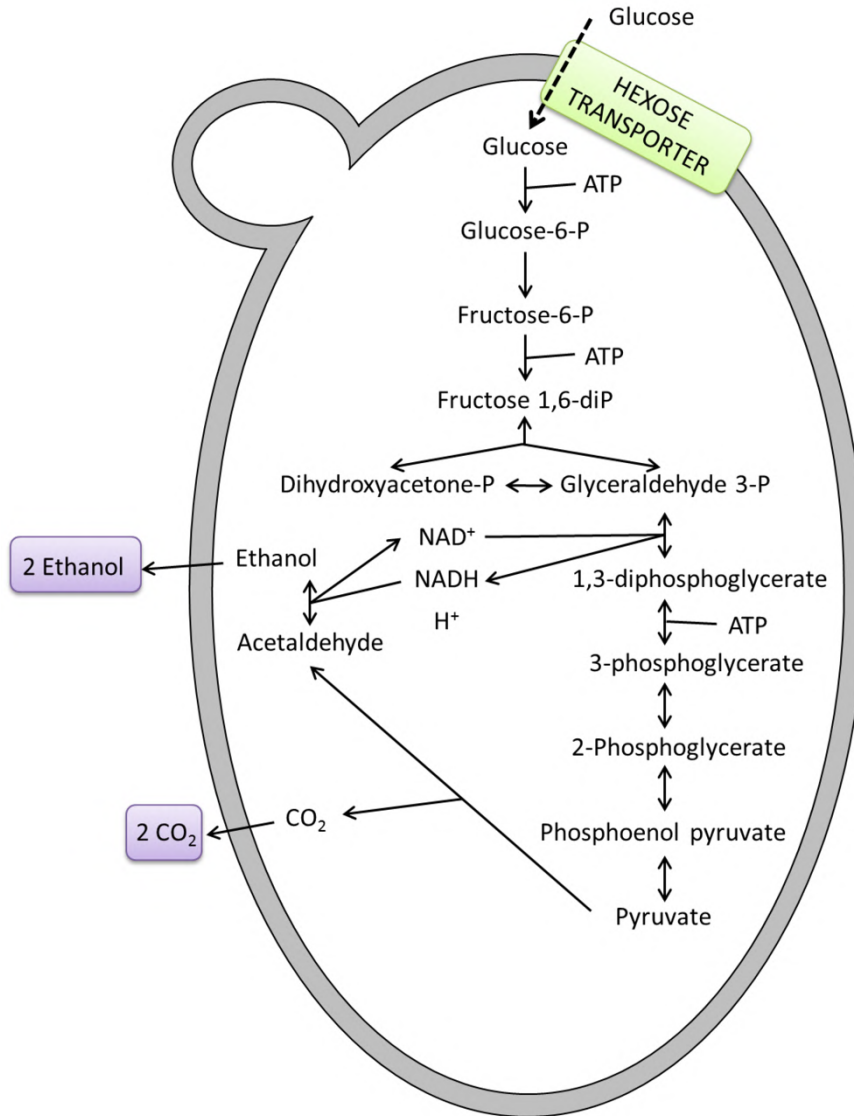
Encara que la maltotriosa és el segon sucre més abundant del most de cervesa, la seva captació per part de cèl·lules de llevat és ineficient. Normalment, només quan el llevat ha absorbit la meitat de la glucosa del most, s'inicia la captació de maltosa i maltotriosa. No obstant això, la taxa d'absorció és més lenta per a la maltotriosa. Conseqüentment, el metabolisme de la maltotriosa ha rebut poca atenció en comparació amb els mecanismes d'utilització de la maltosa i la glucosa per part de cèl·lules industrials de llevat. (Lu & Sharkey, 2006)

En general, el llevat és especialment útil per als humans degut a que presenten un mètode concret de fermentació anomenat *Crabtree Effect* o "Efecte Crabtree". En grans trets, el fenomen causa una ràpida conversió del glúcid en energia.

Conseqüentment, la reacció es manifesta en l'alliberació de diòxid de carboni (CO₂) i etanol (C₂H₅OH) al seu entorn com a subproducte. El llevat *S. cerevisiae* sol créixer exponencialment quan el seu medi està format principalment de glucosa o fructosa, les quals usen com a font d'energia de carboni.

Quan es troba en presència d'aire, la degradació de la glucosa es produeix bàsicament mitjançant la fermentació aeròbica, un procés que consisteix en l'assimilació de la matèria orgànica en presència d'oxigen i nutrients.

En canvi, quan el llevat creix sobre manosa, un glúcid que compon polisacàrids situats a les plantes, o galactosa, la degradació es produeix de manera simultània a través de la respiració i la fermentació. En la situació en qüestió, el resultat és causat per la repressió de la síntesi de diversos enzims respiratoris per altes taxes de fermentació. (De Deken, 1966)



Funcionament del Crabtree Effect (Maicas, 2020)

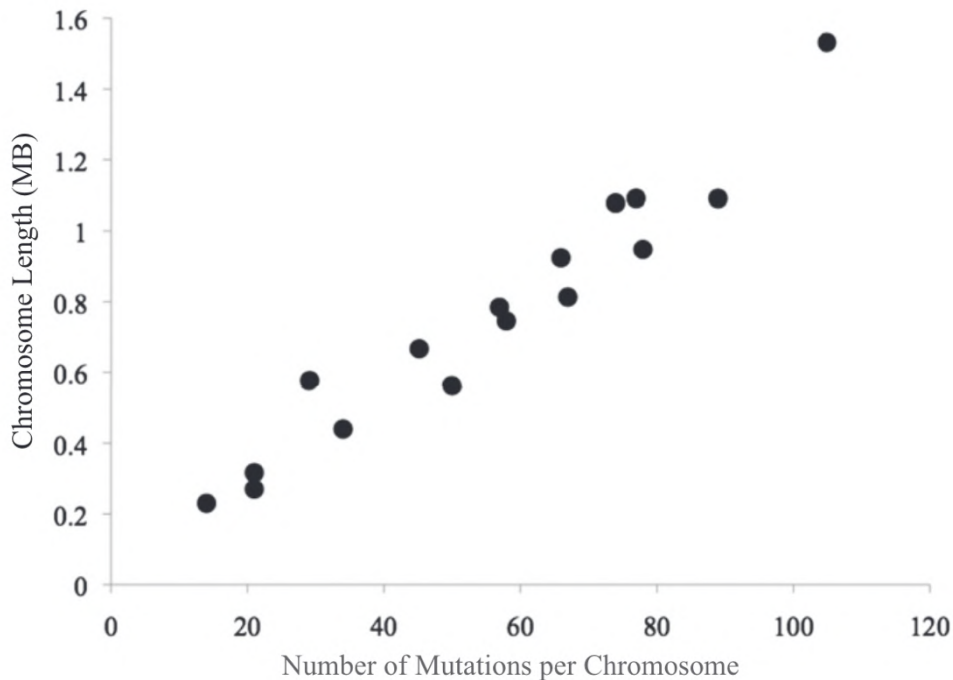
El sistema regulador “Efecte Crabtree”, per tant, consisteix en una repressió d’una font d’energia, la respiració, per una altra font d’energia, la fermentació. És sovint referit com a *Contre-Effet Pasteur* o “Contra-Efecte Pasteur” a causa de la seva completa dissimilitud amb l’*Effet Pasteur* o “Efecte Pasteur”, el qual consisteix en la inhibició de l’activitat de la via de fermentació per respiració. (Perez-Samper et al., 2018)

La variació dels trets quantitius entre individus és sovint produïda per la presència de mutacions en el genoma que disminueixen o augmenten l'activitat de l'RNA i de les proteïnes, les quals contribueixen principalment a l'aparença fenotípica d'un tret o d'una malaltia, entre d'altres. De la mateixa manera, els humans mostrem diferències físiques resultants d'algunes variacions entre genomes com les espècies de llevat desenvolupen diverses tècniques de metabolisme i digestió, concretament, de la maltosa en el cas que es tracta.

Quant al llevat, el tret del metabolisme de la maltosa és variable entre individus genèticament diferents ja que alguns creixen ràpidament i altres ho fan més lentament. Per això, es realitza la hipòtesi que hi ha mutacions que permeten que algunes espècies de llevat creixin més eficientment a un medi ric en maltosa en comparació amb altres llevats. Tot i això, i ha molts altres factors a tenir en compte alhora de valorar l'estat de creixement d'un organisme, concretament, del llevat en el cas que es tracta. En l'article *Investigation of the Best Saccharomyces cerevisiae Growth Condition* es redacten les proves que es duen a terme per tal d'extreure'n les conclusions més encertades sobre les variables més favorables pel seu desenvolupament. El pH i el percentatge de *dissolving oxygen* (DO) són els dos paràmetres optimitzats amb l'objectiu de proporcionar la millor situació per al creixement excessiu del llevat. S'estudien diverses equacions i programes matemàtics per a quantificar el procés de creixement del llevat, entre elles l'equació de creixement de Richard i el programari matemàtic Matlab, els quals s'adeqüen a les dades. La valoració del creixement de cèl·lules de llevat en diferents condicions demostra que el pH equivalent a 4 i el DO al 5% garanteixen les òptimes condicions per la reproducció i creixement de les cèl·lules de llevat. (Salari & Salari, 2017)

Per provar que les modificacions genètiques causen diferències en l'eficiència del desenvolupament, es mesura la cinètica de creixement en maltosa com a única font de carboni com a substitut de la seva obtenció per fermentació en 36 aïllats salvatges de llevat. En primer lloc, cal esmentar que les espècies de llevat que s'usen en l'estudi formen part de la mateixa espècie de *S. cerevisiae*, la qual cosa significa que, normalment, entre individus es mostren clares coincidències de gens o segments de DNA que codifiquen factors d'RNA i proteïnes. És per això que, malgrat es presenciïn algunes lleugeres variacions, gran part del genoma resulta en concurrències entre espècies. De fet, les seqüències dels gens semblen estar estretament relacionades perquè, estadísticament, solen mostrar entre una i dues diferències per cada miler de parells de bases, el qual és un nombre similar a les alteracions dels humans. No obstant això, atès que el llevat ha evolucionat de forma massiva i independent durant moltes generacions, amb el temps ha acumulat i arrossegat moltes mutacions diferents que ha causat diverses diferències entre espècies. Tot i que la major part de les seqüències de DNA en qüestió són neutres, és a dir, que no causen cap efecte

determinant sobre els trets quantitius que es mesuren, altres mutacions poden tenir un impacte que provoqui variacions en almenys un tret, com ara la fermentació de la maltosa. De fet, la mutació és la font última de la variació genètica. Les mutacions espontànies són la font de tota variació genètica de la naturalesa. La metodologia més imparcial i directa d'investigació sobre les mutacions espontànies en *S. cerevisiae* és mitjançant les línies d'acumulació de mutacions (MA). La taxa d'aparició de mutacions i les proporcions relatives de mutacions tant avantatjoses, neutres com perjudicials, resulten determinants envers la manera en què les espècies desenvolupen la seva evolució i adaptació als reptes selectius. Fins fa poc, la recerca d'MA es trobava limitada i restringida per l'elevat cost de la seqüenciació. Per tant, se'n proporcionava un nombre reduït d'esdeveniments mutacionals que desemboquen en imprecisions en les estimacions de taxes i patrons de mutació, els quals es consideren pràcticament negligibles. L'actual coneixement de les mutacions espontànies és encara incomplet degut a la impossibilitat d'aconseguir un nombre suficient d'esdeveniments mutacionals completament imparcial, tot i que l'anàlisi de patrons sigui un mètode estadísticament rellevant que s'usa per estudiar les taxes relatives de diferents tipus de mutacions. Malgrat això, s'ha estudiat que la longitud del cromosoma és directament proporcional a l'aparició de mutacions respectivament. (Zhu et al., 2014)



Representació de la relació entre la llargada d'un cromosoma i el nombre de mutacions resultants (Zhu et al., 2014)

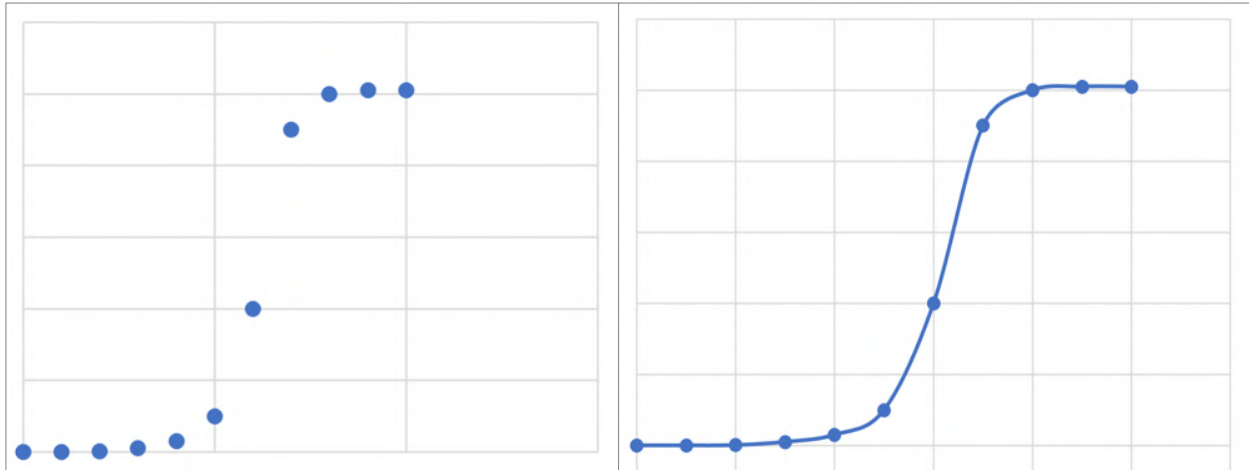
Per a poder valorar l'estat de creixement del llevat cal tenir en compte alguns aspectes sobre les tècniques d'interpretació requerides i altres conceptes abans de poder corroborar l'aparentment òptim rendiment de l'espècie RMI I-IA i l'escassa productivitat de la BY4741 o S288c. És essencial saber que el creixement és un dels trets quantitativs més rellevants i alhora fàcils de mesurar en els microbis. L'atribut és quantificable mitjançant un continu seguiment del recompte de cèl·lules que constitueixen una població respecte al temps. Per tant, tenim dues variables que s'interposen en un mateix gràfic. Un cop es realitzen elevades quantitats de mesures sobre la mida poblacional respecte en el temps, l'estudi rep el nom de "corba de creixement". Això es deu a la possibilitat d'interpolació dels punts de dades amb l'objectiu de crear una gràfica lineal que s'ajusti el màxim possible al desenvolupament real. Cal recordar que la connexió de punts per ull comporta un reduït marge d'error, que disminueix quan l'estudi és realitzat en terminis més curts. Per això, també es pot comprovar la veracitat dels resultats mitjançant una equació que respecta el comportament d'un individu respecte el creixement.

Típicament, les corbes de creixement són monotòniques, és a dir, que només mostren increment respecte el temps. Malgrat això, al llarg de la corba es poden presentar diferents taxes de creixement. La corba de creixement es pot dividir en tres etapes basades en els períodes de taxa de maduració quan s'introdueix l'organisme en un mitjà ric en nutrients: la fase de retard, l'exponencial i l'estacionària.

En primer lloc, les cèl·lules tenen un període d'adaptació anomenat "**fase de retard**", el qual sol comportar un període de creixement relativament lent o pràcticament nul. En l'estat d'habitació, l'organisme valora el medi i les possibilitats que s'ofereixen per garantir el seu rendiment.

En segon lloc, segueix un període de taxa de creixement màxima anomenat "**fase exponencial**", el qual representa els instants en què la cinètica és més elevada i quan les cèl·lules podran créixer en un entorn determinat. Com diu el mateix nom, el creixement mostra una tendència exponencial, per la qual cosa és difícilment quantificable sense contemplar marges d'error. La fase exponencial seria eterna, però és l'escassetat de nutrients el que causa el tancament de l'etapa. És necessari finalitzar-la perquè, en el cas hipotètic que l'abastiment de nutrients fos interminable, s'arribaria a una mida astronòmica de la població amb efectes desorbitats. Tanmateix, les cèl·lules assoleixen densitats molt elevades d'unitat cel·lular per volum bastant ràpidament després de detectar-se la fase exponencial, per la qual cosa comencen a esgotar els nutrients disponibles i secreten metabòlits tòxics, de manera que s'inicia la desacceleració de la cinètica de creixement.

Finalment, l'aturament arriba a un altiplà, moment en què la població de cèl·lules deixa de créixer. L'etapa final sense creixement s'anomena "**fase estacionària**". Les cèl·lules romanen en l'estat d'estabilitat en què el grau de creixement és negligible fins la finalització del seu cicle vital.



Representació de les tres fases en la corba de creixement

El recompte de cèl·lules en una corba de creixement normalment es determina mitjançant una mesura de densitat anomenada densitat òptica. La tècnica usa el fet que un elevat nombre de cèl·lules en una columna de medis de creixement absorbiran més la llum que els medis de creixement sense cèl·lules. És més sensible als canvis en el recompte de cèl·lules quan les cèl·lules es troben més a prop del final de la corba de creixement, per la qual cosa s'ha de mesurar amb precisió la velocitat de creixement en el punt en què les cèl·lules es poden detectar amb la màquina, excepte on es la densitat cel·lular és baixa i els nutrients no s'han esgotat encara. Per mesurar les corbes de creixement en l'experiment, s'usa un lector de plaques que mesura l'absorbància d'un volum de cèl·lules durant un seguit d'hores. Per a les anàlisis, es determina la fase de retard i la taxa de creixement màxima, els quals són els trets quantitius de creixement que es tenen en compte. La tècnica de densitat òptica, com altres tècniques de dispersió de llum per controlar la concentració de cultius purs, té el gran avantatge de ser ràpida i no destructiva. Malgrat això, no permeten mesurar el nombre de cèl·lules ni les unitats formadores de colònies o UFC. No obstant, la dispersió de la llum està íntimament relacionada amb el pes cel·lular ja que la llum travessa la suspensió de microorganismes de manera que es radia tota la llum que no s'absorbeix. És un procés realment complex degut a que hi ha una quantitat important de física implicada. (Sutton, 2011)

Es pot suposar que el creixement cel·lular es veu afectat per la variació genètica en només un i fins a tres gens, que posteriorment s'identifiquen per aportar-los artificialment. El creixement cel·lular requereix diversos factors diferents de proteïnes o ARN codificats per a funcionar correctament, cadascun codificat

per almenys un gen. Per exemple, cal una gran producció de ribosomes i ARNt per a permetre la producció de proteïnes. Els ribosomes i l'ARNm que tradueixen han de ser transcrits per l'ARN polimerasa. Els components bàsics de l'ARN, els nucleòtids o àcids nucleics, i de la proteïna, els aminoàcids, han de ser produïts per proteïnes especialitzades. Altres proteïnes catalitzen els processos químics que converteixen els nutrients en components útils per a blocs nuclears i aminoàcids. També cal recordar que tots els passos necessiten energia per avançar, de manera que també es necessiten proteïnes especials per a la producció d'ATP. Això pot incloure la fermentació, on l'ATP es genera molt ràpidament però de manera ineficient, o mitjançant la respiració, que és un procés més lent que implica moltes proteïnes i orgànuls, inclosos els mitocondris, però que produeixen més ATP per molècula de carboni en comparació amb la fermentació. Tots factors descrits són necessaris per al creixement independentment de quina font de carboni s'hagi presentat a les cèl·lules. De fet, altres persones han mesurat que el creixement en les condicions més simples és un tret quantitatiu, és a dir, que és variable entre aïllats de llevat amb forts determinants genètics.

Per controlar l'efecte, s'usen un parell de mesures experimentals i manipulacions. En primer lloc, només es proporciona una única font de carboni, com la maltosa. Per tant, l'únic mitjà per obtenir ATP per a la cèl·lula és, com pugui, ingerir la font de carboni donada, ja sigui mitjançant la respiració, que condueix a un creixement ineficient, o per fermentació, que dona lloc a un creixement més ràpid. Seguidament, fins i tot si les cèl·lules són capaces d'alimentar-se de la maltosa, poden mostrar diferències de velocitat entre diversos llevats pel fet de contenir mutacions que afecten els processos cel·lulars necessaris en el genoma. Per controlar-ho, es mesuren les corbes de creixement dels llevats que creixen en fonts de carboni que no requereixen maltosa, com la glucosa que es consumeix per fermentació, i potser una altra font de carboni, com el glicerol, que requereix respiració. Un cop s'efectuen els passos esmentats, es podrà tenir una imatge més concisa de l'efectivitat del llevat respecte la fermentació de maltosa per a poder identificar els gens que, un cop es codifiquen, permeten que alguns l'efectuïn més satisfactòriament que d'altres. Malgrat això, i com s'ha comentat anteriorment, no són només les diferències genètiques les que determinen la capacitat de creixement del llevat. Són altres influències tant internes com externes, com ara les mediambientals, les que també participen en el procés i que, per tant, també s'hauran de contemplar com variables estables. De fet, diversos experiments efectuats sobre la fermentació del llevat per l'elaboració de cervesa, vi i altres productes, demostren que els canvis en la temperatura, el pH i la concentració de sucre poden afectar el creixement del llevat, el qual mostra un creixement òptim a baixos nivells de pH, una elevada concentració de sucre i temperatures properes als 24°C. (Arroyo-López et al., 2009)

3.1.4. Part experimental

3.1.4.1. Eines i recursos

Per tal de dur a terme l'experiment s'han fet servir diverses aplicacions i recursos digitals esmentats a continuació. Concretament, s'han utilitzat l'Artemis, l'ApE, el BLAT, el MultAlin i el Saccharomyces Genome Database.

A més, el genoma de l'espècie BY4741 s'ha obtingut del següent enllaç de la pàgina del [National Center for Biotechnology Information](#).

En canvi, el genoma de l'espècie RM11-1A s'ha descarregat del següent recurs, també pertanyent al [National Center for Biotechnology Information](#).

3.1.4.2. Procediment

Per començar, es descarrega el genoma de l'espècie RM11-1A i es divideix en 17 documents diferents, cadascun corresponent a la informació genètica d'un cromosoma anomenat *scaffold*, és a dir, cromosomes formats per seqüències que estan ordenades, però no necessàriament connectades en el mateix tram.

Seguidament, amb l'espècie BY4741 es descarreguen 16 documents que contenen la seqüència de nucleòtids dels cromosomes pertinents.

Cal remarcar que la col·linealitat entre les dues espècies de llevat es determina a través de la introducció de seqüències dels diferents *scaffolds* corresponents al RM11-1a en el [BLAT](#), el qual determinarà en quin cromosoma es troba la mateixa seqüència en l'espècie BY4741. Per fer-ho, cal seleccionar l'espècie *S. cerevisiae*, introduir el símbol ">" i afegir un títol que descriu la seqüència inserida. Seguidament, s'enganxa el fragment en qüestió i es fa *click* a *submit*. A continuació apareix en pantalla una taula la següent informació: *identity*, cromosoma, *strand*, *start* i *end* i *span*.

La **identity** mostra el percentatge de coincidència entre la seqüència d'RM11-1A introduïda i la possible corresponent de l'espècie BY4741.

El **cromosoma** indica la localització dels nucleòtids inserits en el genoma BY4741.

L'**strand** pot ser positiu (+) o negatiu (-) i indica en quin sentit es troba la seqüència de DNA de l'RM11-1A en el cromosoma del BY4741. La informació que aporta és útil sobretot en passos posteriors que es realitzen amb un programa anomenat Artemis.

L'**start** i l'**end** indiquen el número de les bases en les quals comença i acaba la coincidència en el genoma del BY4741. Es tracta també d'una eina útil a l'hora de treballar amb Artemis.

L'**span** és la diferència entre el valor més gran i el més petit de l'*start* i l'*end*. Per tant, representa la dimensió de la seqüència que coincideix.

Per poder determinar quina *scaffold* del RMII-1a correspon a quin cromosoma del BY4741 el més important és fixar-se en el cromosoma que mostra nombres més elevats en la *identity*, així com en l'*span*. Seguint els passos, s'arriba a la conclusió que el cromosoma 7 de l'espècie BY4741 correspon a l'*scaffold* 2 de l'espècie RMII-1A, mentre que el cromosoma 11 ho fa amb l'*scaffold* 9.

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHROM	STRAND	START	END	SPAN
browser details	RM_SCAF2	799	1	799	799	100.0%	chrII	-	805714	806512	799
browser details	RM_SCAF2	795	1	799	799	99.8%	chrVII	-	1076962	1077760	799
browser details	RM_SCAF2	229	457	799	799	83.4%	chrVII	+	1068283	1068625	343
browser details	RM_SCAF2	187	525	799	799	84.0%	chrXV	+	23654	23928	275
browser details	RM_SCAF2	183	525	799	799	83.3%	chrX	+	17896	18170	275
browser details	RM_SCAF2	183	525	799	799	83.3%	chrIX	+	17913	18187	275
browser details	RM_SCAF2	74	673	781	799	91.1%	chrX	+	25609	25717	109
browser details	RM_SCAF2	16	186	201	799	100.0%	chrVII	+	429053	429068	16

Fotografia del funcionament del programa BLAT

Per a poder visualitzar els nucleòtids del genoma s'ha utilitzat el programa ApE, el qual facilita l'observació de les seqüències i els aminoàcids que codifica. Per obrir els documents amb la informació de cada cromosoma és necessari tenir-los en format “.gb”.

Paral·lelament, amb l'ajuda de dos documents Excel obtinguts de [Princeton](#), s'han pogut extreure uns valors numèrics que han determinat quins cromosomes s'estudiarien.

El valor numèric en qüestió s'anomena *QTL score*, el qual no té una fórmula concreta ja que s'adapta a cada cas en concret. *QTL* significa *Quantitative Trait Locus* o locus de caràcters quantitius. No obstant, en cada estudi, sempre comparteix la seva utilitat, la qual es centra en la identificació d'un locus, és a dir, una secció o regió del DNA d'un individu el qual s'associa a un tret fenotípic en particular. En el locus, la variació al·lèlica es troba lligada, per tant, a la variació d'un caràcter quantitiu, el qual conté caràcters quantificables que canvien contínuament de manera natural.

A més, en les recerques que centren el seu treball en els resultats del *QTL score*, l'anàlisi per a un caràcter implica escollir i creuar dues línies progenitores que es caracteritzin per diferir en caràcters quantitius i, seguidament, estudiar la segregació descendent.

De fet, el QTL es fa servir per comprendre i realitzar prediccions en relació als efectes de les mutacions, per relacionar les variacions genotípiques de DNA amb les variacions fenotípiques entre individus. Les seqüències del genoma d'un individu es fan servir per predir el DNA que va heretar dels seus progenitors o el que passarà a la nova generació a través de la seva línia germinal, els seus gàmetes, que representa la meitat del seu DNA. Considerant els vincles genètics entre individus explicats i les diferents característiques que mostren a partir de les seves seqüències, es duen a terme estudis que relacionen el genotip amb el fenotip d'una característica determinada en una població fent servir mesures fenotípiques quantitatives. (Bloom et al., 2013)

Les variacions genètiques que causen malalties estan estretament lligades a mutacions que tenen un efecte neutral. El lligament genètic entre elles fa referència al fet que són seqüències de DNA que es troben relativament a prop en un cromosoma i que tenen tendència a ser heretades juntes durant la fase meiótica del cicle cel·lular. Conseqüentment, el mapatge QTL normalment és incapaç de detectar quina mutació particular és la causa de l'efecte fenotípic d'arrel, i, per tant, pot portar a deixar de banda alguns mecanismes de malalties o de variacions fenotípiques. Les mutacions en qüestió són normalment polimorfismes puntuals, també anomenats d'un sol nucleòtid o SNP (Single Nucleotide Polymorphism), que són una variació en la seqüència de DNA que afecta a una sola base d'una seqüència del genoma, adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C). (Bull, 2013; Shastry, 2007)

Actualment, el QTL comporta la cerca de relacions possibles entre els diferents marcadors de DNA obtinguts i els fenotips, en el nostre cas a partir d'individus que procedeixen de un parell de línies realitzades amb selecció artificial que divergeixen per un caràcter específic, concretament la fermentació de maltosa en les espècies RM11-1A i BY4741.

Per a poder calcular els valors necessaris pel mapatge genètic, cal dur a terme els següents procediments: En primer lloc, es parteix d'ambdós fitxers Excel proporcionats per Princeton. Cal saber que els dos documents representen el creuament BYxRM, el material necessari per a realitzar un estudi amb QTL score, com s'ha esmentat anteriorment. Els arxius s'anomenen "BYxRM_GenoData.txt" i "BYxRM_PhenoData.txt", per la qual cosa es sap que es treballa amb dades tant genotípiques com fenotípiques.

El primer document mostra una fila horitzontal la qual determina quin resultat correspon a cadascun dels creuaments realitzats que s'especificaran amb la nomenclatura Ax_y, en què "x" representa el cromosoma en qüestió i "y" enumera les rèpliques, els segregants. Alhora, es relaciona amb la columna anomenada

“Marker” o marcador, el qual mostra per regions si el DNA que conté el descendent en la zona en concret correspon o bé a l'espècie RMI I-IA o a la BY4741, les quals es simplificaran amb R i B, respectivament. Posteriorment, per a poder convertir la informació d'alfabètica a numèrica, es substitueix l'R i B de cada cel·la per un -I i I de manera respectiva amb les eines computacionals que proporciona el programa Excel, de manera que les diferències siguin fàcilment identificables.

Marker	A01_01	A01_02	A01_03
27915_chr01_27915_T_C	R	B	R
28323_chr01_28323_G_A	R	B	R
28652_chr01_28652_G_T	R	B	R
29667_chr01_29667_C_A	R	B	R
30756_chr01_30756_C_G	R	B	R
31059_chr01_31059_G_A	R	B	R
31213_chr01_31213_G_A	R	B	R
31636_chr01_31636_T_C	R	B	R
31756_chr01_31756_C_T	R	B	R
31976_chr01_31976_C_T	R	B	R
32512_chr01_32512_C_T	R	B	R
32884_chr01_32884_C_T	R	B	R
33041_chr01_33041_A_G	R	B	R

Exemple del primer document de creuaments i identificació de segments de DNA

El segon document, en canvi, mostra verticalment de manera ordenada els diferents segregants obtinguts i, horitzontalment, ofereix els diferents medis en què es pot exposar l'organisme en qüestió. Les condicions exteriors condicionen extremadament els resultats, i algunes de les possibles que hi ha en el document són l'etanol, la galactosa o la lactosa, entre d'altres. Concretament, per l'estudi que es realitza només s'usa la columna anomenada “Maltose”, ja que és la maltosa el glúcid de què se'n valora la fermentació. Els valors del fitxer són intrínsecs i arbitraris, per la qual cosa el fenotip es representa amb nombres obtinguts a partir de càlculs únicament assequibles amb material professional.

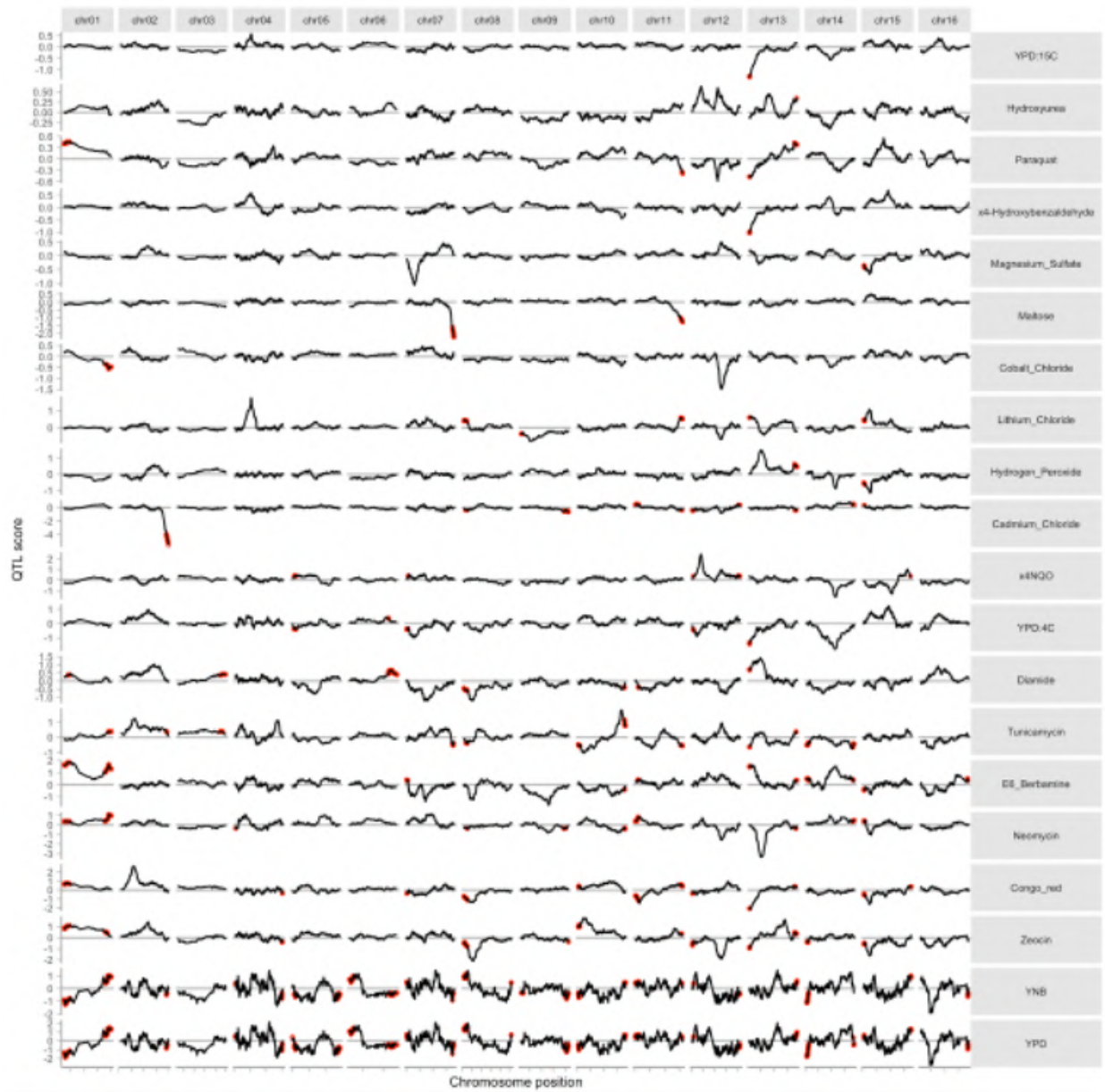
	Maltose	Ethanol	Galactose	Lactose
A01_01	-3.9450668	-0.6449544	1.46869951	-0.5204038
A01_02	-5.3973515	-0.2030377	1.74459605	-0.5869944
A01_03	4.18990132	-0.1005424	2.12805734	0.84099177
A01_04	2.08106639	-1.7287674	-0.831582	-1.6977335
A01_05	1.05309069	0.81528873	2.01943952	-0.1869455
A01_06	2.36604069	-0.4257716	0.63545767	1.44899776
A01_07	0.96258887	1.19632738	0.07975377	-0.9316177
A01_08	-0.424313	-2.1099101	-0.9400786	-0.7242774
A01_09	-1.1184188	-0.1077907	-0.4528398	-0.4829575

Exemple del segon document de segregants i medis d'exposició

En segon lloc, un cop es tenen tots els valors numèrics disponibles, s'ha de multiplicar el nombre fenotípic corresponent a cada segregant de la columna del medi de maltosa amb els nombres genotípics del mateix, els quals han estat anteriorment substituïts, com s'ha especificat abans, per “-1” (RM11-1A) i “1” (BY4741). El mateix procediment es realitza amb tots els segregants, de manera que s'obtenen tots els QTL scores necessaris per l'estudi.

En tercer lloc, cal reduir tots els resultats en un de sol que els representi. Per això, s'ha de realitzar una mitjana aritmètica per a cada fragment de cada cromosoma, de manera que es tenen valors més inclusius i propers al comportament real. Els números es representen en el següent gràfic, on es pot veure el mateix procediment per cada medi en què es puguin exposar.

Per tant, verticalment es mostren els 16 cromosomes i, horitzontalment, la substància exterior. Cada petit gràfic mostra, per tant, que les regions situades a la part superior o positiva pertanyen al material genètic de l'espècie BY4741 o S288c mentre que les zones situades a la part inferior o negativa corresponen al material genètic de l'espècie RM11-1A.



Gràfic que mostra la mitjana aritmètica dels resultats obtinguts (QTL score) i els medis d'exposició

Els resultats de la fila “Maltose” mostren que són els cromosomes 7 i 11 els que contenen regions de color vermell o *flagged*, les quals el programa assenjala al demanar-li que ressalti les zones amb valors elevats i propenses a mostrar complicacions i variacions. Així, es poden identificar els cromosomes en què s’ha de centrar l’estudi i on, per tant, es trobarà la mutació que causa que l’espècie BY4741, a diferència de l’RMI I-IA, no pugui fermentar correctament la maltosa. És realment útil dur a terme els passos anteriors per a obtenir els QTL scores, ja que permeten enfocar la direcció de la recerca més específicament i faciliten el treball.

Si no s'hagués produït cap mutació, els valors del gràfic del QTL score mostrarien una tendència al valor neutre, "0", el qual significaria una equitativa proporció de material genètic procedent de l'espècie BY4741, el qual tendeix a "1" i de l'espècie RM11-1A, el qual tendeix a "-1". El fet que les zones subtelomèriques dels cromosomes 7 i 11 tendixin valors corresponents a l'espècie RM11-1A, indica que, en les regions en qüestió, l'espècie BY4741 conté gens incapaços de fermentar la maltosa, el medi en què es troba el llevat quan s'avalua el seu creixement.

Un cop es sap que és en els cromosomes 7 i 11 on s'han produït les mutacions que impossibiliten que l'espècie BY4741 mostri un creixement positiu en un medi constituït per maltosa, s'efectua l'estudi de manera més concreta.

En primer lloc, és necessari obrir amb el programa Artemis el cromosoma 7 del BY4741 i l'*scaffold* corresponent del RM11-1A que, després d'haver fet les relacions pertinents anteriorment, es sap que és la número 2. En ambdós casos és necessari tenir els documents en format "genbank". A partir de la informació que ens proporcionen els gràfics del QTL score, es pot saber que la mutació en el cromosoma 7 es troba a l'extrem dret de la seva seqüència. Tenint en compte que les regions subtelomèriques es troben en les primeres i últimes 30.000 - 50.000 bases d'un cromosoma, s'agafa una seqüència de l'*scaffold* 2 del RM11-1A contigua a les zones esmentades i s'introdueix al BLAT seguint les instruccions explicades anteriorment. Cal destacar que la seqüència seleccionada ha de ser prèvia al subtelòmer, ja que les regions subtelomèriques mostren molta variabilitat a causa de la pèrdua d'heterozigotisme i podrien no identificar-se amb cap altre cromosoma. Per obtenir la seqüència de nucleòtids amb l'Artemis s'ha de seleccionar la seqüència desitjada i prémer *View, Bases, Bases Of Selection As FASTA* i copiar la seqüència que apareix. Els resultats mostren en quina posició del cromosoma 7 ha coincidit la seqüència i en quin sentit ho ha fet. Llavors, es necessita identificar quina regió del genoma de l'RM11-1A correspon al final del genoma del cromosoma 7 del BY4741. S'ha de considerar que si l'"strand" és positiu es seleccionen les bases de la cadena superior 5'→3', en canvi, si és negatiu es seleccionen les de la cadena inferior 3'→5'. Si es realitzen el tipus de proves descrit s'evidencia una clara inversió del genoma entre les dues espècies, de tal manera que es conclou que l'extrem dret del cromosoma 7 del BY4741 en el qual es troba la mutació correspon a l'extrem esquerre de l'*scaffold* 2 de l'RM11-1A. Partint de la informació obtinguda, es seleccionen seqüències del final del cromosoma 7 del BY4741 i seqüències del principi de l'*scaffold* 2 de l'RM11-1A que incloguin part de regió subtelomèrica i no-subtelomèrica. Ambdues seqüències s'introdueixen al MultAlin, una plataforma que realitza alineaments automàtics entre elles. De la mateixa manera que es fa en el BLAT, cal seguir el format FASTA, el qual consisteix en introduir el símbol ">", un títol i finalment la seqüència. Abans de realitzar l'alineament s'ha de seleccionar el format "coloured Html

text” per a obtenir uns resultats que evidencin les diferències entre ambdues seqüències i el *break*. És important que els fragments constin d’una quantitat de bases semblant per tal de garantir que l’alineament es pugui realitzar. Un cop es troba el punt en què hi ha tingut lloc la pèrdua d’heterozigotisme, el *break*, es copien els nucleòtids previs corresponents al cromosoma de cada espècie.

```

911
BY_CHR7 CAACGCCTGC TTCAAAGTCA TGCCTTTTTTC CTCGCTGTTA GCTTCATTGG CATCATCAGT AGCGTTTCATC TCATTAATCA CATTCTCGTT ATCTTCGTCA GAATCTCCTA ACTGGGCTGA ATTGGTGGTG
RM_SCAF2 CAACGCCTGC TTTAAAGTCA TGCCTTTTTTC CTCGCTGTTA GCTTCATTGG CATCATCAGT AGCGTTTCATC TCATTAATCA CATTCTCGTT ATCTTCGTCA GAATCTCCTA ACTGGGCTGA ATTGGTGGTG
Consensus CAACGCCTGC TTCAAAGTCA TGCCTTTTTTC CTCGCTGTTA GCTTCATTGG CATCATCAGT AGCGTTTCATC TCATTAATCA CATTCTCGTT ATCTTCGTCA GAATCTCCTA ACTGGGCTGA ATTGGTGGTG

1041
BY_CHR7 AACTCTAAGT GGTCTAGTCT AAAGGCACTA TCCTTTTTTC CTTCTTCAAA ATCTTCAGTA TTGAAAACCT CTTGTTGGTT TACAATATCT CTTGAAGACT CAGAAATGTT TTTATCCTCA TTTTGTGAGG
RM_SCAF2 AACTCTAAGT GGTCTAGTCT AAAGGCACTA TCCTTTTTTC CTTCTTCAAA ATCTTCAGTA TTGAAAACCT CTTGTTGGTT TACAATATCT CTTGAAGACT CAGAAATGTT TTTATCCTCA TTTTGTGAGG
Consensus AACTCTAAGT GGTCTAGTCT AAAGGCACTA TCCTTTTTTC CTTCTTCAAA ATCTTCAGTA TTGAAAACCT CTTGTTGGTT TACAATATCT CTTGAAGACT CAGAAATGTT TTTATCCTCA TTTTGTGAGG

1171
BY_CHR7 CAGCCTTCTT CTTGCTTACC AATGAAATGA TATTTTTCAT ATTATACTAT TTTTGTAGTT GTTTGATGTT CTCTATGTA GCATCAGAAA GAAACACCAA CCGGAAAATT CTTCAAACAA TCAATACCAA
RM_SCAF2 CAGCCTTCTT CTTGCTTACC AATGAAATGA TATTTTTCAT ATTATACTAT TTTTGTAGTT GTTTGATGTT CTCTATGTA GCATCAGAAA GAAACACCAA CCGGAAAATT CTTCAAACAA TCAATACCAA
Consensus CAGCCTTCTT CTTGCTTACC AATGAAATGA TATTTTTCAT ATTATACTAT TTTTGTAGTT GTTTGATGTT CTCTATGTA GCATCAGAAA GAAACACCAA CCGGAAAATT CTTCAAACAA TCAATACCAA

1301
BY_CHR7 ACCGCTTTAT ATAAAAAATT AAGATGTCGA CATTCCCTAT TTTTACTGA GTTCGTTAAA GTTGGGTACA CTCTGATTA CTGTAATTGT CTCTGTATGT CCCTCAAGCC CGGTACGTTG TCATTTTCTA
RM_SCAF2 ACCGCTTTAT ATAAAAAATT AAGATGTCGA CATTCCCTAT TTTTACTGA GTTCGTTAAA GTTGGGTACA CTCTGATTA CTGTAATTGT CTCTGTATGT CCCTCAAGCC CGGTACGTTG TCATTTTCTA
Consensus ACCGCTTTAT ATAAAAAATT AAGATGTCGA CATTCCCTAT TTTTACTGA GTTCGTTAAA GTTGGGTACA CTCTGATTA CTGTAATTGT CTCTGTATGT CCCTCAAGCC CGGTACGTTG TCATTTTCTA

1431
BY_CHR7 GTACGCATCA ACGGAGTGT ACATGATAGA TAGACCGAGT AGAATCTATG GCTATGGGGT AATTAANAAC TTAAAGCTCC TTTTCGCTGCC ATAGTAATAC GAATAGACCT TGGCTATAGT AAGTGCATC
RM_SCAF2 GTACGCATCA ACGGAGTGT ACATGATAGA TAGACCGAGT AGAATCTATG GCTATGGGGT AATTAANAAC TTAAAGCTCC TTTTCGCTGCC ATAGT---TCG TGATATTCTC TGGAGGACCA AAACCCAAAG
Consensus GTACGCATCA ACGGAGTGT ACATGATAGA TAGACCGAGT AGAATCTATG GCTATGGGGT AATTAANAAC TTAAAGCTCC TTTTCGCTGCC ATAGT..Tac gaATAgaCcc TGGagaaca AAcccaAac

1561
BY_CHR7 TGTACCGTAG AGATTCTGC AACTCGCTTA AACTCTCGCT TTTAGATAAT ATTTCTCCTT ATTGCGCGCT TCGTTGAAAA TTTTCGTAAG CACGGGGTGT AAGTTAAAGT TTACAGGATT TATCCGGAAA
RM_SCAF2 GCAAATATTT AGGCAAAGGA AAAAAACCTT GTTCTCTGCG CGAAAAGTCA AACAAATAG AAGCGGAACA AAAGAAACGT TTAACCAAG CACGATAATT GAG---AAGGT AAGCCAAAGC GTTCAATGGC
Consensus gcaAacaTag AGcaaaagGa AaaaaCctTa aaccCTCGCG cgaAaAgaAc Aacaaaacag AagccGaaCa aaagaaAaaa TTAaaCcaAa CACGagaaTT aAG..AAaGT aaaCaaaacc gaTCaagaaa

1691
BY_CHR7 TTTTCGCGGA CCCCCACAA TTAAGAATTG GCTCGAAGAG TGATAACGCA TACTTTTCTT TTTCTTTTTT AGTTCCTAGC GTACCTAACG TAGGTAACAT GATTGG---A TCGTGGGATG ATACAAA---CA
RM_SCAF2 ATGTACCGGA AATATCACTT TTTTATGTTA AATTCACCAA TATAGACACA GA---TTCGT AGCATAAATAT GA---CCATAA TTATCTCATA ATATGACCAT AATTATCTCA TAATAGGTAA ACGCGATTCT
Consensus aTgTAcCGGA aacaaCACaa TTTaaaagTa aaTccAacAa TaaaaACaCa gA...TTCgT agCaTaaTaT aa...CCaaaa gTAcCTaAca aaaggAaCAT aATTgC..A TaaTaGgaaa AcaCaAa..Ca

1821
BY_CHR7 ACGTAAAGAT AATAGTCTCT -TCCTCA-AT TCTTCTTGA GCATCATTT- ----TCTTgag GCGCTCTGG CAAGGTATAA AAAGTTCAT TAATACGCTC CTAaaaaATT AAATCATCCA TCTCTTAAGC
RM_SCAF2 TCTTATGCCA CAACGTCCAA GACTTCATAT TTTTCTTTTA GCACAATTAG TGCTCTTTTC AGGAGAAGTA CTATGGTTCT GATGTTCCAT CTTCTCTTGA CTTGCTTAAT TCAITTAAC--- TTTATGCAGC
Consensus aCgTaaGaca aAaaGTcCaa .aCtTCA..AT TcTtCTTgca GCaCaATTA. ...TCTTgag acGagaaGga CaAgGgaTaa aAaGTTCCAT caacaCgTca CTaaaaaAaT aaATcAaC.. TcTaTgaAGC

1951
BY_CHR7 AGTTTTTTTG ATAATCTCAA ATGTACATCA GTCAAGCGTA ACTAAATTCA ATAATGACT ATTTCTGATC ATCCAGAAAC AGAACCAAAG TGTTGGAAG AGGCCACAAT CTATCAAAAT -TACCCGGA
RM_SCAF2 AGAGCTCCTT ATGAAATAAA GTCTTTGTAG AGGATGCG-- -CGCAGCAC TGGAAT---T ATTTTCGGTA AAAAAGCCAG CTTGTCAAGT AGGAAGCAGC AGACAAGGAT CTACCGCTTT CTTCCGGCGA
Consensus AGagcTccTg ATaAaaTaAa aTcTacaTaa agcAaGCG.. .CgaAaCaac agaAAT...T ATTTccGaTa AaaaAGaaAc agaacCAaaG aGGaaGaAac AGaCaAcaAT CTACcaaaTT .TaCcaGcA

2081
BY_CHR7 AGTTTTAAAG ACTCCAATA CGATGGCTGG GGTGATTTAA AAGGTATCAC TTCCAAGTTG CAGTATATTA AA-GATCTTG ----CGTTGA TGCTATTGG GTTTGTCCGT TTTATGACTC TCCTCAACAA
RM_SCAF2 CGTCTGGCAG GTATTAGAT ATGTACCTGA GCTCAGACAC ACAATTAAT TTCCGATTGG CATCTGCGC CACGATCATT CTTGCATTGC AG-TATATTC GTACGCAGGA AGTGGGGGAA ACATGGGGAA
Consensus aGTcTgaaAG acaccaAgAa agaTaccTGA GcTcAgacAa AaaaTaaaAc TTCCAagTgG CagcaTacca aA.GATCaTg ...GCaTTGa aG.TATaTgc GTacGcacGa agTagGacaa aCaTcaacAA

```

Alineament amb MultAlin per a la identificació del “break” entre el cromosoma 7 de l’espècie BY4741 i l’“scaffold” 2 de l’espècie RM11-1A.

```

BY_CHR11          CCAGTTACAA TCATGGATA ATACACAAGG CGACGTTCAA ACATGACTGA GGAATGCAG TATTTAAAGC TTACTCTTTC CTCAGTTGAG TACCGTAAAA TCGATTAACA AGCCATTCA ATAGTTATAA
RM_SCAF9          .....
Consensus        .....

1041
BY_CHR11          TTTTTTTTT T--GGTCATG GAAGACCTGA ACTAAAGTGT TTTAGTAAAC CAATTGGAGT GAGAGTTTTT CATTCCGAAG ATTCTTTATC TCAAAATTTT TTTATCGAAA GACACTTCTG TGTCACTGTC
RM_SCAF9          TTTTTCATCA TTTGGTCATG GAAGACCTGA ACTAAAGTGT TTTAGTAAAC CAATTGGAGT GAGAGTTTTT CATTCCGAAG ATTCTTTATC TCAAAATTTT TTTATCGAAA GACACTTCTG TGTCACTGTC
Consensus        TTTTTCATCA TTTGGTCATG GAAGACCTGA ACTAAAGTGT TTTAGTAAAC CAATTGGAGT GAGAGTTTTT CATTCCGAAG ATTCTTTATC TCAAAATTTT TTTATCGAAA GACACTTCTG TGTCACTGTC

1171
BY_CHR11          CGTTCATCA GTCAGATAGT TCCAACCTCC ATGTCTTCCA ATACCTCAAC GAAGACCGAA AAATAAAAGG TTTGTTTGAC GGAGTGTGTT GATTAGTGCA TTGGTGACGT GGGGTAGCAA AATCCAGATA
RM_SCAF9          CGTTCATCA GTCAGATAGT TCCAACCTCC ATGTCTTCCA ATACCTCAAC GAAGACCGAA AAATAAAAGG TTTGTTTGAC GGAGTGTGTT GATTAGTGCA TTGGTGACGT GGGGTAGCAA AATCCAGATA
Consensus        CGTTCATCA GTCAGATAGT TCCAACCTCC ATGTCTTCCA ATACCTCAAC GAAGACCGAA AAATAAAAGG TTTGTTTGAC GGAGTGTGTT GATTAGTGCA TTGGTGACGT GGGGTAGCAA AATCCAGATA

1301
BY_CHR11          CTCTTATTTT TTGAAAAAGA AAAGAGAGAG TGCTAGAATG TTTTCACGTT TATCAGTACA CGAAAAACAA AACCTGAAGC AAATGATTAC CATAACTATT GTCCACTTAT GGGGAAGTTG CTAATAATAA
RM_SCAF9          CTCTTATTTT TTGAAAAAGA AAAGAGAGAG TGCTAGAATG TTTTCACGTT TATCAGTACA CGAAAAACAA AACCTGAAGC AAATGATTAC CATAACTATT GTCCACTTAT GGGGAAGTTG CTAATAATAA
Consensus        CTCTTATTTT TTGAAAAAGA AAAGAGAGAG TGCTAGAATG TTTTCACGTT TATCAGTACA CGAAAAACAA AACCTGAAGC AAATGATTAC CATAACTATT GTCCACTTAT GGGGAAGTTG CTAATAATAA

1431
BY_CHR11          CACATTATTT ACTAAGGGAA CACAATTGC TCATAGTATA CTTGACTTTT TTTACTTAACT TTTTGCAGCG ATTGGTGATG AAA-TGT--- TTCAAAAAAA AAAAAAATC CGAAAAATCA TTGATTGCA
RM_SCAF9          CACATTATTT ACTAAGGGAA CACAATTGC TCATAGTATA CATGACCTTT TTTACTTAACT TTTTGCAGCG ATTGGTGATG AAAAATGAGCA TGCAGACTAA TAGGTAGGAA AGTAGAACTA CTTAGAAAACA
Consensus        CACATTATTT ACTAAGGGAA CACAATTGC TCATAGTATA CaTGACCTTT TTTACTTAACT TTTTGCAGCG ATTGGTGATG AAA.TGa... TgCAaAaaAa aAaaaAaaAa aGaAaAaCc cTgaaaaaCA

1561
BY_CHR11          TAAGAAATGG CGAATTTTGG GCACGAA--- -----ATTA ACTT----- ACATCTCTCC ATT----- --CCTTTCCT CATGAA---A GAACCGTTAT GTTAGC---- TAGCCCTGAA CTT-CATTAT
RM_SCAF9          TTCTCCTTAA -GTGTTTTCA CCACTAAGCA TTTTATATTT AATTGTTAAA AAATATATA TATTGAAGAA CCACCTTTCCT GAAATATCAA GAACAAAAAA GTCTGCACTA TGGTCCCGCA ATTGATGAT
Consensus        TaagaaaTaa .GaaTTTTaa cCACgAA... .....ATTA AaTT..... AaATaTaTaC aaT..... ..aCTTTCCT cAaaaA...A GAACaaaaAa GTcaGC.... TaGcCCcGaA aTT.aTgaaT

1691
BY_CHR11          TTGGAAGGAC CCTCACCTCA ATTTTCAAAT GAA----- ----- -CCGCGGACT TCACCTTCT- ACGTCTGTTT CTTCAAAAAT CTTTCAAC- -----GTAT ATCGCCTGTT
RM_SCAF9          TTGGAATTC TTTTAACTCA ATAGTAATAT GCATTGTTCT TATCTAAAAA ATTGCAGGTA CTGCAGACT AATCCGGGTC ATGATCTGCG CTGGCCCGCT CATCCACCC CGTGCTGCTT GCCACTTGAA
Consensus        TTGaaAagaC ccTcAaCTCA ATagTaAaAT GaA..... ..... .CcGcGACT aaaCgggcT. AcGaTcggcg CTgCaaaaaT CaTcaCAaC. ....GcaT acCaCtGaa

1821
BY_CHR11          GCATTGCCTT TTTCCGAAA CCTTATTTTA CGACAAACCT TTTTGGAGT TAAAGTTTAA AAAATTTCTT CG-----TCTG CCTCAAAAT CGGCAGCTTT AAG---CTTC CAGAATGTT TACACGAAAT
RM_SCAF9          GCTACCCCGG GTTTAATAAT TCGTTCTTTA AGTTCTACA CTTAAATACA GGCAGCTAAA AAACCTGGTT CGAGAGTTT CCACCTTATA GACAAAAATA AAAATACTGC CAGAAAATTT ATCATATAAT
Consensus        GCaacCCggg gTTcAAAaAa cGgTactTTTA aGacaaACaa cTTaaAgaaa gaaAGcTaAA AAAATggtCT CG....TcTg CcAcaaaTa GacaAaaaTa Aaa...CTgc CAGAAaaTTT aaCacaaAT

1951
BY_CHR11          ACCCTAG-CG CTGCATTTCT TTTTTC--C T-CAGTTGCG GTAGTAGA-- AAAGTATTAC AT----- ----- CAGCAGAGT AACCACTTAT GGTGTCAAGT TC
RM_SCAF9          AATATGGGTA TTGCAAAACA GTCTTGCAGC TGCTGTCCGC TTCTGCGAGT AAAGTGTGAC AGGAATAAAC CATGTAATCG CTGCAGCTCAG CGCAATTGA ACTGCACCTA TCTTCAACCG TTGAAAAAGA
Consensus        AacaTaG.ca cTGCaaaaCa gTcTTgC..C T.CaGTcGCG gTaGTagA.. AAAGTaTgAC Ag..... ..... CagCACgaag aaCAACTTaa acTgcaagTa TC.....

2081
BY_CHR11          GAGGTCCAAA ATCCATTAGA GCAGGAAGCT TAAAAAAAT AGCGGAAGTG CAGATGGTGA GTATGAATAA TAATATTATG ACCGCTCCGG TGGTATGTAA GAAGGTTCCG AAAAACCTGA TTGATCAATG
RM_SCAF9          .....
Consensus        .....

```

Alineament amb MultAlin per a la identificació del “break” entre el cromosoma II de l’espècie BY4741 i l’”scaffold” 9 de l’espècie RMI1-1A.

Com es pot veure, el programa MultAlin assenyalava en color vermell les bases coincidents, escrivint a la part inferior una línia de consens de bases. En canvi, quan identifica diferències, les mostra de color blau. Es tracta d’un mecanisme que ajuda a determinar el punt de trencament creat per la pèrdua d’heterozigotat.

3.1.4.3. Resultats i discussió

A l'Artemis, un cop es tenen els nucleòtids anteriors al *break*, es prem *Goto*, *Navigator* ... i finalment *Find Base Pattern*, on s'enganxa la seqüència en qüestió. El programa mostra on es troben els nucleòtids inserits en el genoma i, així, es pot identificar la posició del *break*.

Entry: Chromosome VII còpia.gbank

70 selected bases on forward strand: 1076059..1076128

source 1 1090940
telomere 1 781 c TEL87L; Telomeric region on the left arm of Chromosome VII; composed of an X element core sequence, X element combinatorial repeats, and a short terminal stretch of
repeat_region 838 1079 Ty5 LTR
gene -2790 -3932
CDS 2790 3932
mRNA -2790 -3932 Endosomal protein involved in turnover of plasma membrane proteins; member of the DUP380 subfamily of conserved, often subtelomeric COS genes; required for the multi
gene -5312 -5839
CDS 5312 5839 hypothetical protein; null mutant displays elevated sensitivity to expression of a mutant huntingtin fragment or of alpha-synuclein; YGL262W is not an essential gene
mRNA -5312 -5839
gene -6290 -6652 c
CDS 6290 6652 c hypothetical protein; member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; mRNA expression appears to be regulated by SUT1 and UPC2
mRNA -6290 -6652 c
gene -6860 -7090
CDS 6860 7090 hypothetical protein; transcription is significantly increased in a NAP1 deletion background; deletion mutant has increased accumulation of nickel and selenium
mRNA -6860 -7090
gene -8470 -8967
CDS 8470 8967 Protein with similarity to GPI-anchored aspartic proteases; such proteases are Yap1p and Yap3p; mCherry fusion protein localizes to the vacuole
mRNA -8470 -8967
gene -9162 -9395
CDS 9162 9395
mRNA -9162 -9395
gene -11110 -11730
CDS 11110 11730 hypothetical protein; highly induced in zinc-depleted conditions and has increased expression in NAP1 deletion mutants; VEL1 has a paralogs, YOR387C, that arose from
mRNA -11110 -11730
gene -12481 -14157 c
CDS 12481 14157 c Mannosyltransferase; involved in adding the 4th and 5th mannose residues of O-linked glycans
mRNA -12481 -14157 c
gene -15150 -16307

File Entries Select View Goto Edit Create Run Graph Display

Entry: RM11-1a scaffold_2-chrVII.gb.txt

70 selected bases on reverse strand: 1061261..1061330 = complement (13438..13507)

LLFCCTFRARNKVFFFLCLNLCMLVVLVLRISRTMAAKGALRF#LPHSHRFYSVYLSCTPMLMRT
RFFYFVLFARGRTRFFSFA#IFAFAFGVUSSREYHELWQRKEL#GFNYPIAIDSTRSIYHVTLR*CVI
ASILLYFSSREEQGFPLPKYLLPLGFGFPPEMITYNGSERSFKVLITP+P+ILLGLSIM#HSVDAY
GCTCTATTGTGTACTTTCCGGCGAGGAACAGGTTTTCCTTGGCTAAATATTTGGCTTGGGTTTGGCTCCAGAGAATATCAGCAACTATGGGAGGCAAGAGGCTTTAAAGTTTAAATACCCATAGCCATAGATTCTACTCGCTTACTATCATGTAACACTCGGTGATGGCTAC
3340 13360 13400 13420 13440 13460 13480 13500 13520
CGAGATAAAACAACATGAAAGCGGCTCTTCTTCCAAAAGAAAGGAAACGGATTATAAACGGAACCCAAAACAGGAGGCTCTTATAGTGTCTATACCGTCCGCTTCTCCGAAATCCAAATTAATGGGATTCGGTATCAGATGAGCAGATAGATAATCATTTGTGAGCACTACGCATG
K+KTTTSKARPYLNKKEKA+INAKPNQDELSY*SSHCRFSS#PKL#GMAMSEVRDI+*TVSRQHTS
AEIKNYKERSSCPKPKGKGLYKGGPKPFGGSFIVF+PLSLLKLTKEIVGYGYIRSPRDI MYCETSAY
SRNQVQRALFLTKKRQRFIQRQTKTRWLIIDRVIAAFAFKLN#NGWLVLNLN+ET+RDHLVGNIRV

Cromosoma 7 i "scaffold 2" de l'espècie BY4741 i RM11-1A, respectivament, a l'Artemis assenyalant el "break" amb groc fluorescent.

Entry: Chromosome XI c6pla.genbank

36 selected bases on forward strand: 645163..645198

source 1 666816
telomere 1 807 c TEL1L1; Telomeric region on the left arm of Chromosome XI; composed of an X element core sequence, X element combinatorial repeats, and a short terminal stretch of telomeric DNA
gene <1810 >2181 c
CDS 1810 2181 c hypothetical protein; member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; SWAT-GFP and mCherry fusion proteins localize to the vacuole
mRNA <1810 >2181 c
gene <3503 >5620 c
CDS 3503 5620 c hypothetical protein; may interact with ribosomes, based on co-purification experiments; similar to transcriptional regulators from the zinc cluster (binuclear cluster)
mRNA <3503 >5620 c
gene <6107 >7528 c
CDS 6107 7528 c Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases; monocarboxylate permeases are involved in transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane
mRNA <6107 >7528 c
rep_origin 7528 8309 ARS1102; Putative replication origin; identified in multiple array studies, not yet confirmed by plasmid-based assay
gene <9091 >11226 c
CDS 9091 11226 c Ferric reductase and cupric reductase; reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels but not by high iron levels
mRNA <9091 >11226 c
gene <14485 >15708 c
CDS 14485 15708 c Endosomal protein involved in turnover of plasma membrane proteins; member of the DUP380 subfamily of conserved, often subtelomeric CDS genes; required for the multivesicular body pathway
mRNA <14485 >15708 c
gene <17359 >18339 c
CDS 17359 18339 c 3-hydroxyaspartate dehydratase; deaminates L-threo-3-hydroxyaspartate to form oxaloacetate and ammonia; required in the presence of hydroxyaspartate; highly similar to the E. coli protein
mRNA <17359 >18339 c
gene <22234 >24884 c
CDS 22234 24884 c Monocarboxylate/proton symporter of the plasma membrane; transport activity is dependent on the pH gradient across the membrane; mediates high-affinity uptake of carbonyl compounds
mRNA <22234 >24884 c
gene <25215 >26159 c
CDS 25215 26159 c Dihydroorotate dehydrogenase; catalyzes the fourth enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimidines, converting dihydroorotic acid into orotic acid
mRNA <25215 >26159 c
mRNA <36716 >36660 c

File Entries Select View Goto Edit Create Run Graph Display

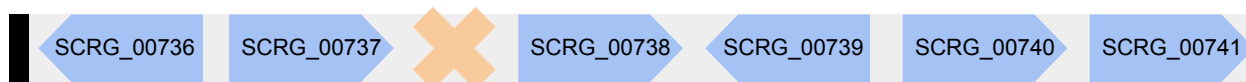
Entry: RMI1-1a scaffold_9-chrXI.gb.txc

36 selected bases on forward strand: 655915..655950

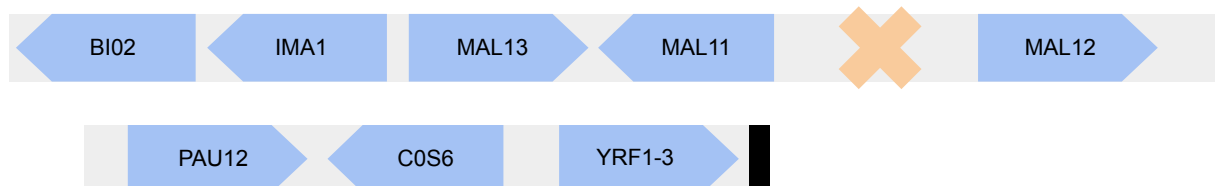
source 1 660618
gene <399 >1490 c
CDS 399 1490 c
mRNA <399 >1490 c
gene <1924 >4423 c conserved hypothetical protein; frameshift
gene <8901 >11018 c

Cromosoma II i "scaffold 9" de l'espècie BY4741 i RMI1-1A, respectivament, a l'Artemis assenyalant el "break" amb groc fluorescent.

Un cop identificat el punt de trencament amb l'Artemis, s'ha d'observar en ambdós cromosomes els gens que queden compresos entre el *break* i el final més proper del cromosoma. Es copia la seqüència del primer gen trobat de l'*scaffold* 2 de l'RM11-1A i s'introdueix al BLAT. Llavors, es busca el cromosoma 7 entre els resultats obtinguts per saber si hi ha una coincidència. A continuació, es fa *click* a *browser* per saber més sobre la seqüència introduïda i s'observa la informació que apareix en la secció *Protein-Coding Genes from Saccharomyces Genome Database* que indica el nom del gen en qüestió. Aleshores, es busca el gen entre els que queden entre el punt de trencament i el final més proper del cromosoma 7 del BY4741 per determinar si podria ser la mutació causant de la incapacitat del BY4741 de créixer en maltosa. Es realitza el mateix procediment amb els gens restants. És important cercar informació sobre els gens que apareixen perquè, malgrat no siguin els principals gens responsables de la fermentació de la maltosa, poder contribuir a la seva impossibilitat, com és el cas de l'YPR196W, un factor de transcripció de la maltosa que s'ha trobat en l'*scaffold* 9 de l'RM11-1A però que mancava en el cromosoma 11 de l'espècie BY4741.



Ampliació del "break" de l'"scaffold" 2 de l'espècie RM11-1A.



Ampliació del "break" del cromosoma 7 de l'espècie BY4741.



*Ampliació **invertida** del "break" de l'"scaffold" 2 de l'espècie RM11-1A per a poder realitzar una comparació més visual amb la figura "Ampliació del "break" del cromosoma 7 de l'espècie BY4741".*

Introduint les seqüències dels gens que es mostren en el dibuix de l'*scaffold* 2 de l'espècie RM11-1A al BLAT, s'obtenen els següents resultats.

El gen SCRG_00741 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon al gen [BIO2](#) del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 100%. El gen en qüestió es tracta d'un "biotina sintasa" que s'encarrega de catalitzar la conversió de la detiobiotina en biotina, una vitamina sovint anomenada vitamina H.

El gen SCRG_00740 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon al gen [IMAI](#) del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 98,7%. El gen també s'anomena YGR287C i té una activitat catalitzadora. Concretament, s'encarrega de la hidròlisi dels enllaços 1,6- α -D-glucosídics en diversos oligosacàrids que han estat produïts a partir de midó i glicogen per l' α -amilasa i la isomaltosa.

El gen SCRG_00739 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon al gen [MALI3](#) del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,3%. El gen MALI3, també anomenat YGR288W sistemàticament, codifica per una proteïna activadora dels gens MAL o MAL-activadora. Forma part del complex MALI i perd funcionalitat en la soca S288c o BY4741.

Concretament, regula la coordinació de la transcripció del gen estructural [MALIS](#) o maltasa i l'AGT1 o maltosa permeasa.

El gen SCRG_00738 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon a la superposició de dos marcs oberts de lectura (*Open Reading Frames - ORFs*), és a dir, de dues seqüències de nucleòtids que codifiquen una proteïna, els quals són [el gen MALI1](#) i [el gen YGR290W](#) del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 98,5%.

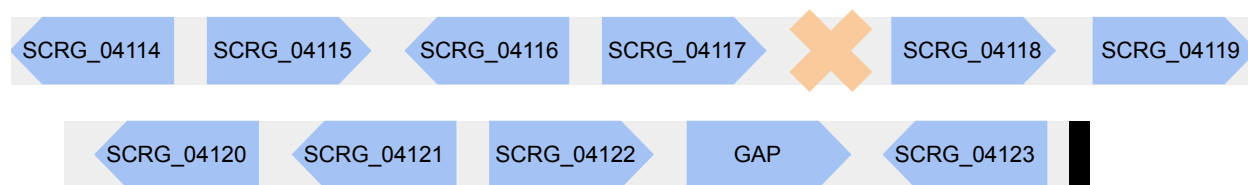
El primer gen també s'anomena [YGR289C](#) i és un transportador de maltosa o transportador- α -glucòsid. A més, és essencial per la utilització de la isomaltosa.

En destaca també la seva capacitat d'absorció d' α -glucòsids d'alta afinitat com la maltosa, la turanosa, la isomaltosa, la maltotriosa i la glucosa, entre d'altres. Finalment, actua en el transport de protons a la cèl·lula.

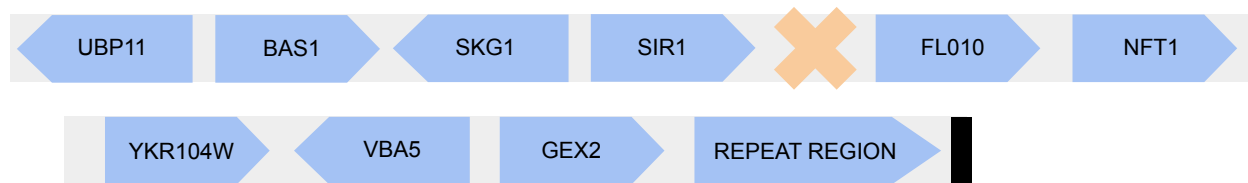
El segon gen, en canvi, és un dubtós marc de lectura o [ORE](#). Es sol trobar sovint superposada parcialment, com és el cas, a l'ORF MALI1, un transportador de maltosa, i la probabilitat que codifiqui una proteïna funcional és baixa. Per això, no es considera part del conjunt de proteomes o grup complet de proteïnes elaborades del [S. Cerevisiae S288c](#).

El gen SCRG_00737 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon al gen **IMAI** del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 88,6%. El gen esmentat s'ha descrit anteriorment.

El gen SCRG_00736 de l'*scaffold* 2 l'espècie RM11-1A correspon al gen **MALI3** del cromosoma 7 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 73,1%. L'escassa coincidència entre ambdós gens dels dos cromosomes determina la probable presència de la mutació en qüestió. Per tant, les diferències ocasionades per la mutació causen la dissimilitud amb el gen MAL63, que com demostra l'estudi redactat en l'article *Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts* de A. Brown és determinant pel correcte funcionament de fermentació de maltosa. El gen esmentat s'ha descrit anteriorment.



Ampliació del "break" de l'*scaffold* 9 de l'espècie RM11-1A.



Ampliació del "break" del cromosoma 11 de l'espècie BY4741.

Introduint les seqüències dels gens que es mostren en el dibuix de l'*scaffold* 9 de l'espècie RM11-1A al BLAT, s'obtenen els següents resultats.

El gen SCRG_04114 de l'*scaffold* 9 l'espècie RM11-1A correspon al gen **UBP11** del cromosoma 11 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,5%. El gen en qüestió també s'anomena YKR098C sistemàticament i és una proteasa específica de la ubiquitina, un polipèptid altament conservat.

Concretament, s'encarrega d'extreure la ubiquitina de proteïnes ubiquitinades. A més, el gen **UBP11** té un paral·lel, el gen **UBP7**, el qual es va originar a partir de la duplicació del genoma complet. El gen es descriu com l'hidrolasa 11 carboxil-terminal de l'ubiquitina.

El gen **SCRG_04115** de l'*scaffold* 9 l'espècie **RM11-1A** correspon al gen **BASI** del cromosoma 11 de l'espècie **BY4741** amb un valor d'*identity* del 99,7%. El gen també s'anomena **YKR099W** i és un factor de transcripció relacionat amb el **Myb**, un regulador de la transcripció. A més, participa en la regulació de l'expressió basal i induïda dels gens que contribueixen a la biosíntesi de purina i histidina. També participa en la regulació de la recombinació meiótica en alguns gens específics. Finalment, del gen **BASI** es coneix que la seva capacitat d'activació de la transcripció **HIS4** només es mostra funcional en combinació amb el gen **PHO2** o **BAS2**.

El gen **SCRG_04116** de l'*scaffold* 9 l'espècie **RM11-1A** correspon al gen **SKGI** del cromosoma 11 de l'espècie **BY4741** amb un valor d'*identity* del 99,5%. El gen **SKGI** també es coneix com **YKR100C** i codifica una proteïna transmembrana que actua en la composició del polímer de la paret cel·lular. A més, es localitza a la superfície interna de la membrana plasmàtica. El gen té un paral·lel, el **AIM20**, que també va sorgir de la completa duplicació del genoma. Per tant, el gen té un paper en la integritat de la paret cel·lular, afectant a la composició del polímer de la paret a la regió que mostra més creixement de la cèl·lula.

El gen **SCRG_04117** de l'*scaffold* 9 l'espècie **RM11-1A** correspon al gen **SIRI** del cromosoma 11 de l'espècie **BY4741** amb un valor d'*identity* del 99,8%. El gen també s'anomena **YKR101W** i codifica una proteïna implicada en l'establiment, però no en el manteniment, d'un silenci heterocromàtic en els loci tipus **HMR** i **HML**. És reclutada mitjançant la interacció amb la subunitat **ORC1** del complex de reconeixement d'origen (**ORC**), que s'uneix als silenciadors **HML-I** o **HMR-E**, els quals són uns fragments d'ADN que destinen la formació de cromatina silenciosa als locis del tipus d'aparellament. A més, estableix el silenci transcripcional mitjançant el reclutament de les altres tres proteïnes, la **SIR**, la **SIR2**, la **SIR3** i la **SIR4**. Les anteriors proteïnes funcionen directament en la cromatina silenciada establint-ne la repressió. També es troba a la cromatina centromèrica.

El gen **SCRG_04118** de l'*scaffold* 9 l'espècie **RM11-1A** correspon al gen **YPRI96W**, el qual no es troba en cap regió del cromosoma 11 de l'espècie **BY4741**, però es localitza al cromosoma 16 amb un valor d'*identity* del 81,8%. Es tracta d'un gen que actua com a factor de transcripció receptiu i sensible a la maltosa.

El gen SCRG_04119 de l'*scaffold* 9 l'espècie RMII-IA correspon a la superposició de dos ORFs, els quals són el gen [YPR197C](#) i el gen [SGEI](#), també anomenat YPR198W, del cromosoma 16 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,9%. El primer es tracta d'un gen que no és propens a codificar una proteïna funcional, mentre que el segon és un gen que transporta múltiples fàrmacs a través de la membrana plasmàtica i que és membre de la superfamília principal de facilitadors (Major Facilitator Superfamily - MFS), una de les famílies més grans de proteïnes de transport de membrana. A més, és un supressor de mutacions del gen [GALI1/YOL051W](#) i, consegüentment, de la seva expressió. La proteïna que codifica el gen [GALI1/YOL051W](#) és un activador transcripcional dels gens que codifiquen els enzims necessaris per tal que tingui lloc el metabolisme de la galactosa en el llevat *S. cerevisiae*.

El gen SCRG_04120 de l'*scaffold* 9 l'espècie RMII-IA correspon al gen [ARR1](#), també anomenat YPR199C, del cromosoma 16 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,9%. Es tracta d'un gen clau en el procés de transcripció dels gens involucrats en la resistència a estructures formades amb arsènic, és a dir, compostos d'arsènic, els quals s'anomenen arsenicals.

El gen SCRG_04121 de l'*scaffold* 9 l'espècie RMII-IA correspon al gen [ARR2](#), també anomenat YPR200C, del cromosoma 16 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,3%, i al gen [SRPI](#), també anomenat YNLI89W, del cromosoma 14, valor d'*identity* del 95,3%. El primer es tracta d'un gen que codifica un tipus d'enzim anomenat arseniat reductasa, el qual és necessari en la resistència a l'arseniat, ja que dona lloc a la conversió de l'arseniat en arsenit que després el transportador Arr3p s'encarrega d'exportar de les cèl·lules. En canvi, el segon es tracta d'un gen supressor de mutacions de RNA polimerasa I en el llevat *S. cerevisiae*, que, a més, juntament amb altres estructures com la carioferina β (Karyopherin Beta - Kap95p), media la importació de proteïnes nuclears.

El gen SCRG_04122 de l'*scaffold* 9 l'espècie RMII-IA correspon al gen [ARR3](#), també anomenat YPR201W, del cromosoma 16 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 99,4%. Es tracta d'un gen que forma part de la superfamília de proteïnes de transport anomenada "Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter (BART) superfamily", el qual transporta arsenits i estibina, un tipus de mineral pertanyent al grup dels sulfurs. A més, el gen en qüestió és necessari en la resistència a estructures formades amb arsènic, és a dir, compostos d'arsènic, els quals s'anomenen arsenicals.

El gen SCRG_04123 de l'*scaffold* 9 l'espècie RMII-IA correspon al gen [TELI1R](#) del cromosoma 11 de l'espècie BY4741 amb un valor d'*identity* del 90,2%, entre d'altres. Es tracta d'un gen, concretament d'una

regió telomèrica, que es troba al braç dret del cromosoma XI de l'espècie BY4741. En primer lloc, està composta per una regió compartida per tots els extrems dels cromosomes anomenada seqüència central d'elements X, la qual en el cas que es tracta és l'estructura TEL I R-XC. En segon lloc, conté combinacions de petits elements anomenades repeticions combinatòries d'elements X, repeticions subtelomèriques o [STRs](#). Finalment, també inclou un tram terminal de repeticions telomèriques abundant en guanina (G).

Havent investigat la funció dels diferents gens coincidents de l'espècie BY4741, s'arriba a la conclusió que, malgrat la gran part no es troba en el cromosoma II, la mutació causant de la impossibilitat de fermentar maltosa és la manca del gen YPR196W en el genoma de l'espècie BY4741.

Finalment, el científic Chris A. Brown vol comprovar en el seu article *Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts* que la incapacitat de fermentació de maltosa de l'espècie BY4741 ve donada per la manca dels gens identificats en l'estudi realitzat. Per fer-ho, crea uns *primers* que permetin realitzar una PCR per amplificar el gen que manca. En el cas del cromosoma VII, el gen MAL63 i, en el cas del cromosoma II, el gen YPR196W.

Fent servir diversos primers, com ara el HYG (hygromycin), el C2 (pel cromosoma 7) o el C9 (pel cromosoma II) i per processos de recombinació homòloga va aconseguir obtenir un transgen que aportés les propietats que mancaven a l'espècie BY4741 i transferir-los a la mateixa, donant lloc a un llevat transgènic.

3.1.5. Funcionament molecular dels gens MAL

Si bé s'ha realitzat l'estudi necessari per a la identificació dels gens absents en l'espècie BY4741, cal conèixer-ne quin és el funcionament dels gens MAL, quins tipus hi ha i com es sincronitzen.

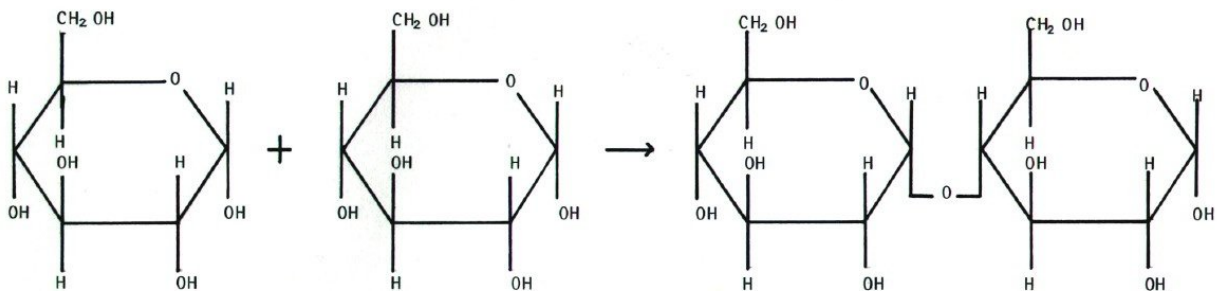
Per a poder garantir la generació òptima d'ATP requerida per al creixement, caldrà que la cèl·lula metabolitzi cada molècula de maltosa, un disacàrid format per la unió de dues molècules de glucosa mitjançant un enllaç monocarbonílic α -1,4.

En grans trets, són tres processos els que estan relacionats amb l'assimilació de la maltosa i que podrien veure's afectats per la variació genètica natural del llevat. Els processos constitueixen una específica

seqüència d'esdeveniments moleculars governats per, com a mínim, tres gens del genoma del llevat: el MALP, el MALT i el MALR.

En primer lloc, és necessari que les molècules de maltosa s'endinsin a l'interior de la cèl·lula, de manera que el llevat transporta la maltosa mitjançant una proteïna anomenada transportadora, que tradicionalment s'anomena **maltosa permeasa** o **MALP**. La proteïna es caracteritza per les seves propietats adherents, de manera que facilita la mobilització de la maltosa a les regions que interessen a l'organisme del llevat per al següent procediment.

En segon lloc, un cop dins de la cèl·lula, la maltosa s'ha d'hidrolitzar o dividir en dues molècules de glucopiranososa o glucosa, les quals poden ser usades en el metabolisme de funcionament central del carboni per a produir energia, diòxid de carboni o CO_2 i etanol o $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Per aconseguir-ho que la maltosa dissociï en dues molècules de glucosa, hi intervé un enzim anomenat **maltasa** o **MALT**, sovint referit com a alfa-glucosidasa. La seva funció és trencar l'enllaç que les uneix a causa de la reacció realitzada, la qual allibera una molècula d'aigua o H_2O resultant quan la molècula de maltosa es crea.

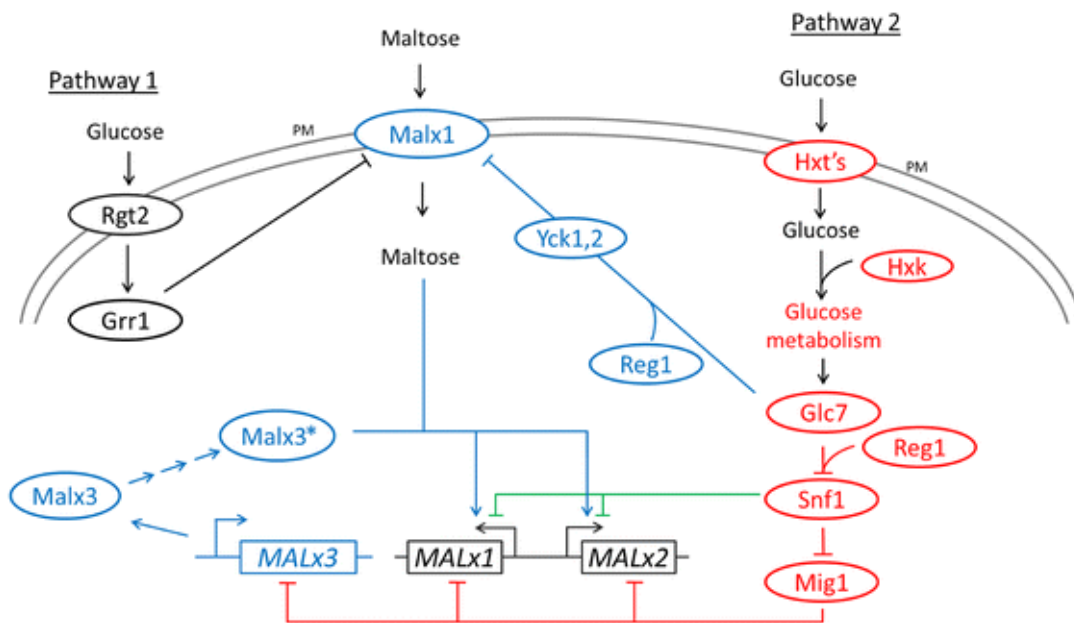


Formació de la molècula de maltosa (dues molècules de glucosa unides per un enllaç O-glicosídic)

Finalment, un cop és troba dins de la cèl·lula, algunes molècules de maltosa s'uneixen a una proteïna **reguladora de maltosa** o **MALR**, la qual s'encarrega d'entrar al nucli cel·lular i d'activar les regions d'ADN que específicament codifiquen els gens MALT i MALP. Així, les molècules de proteïnes de MALT i MALP a la cèl·lula mostren un creixement extremadament incessable, el qual permet un transport més ràpid i eficaç, una escissió més productiva de les molècules maltosa i, conseqüentment, un desenvolupament i síntesi cel·lular molt més veloços d'etanol i diòxid de carboni. A més, el MALR indueix la transcripció dels dos gens prèviament esmentats en presència de maltosa, la qual és transportada a

través de la membrana cel·lular i, posteriorment, és hidrolitzada en glucosa que es dirigirà a través d'una ruta anomenada glicolítica.

Cal saber que la maltosa permeasa o MALP és sovint referenciada com a MALx, la maltasa o MALT com a MALx2 i la proteïna reguladora com a MALx3.



Representació del funcionament dels gens MAL (Horák, 2013)

El MALR codifica un factor de transcripció que regula l'expressió gènica. Els factors de transcripció són proteïnes que s'associen o s'uneixen físicament a seqüències específiques d'ADN en una regió promotora, provocant un augment o disminució de l'expressió de les seqüències d'ADN properes. Tot i que alguns factors de transcripció poden bloquejar la producció d'ARNm, el MALR és un activador d'expressió, la qual cosa significa que, un cop s'uneix a l'ADN, provoca que l'ARN polimerasa arribi al promotor i iniciï la transcripció de l'ADN a ARNm. Quan incrementen els nivells de MALT, augmenta la concentració de maltosa a l'interior de la cèl·lula i s'activa encara més el MALR, que accelera encara més els gens MAL.

El procés s'anomena regulació de **retroalimentació positiva** i permet que els gens MAL es comportin com un simbòlic interruptor molecular que detecta quan la maltosa es troba al voltant de la cèl·lula.

Tanmateix, la glucosa és la principal font de carboni de l'espècie de llevat *S. cerevisiae* i els complexos mètodes de regulació de control han evolucionat per a garantir que l'expressió d'enzims alternatius

d'utilització del sucre, incloses la MALP i la MALT, es reprimeixin quan la glucosa es mostri present al medi de creixement en qüestió. La situació s'observa en altres panorames, com ara en la fermentació massiva situada en medis industrials i s'agreuja amb l'ús d'adjuvants de sucre com ara la glucosa, la fructosa o la sacarosa, substàncies que pretenen potenciar el suplement de glúcid.

Conseqüentment, les diverses anàlisis moleculars detallades sobre la repressió de glucosa han donat lloc al desenvolupament de diferents soques amb una taxa de fermentació de maltosa notablement millorada a través de la selecció racial de llevat, de tècniques gèniques que ocasionen l'alteració de l'estat fisiològic cel·lular o de l'ús de tècniques d'ADN recombinants. (Zastrow et al., 2001)

3.2. Enquesta

3.2.1. PRESENTACIÓ DE L'ENQUESTA

L'enquesta realitzada tracta diferents perspectives de la visió social sobre la transgènesi. Entre d'altres, es tracta la filosofia i el pensament occidental general, la desinformació, els mitjans de comunicació i l'actualitat científica i les seves aplicacions.

La hipòtesi de l'enquesta es focalitza en l'obtenció de resultats variats en gairebé la totalitat de les preguntes. No obstant, presumiblement, hi haurà algunes qüestions més polèmiques en què els participants no mostraran opinions extremes, sinó que es centralitzaran en la neutralitat o les postures que més s'hi acosten, tot i la garantia de l'anonimat.

La metodologia emprada en pràcticament totes les preguntes és l'Escala de Likert, un sistema que qualifica el grau d'acord i de desacord dels participants envers una declaració. En concret, hi ha les següents opcions, de manera que es pot estimar la postura mitjana de cada pregunta aproximadament:

Molt en desacord.

En desacord.

Ni d'acord ni en desacord.

D'acord.

Molt d'acord.

Finalment, els mètodes d'anàlisi de resultats són diversos, tot i que el més rellevant és el *qualitative content analysis*. No obstant, també es reben influències d'altres metodologies, com les correlacions de *Pearson*, les mitjanes i freqüències subjectives (no numèriques) i els percentatges.

3.2.2. RESULTATS

Les dades han estat proporcionades per Formularis de Google.

L'enquesta es va començar a difondre el 14 de setembre del 2021 i es va limitar l'entrada de respostes el 29 de setembre del 2021.

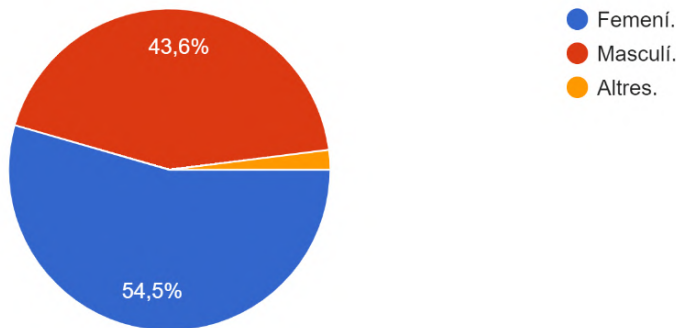
S'ha obtingut un total de 101 respostes.

1. Dona el consentiment per tal que s'utilitzin les seves respostes del qüestionari com a informació anònima en el nostre treball de recerca?

El 100% dels participants van donar el seu consentiment per la utilització de les seves respostes anònimament.

2. Amb quin gènere s'identifica?

El 54,5% dels participants s'identifica amb el gènere masculí, el 43,6% amb el femení i el 2% amb altres.



3. Quina és la seva edat?

El 2% dels participants pertany a l'interval de 15 anys o menys.

El 63,4% dels participants pertany a l'interval de 16 a 19 anys.

El 7,9% dels participants pertany a l'interval de 20 a 29 anys.

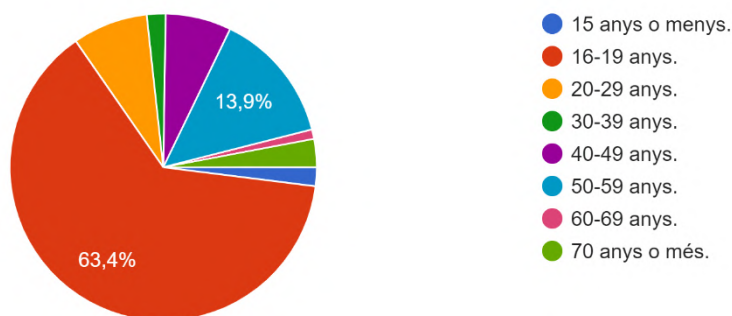
El 2% dels participants pertany a l'interval de 30 a 39 anys.

El 6,9% dels participants pertany a l'interval de 40 a 49 anys.

El 13,9% dels participants pertany a l'interval de 50 a 59 anys.

L'1% dels participants pertany a l'interval de 60 a 69 anys.

El 3% dels participants pertany a l'interval de 70 anys o més.



4. Quan es parla d'organismes transgènics, a què creu que es fa referència? (respongui de manera breu)

Diverses persones ho relacionen amb “organismes modificats genèticament”. Concretament, són 96 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 95,05%.

Una persona ho relaciona amb les parts íntimes. Concretament, representa el 0,99%.

Diverses persones ho relacionen amb aliments i animals petits. Concretament, són 2 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 1,98%.

Una persona ho relaciona amb organismes perjudicials pel consum. Concretament, representa el 0,99%.

Una persona ho relaciona amb l'agricultura. Concretament, representa el 0,99%.

5. Un organisme transgènic és un sub-grup dels organismes modificats genèticament (OMG).

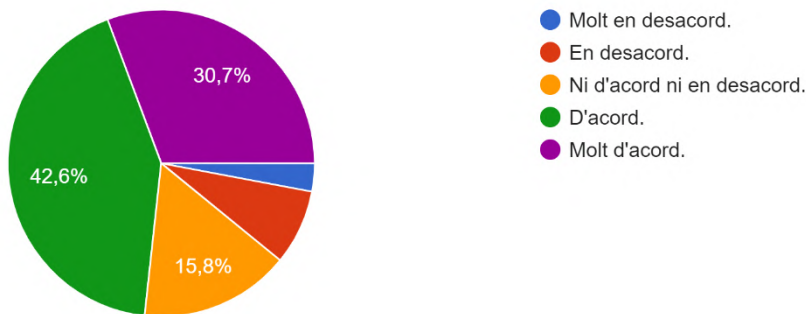
El 3% dels participants està molt en desacord.

El 7,9% dels participants està en desacord.

El 15,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 42,6% dels participants està d'acord.

El 30,7% dels participants està molt d'acord.



6. Un aliment transgènic és perjudicial per la seva salut.

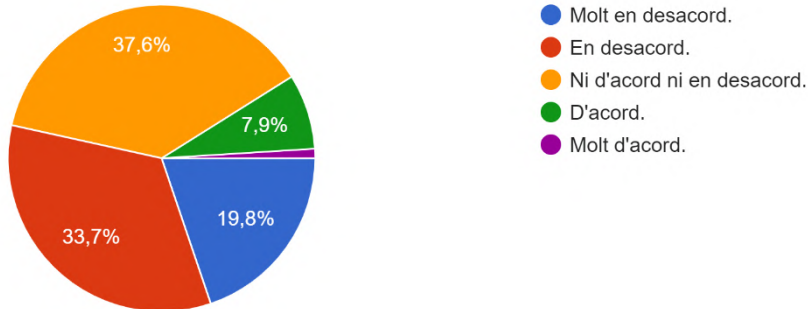
El 19,8% dels participants està molt en desacord.

El 33,7% dels participants està en desacord.

El 37,6% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 7,9% dels participants està d'acord.

L'1% dels participants està molt d'acord.



7. La popularització dels aliments transgènics pot resoldre conflictes com la fam o el suplement nutricional.

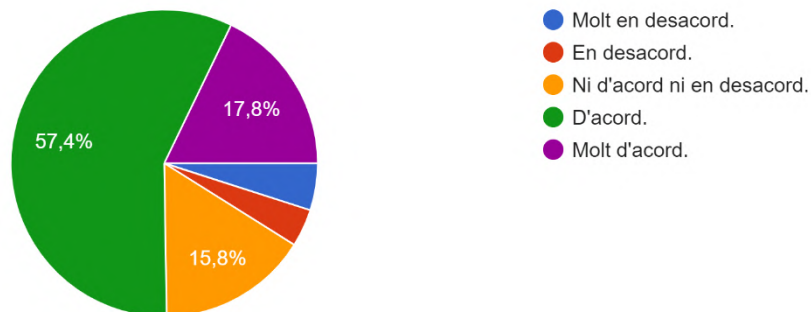
El 5% dels participants està molt en desacord.

El 4% dels participants està en desacord.

El 15,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 57,4% dels participants està d'acord.

El 17,8% dels participants està molt d'acord.



8. Esmenti'n breument un aspecte positiu i un negatiu sobre el seu ús.

ASPECTES POSITIUS	ASPECTES NEGATIUS
Increment de producció de cultius. Suplement nutricional per l'ajut social. Major resistència dels aliments. Augment de la qualitat del producte. Abaratiment del cost del producte. Aparença més atractiva.	Menor valor nutricional. Falta d'investigació. Cost elevat. Visió social negativa. Danys al medi ambient i espècies naturals. Descontrol de l'ús. Monopolització empresarial dels OMG. Possible alteració negativa en el genoma humà. Disponibilitat limitada de les tècniques. Empobriment de la varietat. Destrucció dels mètodes agricultura tradicional. Aparició d'al·lèrgies.

La taula anterior mostra un recull dels aspectes més reiterats al llarg de l'enquesta.

9. El seu grau d'informació sobre la transgènesi és elevat.

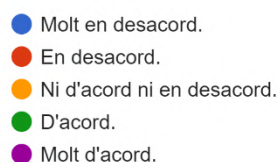
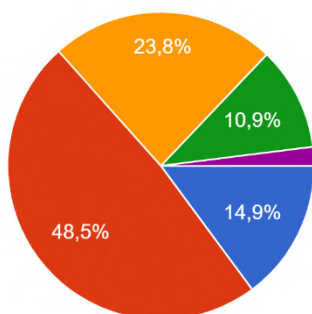
El 14,9% dels participants està molt en desacord.

El 48,5% dels participants està en desacord.

El 23,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 10,9% dels participants està d'acord.

El 2% dels participants està molt d'acord.



10. Els mitjans de comunicació tenen un paper important en la divulgació d'informació sobre la transgènesi.

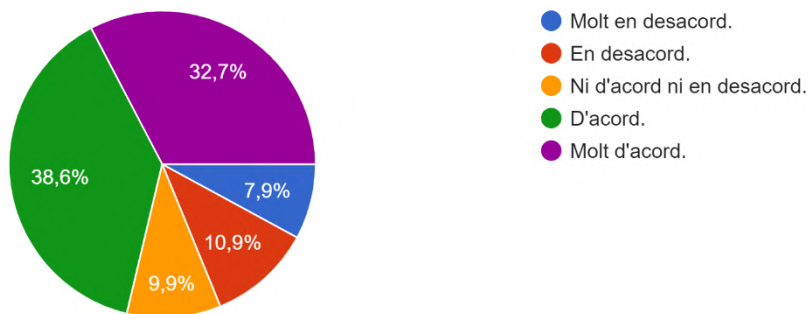
El 7,9% dels participants està molt en desacord.

El 10,9% dels participants està en desacord.

El 9,9% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 38,6% dels participants està d'acord.

El 32,7% dels participants està molt d'acord.



11. Part de la visió que vostè ha construït envers el seu consum ha estat influenciada per la insuficient promoció de la transgènesi.

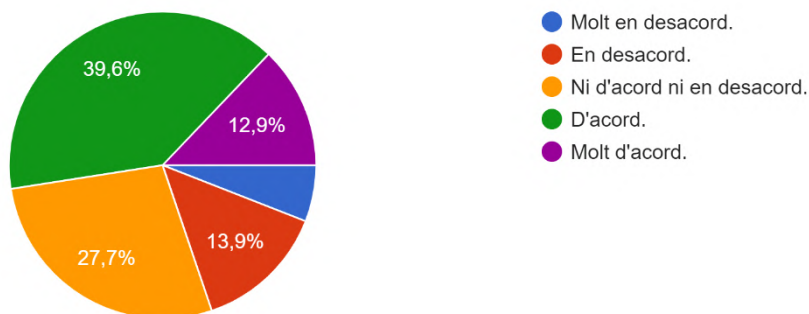
El 5,9% dels participants està molt en desacord.

El 13,9% dels participants està en desacord.

El 27,7% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 39,6% dels participants està d'acord.

El 12,9% dels participants està molt d'acord.



12. Vostè mostra indiferència envers el consum o compra d'OMGs o de productes fets a partir d'OMGs.

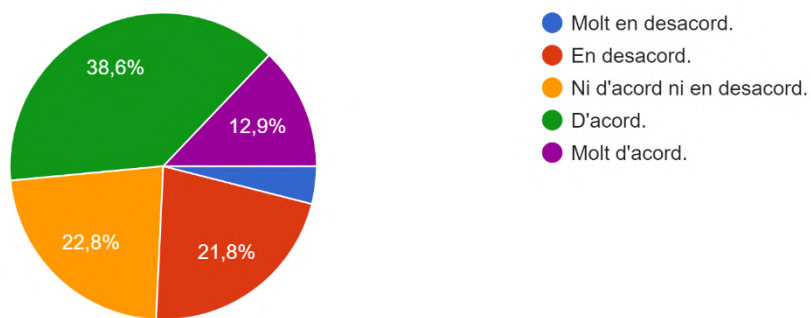
El 4% dels participants està molt en desacord.

El 21,8% dels participants està en desacord.

El 22,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 38,6% dels participants està d'acord.

El 12,9% dels participants està molt d'acord.



13. Expliqui breument la raó per la qual ha seleccionat la resposta de la pregunta anterior.

Diverses persones expliquen que no és un aspecte en què s'hi fixen quan compren, perquè prioritzen el preu del producte, l'ecologia i la seva proximitat (km 0). Concretament, són 22 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 21,8%.

Diverses persones expliquen que no els importa consumir-los perquè no creuen en el seu impacte negatiu en la salut, se'n refien dels científics i, fins i tot, alguns consideren que són millors que els naturals. Concretament, són 28 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 27,7%.

Diverses persones expliquen que no tenen coneixements sobre el tema i, per tant, no tenen una opinió compacta. Concretament, són 22 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 21,8%.

Diverses persones expliquen s'hi fixen perquè creuen en la perjudicialitat dels OMG. Concretament, són 29 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 28,7%.

14. Quan va a un supermercat, es fixa en la presència o absència d'indicacions sobre la procedència i processament del producte.

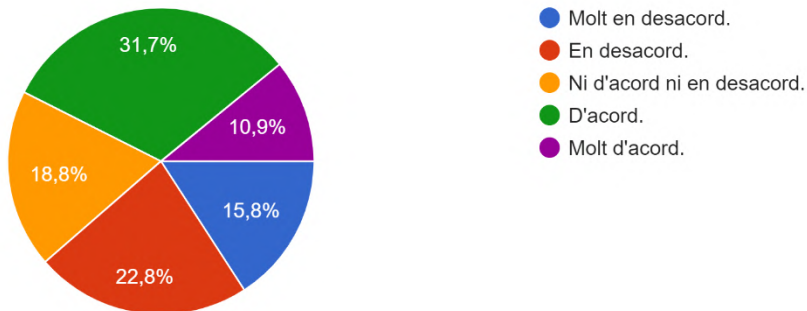
El 15,8% dels participants està molt en desacord.

El 22,8% dels participants està en desacord.

El 18,6% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 31,7% dels participants està d'acord.

El 10,9% dels participants està molt d'acord.



15. Què pensa sobre l'afegiment de propietats en productes originalment naturals? (respongui breument)

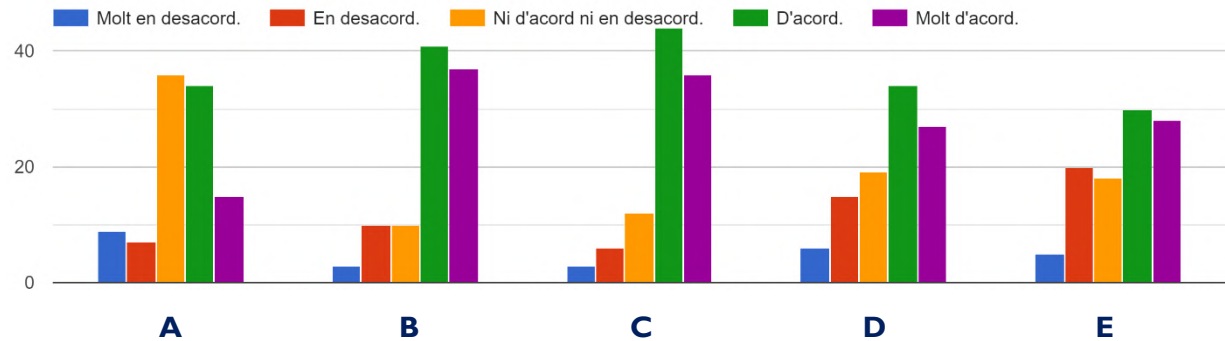
Diverses persones expliquen que, si les propietats afegides als productes són beneficioses, estan d'acord amb la modificació. Concretament, són 28 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 27,7%.

Diverses persones expliquen que la seva resposta varia en funció del grau de perjudicialitat en la salut, el medi ambient i de la regulació del seu ús, de manera que no sigui excessiu. Concretament, són 24 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 23,8%.

Diverses persones expliquen que, simplement, o bé es posicionen en contra de la manipulació de la natura o no tenen suficients arguments per a decantar-se. Concretament, són 35 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 34,6%.

Diverses persones expliquen que estan a favor, sempre que mostri millores a nivell social. Concretament, són 14 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 13,9%.

16. Indiqui el seu grau de conformitat amb les següents aplicacions transgèniques.



a. Creació anatòmica compatible amb el cos humà (A).

El 8,9% dels participants està molt en desacord.

El 6,9% dels participants està en desacord.

El 35,6% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 33,7% dels participants està d'acord.

El 14,9% dels participants està molt d'acord.

b. Cultius resistents a patògens (B).

El 3% dels participants està molt en desacord.

El 9,9% dels participants està en desacord.

El 9,9% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 40,6% dels participants està d'acord.

El 36,6% dels participants està molt d'acord.

c. Cultius resistents a sequeres (C).

El 3% dels participants està molt en desacord.

El 5,9% dels participants està en desacord.

El 11,9% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 43,6% dels participants està d'acord.

El 35,6% dels participants està molt d'acord.

d. Cultius resistents a insecticides (D).

El 5,9% dels participants està molt en desacord.

El 14,9% dels participants està en desacord.

El 18,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

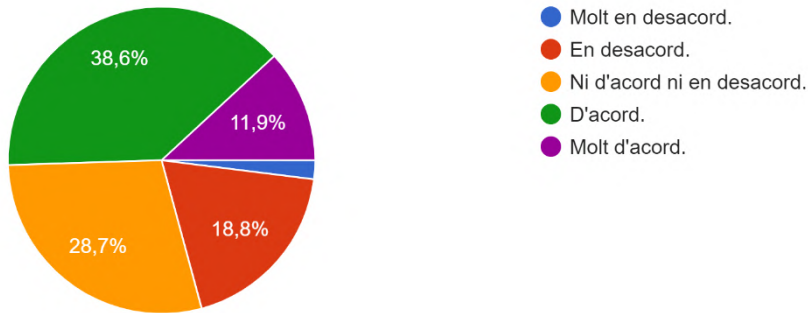
El 33,7% dels participants està d'acord.
El 26,7% dels participants està molt d'acord.

e. Afegiment de nutrients essencials en productes (E).

El 5% dels participants està molt en desacord.
El 19,8% dels participants està en desacord.
El 17,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
El 29,7% dels participants està d'acord.
El 27,7% dels participants està molt d'acord.

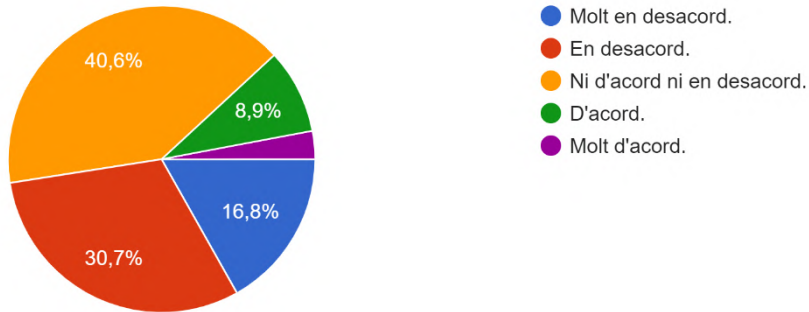
17. L'impacte econòmic de l'expansió dels transgènics i, consegüentment, l'abaratiment dels aliments a escala global és positiu.

El 2% dels participants està molt en desacord.
El 18,8% dels participants està en desacord.
El 28,7% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
El 38,6% dels participants està d'acord.
El 11,9% dels participants està molt d'acord.



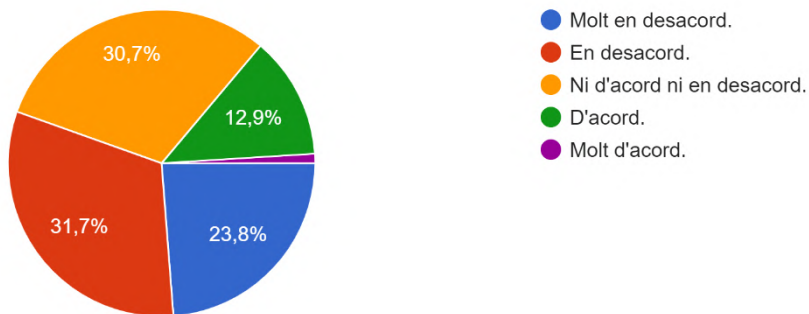
18. L'ètica actual i futura aplicada en àmbits de la ciència com la transgènesi és completament fiable.

El 16,8% dels participants està molt en desacord.
El 30,7% dels participants està en desacord.
El 40,6% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
El 8,9% dels participants està d'acord.
El 3% dels participants està molt d'acord.



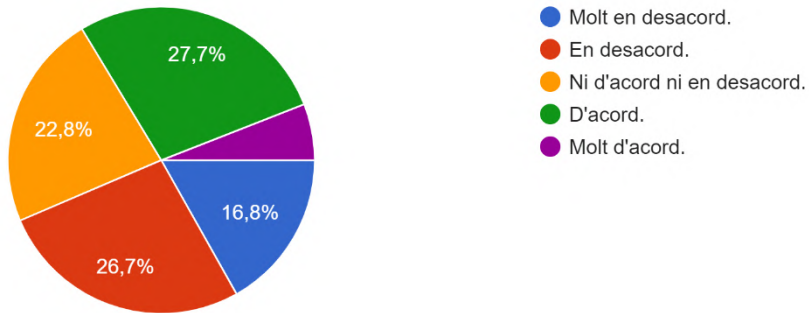
19. Seleccionar éssers naturalment eficients per a multiplicar-los i desfer-se'n dels menys productius és ètic.

- El 23,8% dels participants està molt en desacord.
- El 31,7% dels participants està en desacord.
- El 30,7% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
- El 12,9% dels participants està d'acord.
- L'1% dels participants està molt d'acord.



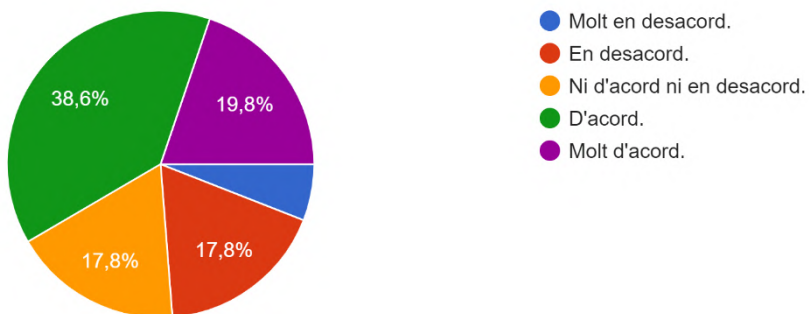
20. La clonació d'un individu amb finalitat científica és ètica.

- El 16,8% dels participants està molt en desacord.
- El 26,7% dels participants està en desacord.
- El 22,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
- El 27,7% dels participants està d'acord.
- El 5,9% dels participants està molt d'acord.



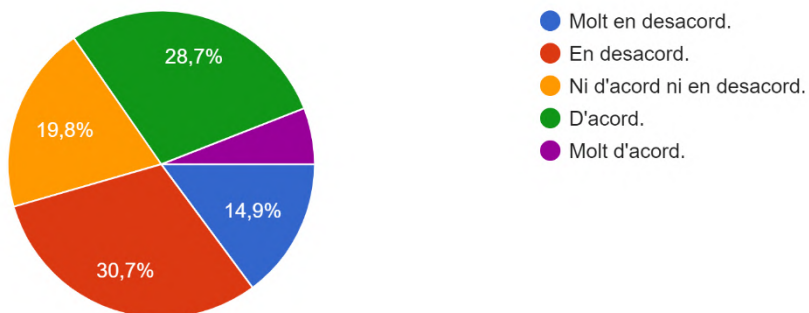
21. La clonació d'un individu per a evitar l'extinció d'una espècie és ètica.

- El 5,9% dels participants està molt en desacord.
- El 17,8% dels participants està en desacord.
- El 17,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
- El 38,6% dels participants està d'acord.
- El 19,8% dels participants està molt d'acord.



22. La clonació d'un humà per a evitar l'extinció d'una espècie és ètica.

- El 14,9% dels participants està molt en desacord.
- El 30,7% dels participants està en desacord.
- El 19,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.
- El 28,7% dels participants està d'acord.
- El 5,9% dels participants està molt d'acord.



23. Si hi hagués la possibilitat de trobar cura a una amenaça mundial pels humans amb la transgènesi, vostè utilitzaria un ésser viu no-humà per a provar l'efectivitat.

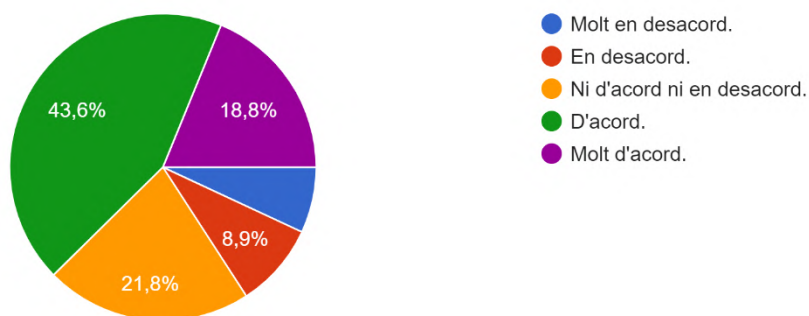
El 6,9% dels participants està molt en desacord.

El 8,9% dels participants està en desacord.

El 21,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 43,6% dels participants està d'acord.

El 18,8% dels participants està molt d'acord.



24. Vostè s'informa sovint sobre l'actualitat científica.

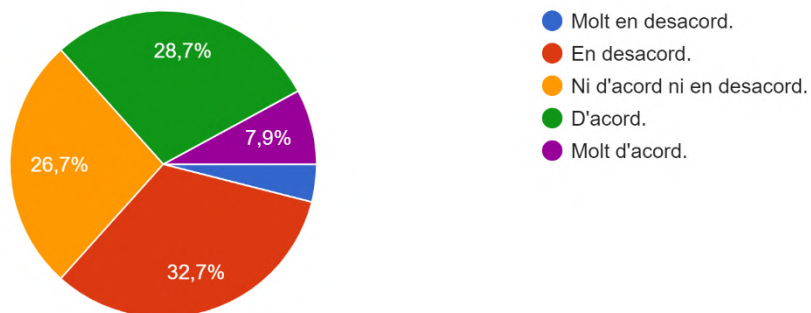
El 4% dels participants està molt en desacord.

El 32,7% dels participants està en desacord.

El 26,7% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 28,7% dels participants està d'acord.

El 7,9% dels participants està molt d'acord.



25. Expliqui breument la raó per la qual ha seleccionat la resposta de la pregunta anterior.

Diverses persones expliquen que s'informen sobre l'actualitat científica perquè té relació amb els estudis que realitzen i amb què es volen dedicar. Concretament, són 10 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 9,9%.

Diverses persones expliquen que ho fan perquè els sembla interessant i important informar-se sobre allò que els envolta. Concretament, són 30 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 29,7%.

Diverses persones expliquen que no ho fan perquè no els sembla interessant la temàtica. Concretament, són 28 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 27,7%.

Diverses persones expliquen que només ho fan quan se n'assabenten a través de xarxes socials i altres mitjans de difusió. Concretament, són 27 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 26,8%.

Diverses persones expliquen que no ho fan perquè és una tasca molt feixuga, complexa i no tenen temps per realitzar-la. Concretament, són 6 persones qui comparteixen la resposta, les quals representen el 5,9%.

26. La ciència ha de ser apropada a tothom.

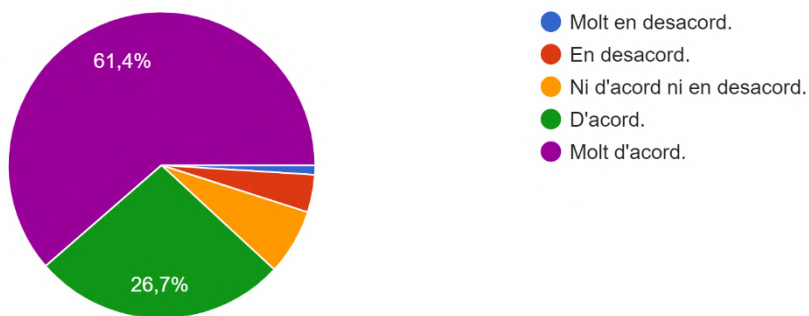
L'1% dels participants està molt en desacord.

El 4% dels participants està en desacord.

El 6,9% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 26,7% dels participants està d'acord.

El 61,4% dels participants està molt d'acord.



27. El llenguatge emprat en el món científic és molt fàcil i comprensible.

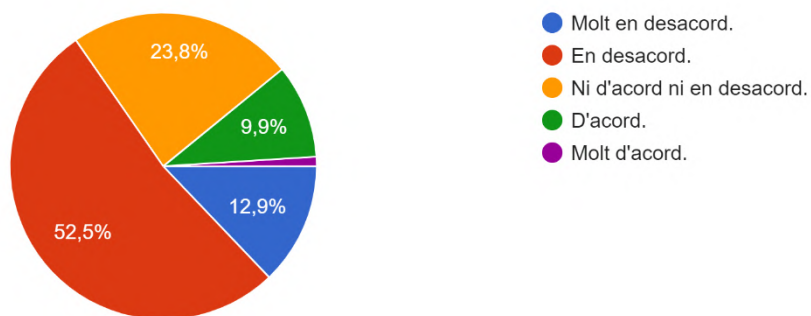
El 12,9% dels participants està molt en desacord.

El 52,5% dels participants està en desacord.

El 23,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 9,9% dels participants està d'acord.

L'1% dels participants està molt d'acord.



28. La forma en què vostè percep el llenguatge emprat en el món científic ha condicionat la manera en què s'ha apropat a la ciència.

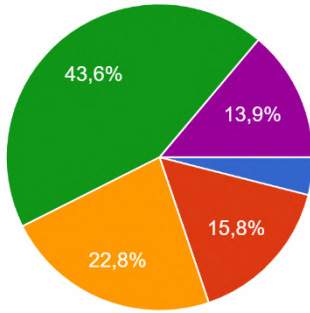
El 4% dels participants està molt en desacord.

El 15,8% dels participants està en desacord.

El 22,8% dels participants no està ni d'acord ni en desacord.

El 43,6% dels participants està d'acord.

El 13,9% dels participants està molt d'acord.



- Molt en desacord.
- En desacord.
- Ni d'acord ni en desacord.
- D'acord.
- Molt d'acord.

3.2.3. ANÀLISI DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

Abans de realitzar una anàlisi per blocs de preguntes, cal distingir algunes diferències entre les diverses generacions marcades per l'edat dels participants. A grans trets, es mostra un major coneixement i interès en la transgènesi per part de les generacions més joves, que no pas per part de les més adultes. Això ve donat pel fet que les generacions més recents han viscut el punt àlgid d'innovació científica, de manera que mostren una major adaptació als canvis, i, per tant, menys prejudicis sobre el seu ús i consum actual i futur.

RELACIONS ENTRE LES PREGUNTES 4, 5, 6, 7 i 8

S'han agrupat les preguntes 4, 5, 6, 7 i 8 perquè comparteixen el tret de l'extensió del coneixement entre els participants. En el bloc, s'estudiarà la creença general i es contrastarà amb preguntes que tenen relació. Així, es podrà identificar el canvi d'opinió en funció de les diferents variables. També s'analitza la polarització de pensament sobre els avantatges i inconvenients dels transgènics.

Primerament, es pot observar que en la pregunta 4 la resposta més popular és l'associació d'organismes transgènics a organismes modificats genèticament. Una minoria els ha relacionat amb altres aspectes que, en alguns casos, s'aproximen bastant al tema que es tracta.

Similarment, la resposta predominant en la pregunta 5 mostra dos grups principals que es posicionen a favor. La bifurcació dels percentatges s'apropa molt a la suma quan es compara amb la pregunta anterior. Tot i així, es mostra una clara confusió sobre la diferència entre organisme transgènic i organisme modificat genèticament. Per això, les respostes estan més esteses i no tan concentrades i centralitzades.

A més, a la pregunta 6 es pregunta sobre la perjudicialitat dels transgènics per a la salut. L'opinió general es concentra en el centre, de manera que s'extreu una conclusió aproximada que expressa desinformació sobre el tema. No obstant, la tendència és lleugerament dirigida a la negació sobre els efectes negatius, de manera s'interpreta un pensament que nega la possibilitat que organismes transgènics puguin ser nocius pel nostre organisme.

Seguidament, la pregunta 7 proposa alguns dels avantatges més populars dels transgènics: la disminució de la fam i el suplement nutricional. Els resultats mostren, simplement, una clara resposta predominant, la qual considera que és un enunciat vertader i que, entre d'altres, els aspectes esmentats són alguns dels beneficis.

Finalment, s'ha demanat a la pregunta 8 que es mencionés, com a mínim, un aspecte positiu i un negatiu sobre l'ús dels transgènics. Les respostes evidencien un coneixement prou homogeneïtzat entre els participants, de manera que s'han agrupat en grups sense mostrar els percentatges. Això s'ha realitzat degut a l'elevada reiteració d'opinions. Malgrat això, cal especificar i remarcar com els aspectes negatius són molt més fàcilment identificables per la societat. De fet, en els resultats, hi ha aproximadament el doble d'inconvenients que d'avantatges, la qual cosa pot portar a pensar que els mitjans de divulgació tenen, dins de l'objectivitat, una deduïble distància envers l'ús de transgènics.

RELACIONS ENTRE LES PREGUNTES 9, 10, 11, 24, 25, 26, 27 i 28

S'han agrupat les preguntes 9, 10, 11, 24, 25, 26, 27 i 28, ja que totes fan referència al grau de coneixement i d'informació dels enquestats sobre la transgènesi, i se centren en el rol que no només els mitjans de comunicació, sinó que també el registre utilitzat en el món científic, hi juguen. Cal destacar que ambdues fonts d'informació són recursos de difusió i divulgació de coneixement, el qual sovint, es transmet de forma complexa o, fins i tot, de manera insuficient, donant peu a confusions, pèrdues d'interès en el tema i manques de comprensió perilloses en la nostra societat.

A la pregunta 9, es mostra que més de la meitat dels participants de l'enquesta consideren que el seu grau d'informació sobre la transgènesi és baix, mentre que gairebé un quart de les persones mostren dubtes sobre la qüestió que se'ls pregunta.

En el cas de la pregunta 10, hi ha una clara majoria que es decanta per destacar el paper rellevant dels mitjans de comunicació en la divulgació de temes com la transgènesi.

No obstant això, la pregunta anterior no implica que en la pràctica sigui així, ja que en la pregunta 11, també existeix una majoria que coincideix amb el fet que el consum que fan dels transgènics, el qual és baix o poc important per part dels compradors tal i com es mostra en la pregunta 12, està en major part condicionat pel fet que els mitjans de comunicació en fan una insuficient promoció.

Malgrat això, el poc consum de productes transgènics també prové d'una desinformació dels participants sobre l'actualitat científica, com reconeixen en la pregunta 24, en la qual hi ha una majoria que considera que no se n'informen amb regularitat, seguida d'un altre grup de gent que considera que sí que ho fa.

Tal i com s'observa en la pregunta 25, entre els que s'informen sovint sobre l'actualitat científica, existeix una majoria que ho fan perquè opinen que és interessant i significant estar informat sobre el dia a dia de diferents sectors de la nostra societat, mentre que d'altres ho fan perquè realitzen o desitgen realitzar

estudis d'àmbit científic. D'altra banda, entre els que no s'informen sovint sobre l'actualitat científica, hi ha una majoria concentrada en aquells que diuen que no forma part dels seus interessos i aquells que només ho fan quan els arriba normalment a través d'alguna xarxa social, mentre que una minoria no ho fan a causa de la complexitat de les informacions científiques o d'una manca de temps per consultar-les.

En la pregunta 26, hi ha una majoria molt clara de persones que estan d'acord amb el fet que la ciència sigui apropiada al màxim de persones possible.

La pregunta 27, remarca que un gruix considerable dels enquestats consideren que el llenguatge utilitzat en el món científic és complex i incompreensible.

És per això que, en la pregunta 28, la majoria de participants estan d'acord amb el fet que el nivell del llenguatge utilitzat en les fonts d'informació científiques ha condicionat la seva manera de relacionar-se amb el món científic.

A partir de les dades exposades, per tant, es pot deduir que la majoria dels enquestats consideren que tant el seu baix grau de coneixement sobre la transgènesi, com el seu baix grau de consum de productes transgènics, són determinats per tres factors principals. En primer lloc, per la manca de consulta d'articles científics com a mitjà d'informació sobre les últimes notícies i avenços realitzats per part de la població. La situació descrita ve condicionada pels altres dos factors clau, el llenguatge tècnic que es fa servir en la redacció dels recursos científics i que es troba fora de l'abast de la majoria de la societat actual, i la poca rellevància atorgada a seccions científiques en els mitjans de comunicació que desemboca en una manca d'espai i dedicació en diaris, canals de televisió... Com a conseqüència, s'origina un desinterès en la gent i una assumpció automàtica per part de la societat del fet que, quan es tracta d'una notícia de caire científic, la seva ignorància no permetrà que l'entenguin i, per tant, ni tan sols la consulten.

RELACIONS ENTRE LES PREGUNTES 12, 13, 14 i 15

S'han agrupat les preguntes 12, 13, 14 i 15 perquè representen la part més ambientada a l'aplicació en l'actualitat sobre el consum d'aliments transgènics. Es relaciona amb la compra i la disposició individual d'ingerir-los.

En primer lloc, la pregunta 12 qüestiona als participants sobre la importància que donen al consum d'organismes modificats genèticament. La concentració és central, és a dir, que els prejudicis no han marcat una negació immediata en tots els participants. No obstant, predomina la tendència de concordança amb l'enunciat i, per tant, una gran majoria mostra indiferència. Els resultats verifiquen i corroboren els que

s'han obtingut a la pregunta 6, en què gran part dels participants no estaven d'acord amb l'existència d'efectes negatius.

Contràriament, quan s'ha demanat l'argumentació sobre la resposta a la pregunta 13, les opinions han estat més descentralitzades. El fet de poder escriure i explicar-se permet una major variabilitat en les respostes, i, concretament, s'ha pogut veure que, tot i que moltes persones no mostren prejudicis que els facin seleccionar de manera extremada els productes que compren, solen preferir els que són naturals si se'ls ofereix l'oportunitat d'escollir.

Seguidament, a la pregunta 14 se'ls ha interrogat sobre l'acció de consultar la procedència i el processament dels productes a l'hora de comprar-los. Els resultats obtinguts han estat molt diversos, de manera que no se'n pot extreure una resposta predominant. El que es pot concloure, però, és l'absència d'acció comuna. En altres paraules, s'interpreta que l'acció de assegurar-se que la persona està conforme amb els procediments a què el producte ha estat sotmès és completament mínima.

Finalment, lleugerament relacionat amb l'ètica, els participants han expressat la seva opinió sobre l'afegiment de propietats alienes en productes naturals. De nou, els resultats no són centralitzats, sinó que hi ha una gran varietat de pensaments envers la pregunta. De totes maneres, la resposta és sovint escèptica o relativista. En altres paraules, la seva opinió sol dependre o bé de la finalitat o de l'adequació de l'acció.

RELACIONS ENTRE LES PREGUNTES 16 i 17

S'han agrupat les preguntes 16 i 17 amb la finalitat de poder realitzar un estudi sobre l'adequació de diversos procediments propis de la transgènesi.

En la pregunta 16, s'han introduït diversos casos sobre els quals cadascú mostrava la seva opinió. En el cas d'aplicar la transgènesi per a crear anatomia compatible amb els cos humà la gran part de les respostes s'han posicionat a favor amb una tendència neutra. És a dir, que en cas d'aplicar les tècniques de transgènesi amb una finalitat de salut, la gran part de les respostes es mostren conformes, com també passa amb la creació de cultius resistents a patògens. No obstant, en l'últim cas, la mediana és més extrema i, l'opinió general es mostra clarament favorable. El mateix succeeix amb la síntesi de cultius resistents a sequeres i a insecticides. En canvi, quan es parla d'aportar nutrients essencials a productes, hi ha més diversitat entre opinions. Tot i així, la mitjana resulta mostrar-se a favor del procediment. Per tant, podem veure com, en general, la població està disposada a dur a terme la transgènesi sempre que la finalitat justifiqui els mitjans. Malgrat això, costa més realitzar una resposta que suporti incondicionalment la transgènesi quan són els humans els objectes d'estudi als quals s'aplica i prova l'efectivitat.

Finalment, la pregunta 17 proposa l'expansió de transgènics com a objecte d'estudi. Concretament, es pregunta sobre l'impacte econòmic, el qual està íntimament relacionat amb l'abaratiment dels aliments. Novament, la resposta predominant es posiciona al centre, amb una lleugera tendència partidària de la conseqüència esmentada. Això pot significar que, en general, interessa que el preu dels productes disminueixi per a que més gent pugui permetre's una alimentació variada allunyada del processament excessiu dels productes.

RELACIONS ENTRE LES PREGUNTES 18, 19, 20, 21, 22 i 23

S'han agrupat les preguntes 18, 19, 20, 21, 22 i 23, ja que totes elles tenen com a objectiu avaluar els principis morals i ètics dels participants respecte diverses situacions lligades amb la transgènesi.

En la pregunta 18, se'ls pregunta sobre la fiabilitat de l'ètica actual i futura que s'aplica des del món científic en àmbits com el de la transgènesi, sobre la qual la majoria tenen dubtes a l'hora d'avaluar-la, mentre que el següent grup nombrós de respostes consideren que no és fiable.

Així ho demostren, amb les respostes que s'observen en la pregunta 19. El fet de multiplicar éssers vius a causa del seu elevat grau d'eficiència i descartar-ne els menys productius es tracta d'una situació considerada ètica segons la ciència, com es pot comprovar amb diverses aplicacions de les tècniques de transgènesi que s'han dut a terme. La majoria dels enquestats, en canvi, tenen una opinió contrària a la científica, ja que, com han remarcat en la pregunta anterior, consideren l'ètica científica dubtosa. Per tant, la majoria es mostra en desacord amb l'ús d'éssers vius amb finalitats com la descrita.

No obstant això, en el cas de la clonació d'un individu, pertanyent a qualsevol espècie, amb finalitat científica tampoc és considerat ètic per part d'una majoria dels participants, com es mostra en la pregunta 20. A diferència de les respostes de la pregunta anterior, en el cas que es tracta, hi ha una diferència molt petita entre el nombre de respostes que es posicionen a favor de la situació definida i el nombre de respostes que s'hi posicionen en contra, mentre que en la pregunta 19, la diferència entre els dos grups de participants era més considerable. Això, assenyala que en funció de la formulació d'una pregunta, els prejudicis sobre la metodologia transgènica varien.

La pregunta 21, en canvi, mostra una petita diferència respecte la número 20, ja que ara s'avalua l'ètica d'una acció quan la finalitat és evitar l'extinció d'una espècie. Els resultats mostren una opinió generalment posicionada a favor, tot i que les posicions més neutres tenen bastant suport.

A la pregunta 22 es torna a variar una mica l'enunciat de tal manera que s'avalua l'adequació de clonar un humà amb la finalitat d'evitar la seva extinció. Els resultats no són centralitzats, sinó que hi ha predominança de l'oposició i l'afavoriment. En canvi, la posició neutral no ha tingut tant suport. De nou, es corrobora una de les conclusions de l'enquesta, la qual afirma que l'ètica dels procediments és més exigent quan l'objecte d'estudi és l'humà. De fet, la resposta lleugerament predominant es mostra en contra.

Finalment, a la pregunta 23, s'ha qüestionat l'adequació de provar una cura per una amenaça mundial amb humans. Les respostes canvien ja que, en no parlar de la clonació d'un individu, sinó de sotmetre'l a una teràpia que podria evitar conseqüències molt majors, l'opinió general es posiciona clarament a favor. Per això, es pot considerar que la transgènesi encara no es percep com un procediment segur. En canvi, quan es planteja com a teràpia, l'oposició és més flexible i no està en complet desacord.

Per concloure, es pot considerar que l'ètica general científica és utilitarista, usualment relacionada amb el que postulava John Stuart Mill. En altres paraules, és una mentalitat que defensa que la finalitat justifica els mitjans. Per tant, sacrificar un individu per a trobar la cura per a una majoria es considera ètic segons les respostes que s'han obtingut en l'enquesta.

4. CONCLUSIONS

Conclusions

Respecte les **tècniques de transgènesi** i l'**experiment** realitzat, es conclou que...

- Les regions subtelomèriques són propenses a patir mutacions i, per això, poden donar lloc a canvis en el material genètic d'un organisme que, encara que generalment siguin inofensius pel seu funcionament, en alguns casos poden ser detriments com, per exemple, amb l'espècie de llevat BY4741, la qual no era capaç de metabolitzar la maltosa a causa de la manca d'un gen en el seu genoma, fet que impossibilitava la seva nutrició.
- Regions dels cromosomes que conformen la informació genètica d'un individu com les subtelomèriques poden ser un àmbit d'estudi futur amb gran potencial. No obstant això, sovint es deixen de banda a causa del fet que no es tracten de les zones principals que constitueixen els cromosomes i s'oblida la seva rellevant capacitat de condicionar aspectes genotípics d'un organisme.
- Les mutacions es presencien en moltes altres situacions, de manera que les aplicacions de la transgènesi es poden relacionar amb les malalties degudes a canvis genòmics. Per tant, el camp no té únicament l'objectiu d'afegir o potenciar les característiques fenotípiques d'un organisme, sinó que també és aplicable en molts altres aspectes relacionats, per exemple, amb la correcció de seqüències defectuoses.
- Una possible continuïtat del treball de recerca és realitzar els passos següents a la identificació de la mutació, els quals s'han vist limitats per les restriccions pandèmiques. Un cop és localitzada, es crea el transgen amb la introducció del gen correcte mitjançant les tècniques esmentades en l'apartat 2.1., la qual cosa rep el nom de teràpia gènica.
- El món científic no només inclou els aspectes teòrics i pràctics en un laboratori sinó que, en alguns casos, comporta la intervenció d'eines computacionals i dels seus mètodes per a la identificació d'una mutació, per exemple.
- La quantitat de temps que comporta la identificació d'una mutació és determinant pel cost dels procediments. Per això, el desenvolupament d'eines que la facilitin contribuirà a la reducció de les despeses que inclouen les tècniques.

Quant a l'**impacte econòmic**, es delibera que...

- La monopolització i mala gestió del domini d'organismes transgènics per part de grans multinacionals impossibilita treure'n el màxim profit pel que fa al pes social que podrien tenir les seves aplicacions.
- En integrar els transgènics en sectors com l'agricultura, per exemple, els països més desenvolupats són els que en surten més beneficiats, ja que són els que s'ho poden permetre, contràriament als països subdesenvolupats, els quals són els que més necessiten la incorporació esmentada.
- La comprensió d'organismes modificats genèticament per l'ésser humà com a productes és relativament recent i, per tant, caldrà temps per tal que la seva comercialització sigui aprovada per més organitzacions a nivell internacional i que la seva adquisició sigui assequible per un major gruix de països.
- L'establiment de controls i límits ètics, nous corrents de difusió de la ciència a particulars, com el *biohacking*, o el desenvolupament de noves tècniques d'edició genètica menys costoses, com el CRISPR-Cas9, podrien causar una gran influència en el futur de la transgènesi.

Pel que fa a la **visió social**, cal destacar que els resultats obtinguts en l'enquesta realitzada del treball de recerca s'adeqüen, en molts àmbits, als percentatges d'altres estudis que s'han realitzat entre la comunitat científica actual. En l'apartat de visió social dels transgènics, el 2.3., s'expliquen les diferents postures de la cultura occidental contrastades amb les mentalitats d'algunes zones internacionalment més aïllades, tant econòmica com socialment. No obstant, l'enquesta ha mostrat una gran relació amb les opinions europees, com s'ha explicat en l'apartat esmentat anteriorment, de manera que, tot i que la mostra ha estat reduïda, els resultats han sigut suficientment diversos com per a evidenciar les possibles discrepàncies, tant de convicció com de coneixement, entre la població catalana. Per això, s'argüeix que...

- El desconeixement i la falta d'homogeneïtzació cultural entre els països europeus porta a diferents malentesos sobre l'adequació i les finalitats de diverses decisions del món científic, el qual es percebut com a llunyà, apàtic i distant.
- El respecte per la comunitat científica és elevat i la curiositat que desemboca del fet que sigui tan hermètic ocasiona l'aparició de postures reticents i intransigents, les quals sovint guanyen importància mitjançant mètodes de difusió, com les xarxes socials, la ràdio o la televisió.
- El distanciament de la ciència a la població dona lloc al dubte, el qual es pot manifestar de forma extrema i radical. Sense anar més lluny, la rapidesa en què la vacuna del Sars-Cov-2 s'ha

desenvolupat ha fet aparèixer opinions que desacrediten la seva seguretat. Això, entre d'altres, ve donat pel factor que hi ha una manca de comunicació entre l'àmbit científic i l'àmbit social.

- Es necessari treballar la integració de la recerca a les persones mitjançant notícies més objectives i revisades per professionals amb la finalitat de reduir les males interpretacions i la difusió de notícies falses, per exemple. Hi ha més alternatives, com ara el compromís de l'estat a subvencionar xerrades pels joves i les noves generacions. Conseqüentment, la desinformació seria un factor menys que hi contribuiria i només caldria assegurar-se que els mitjans de comunicació es limitessin a informar als consumidors sense la influència d'opinions externes.
- La novetat de les tècniques i del concepte de transgènesi ha causat que els procediments siguin percebuts com a confusos i qüestionables. Per això, tot i que el temps atenuarà les postures més radicals, el procés es podria accelerar mitjançant les solucions esmentades en l'apartat anterior, de manera que la ciència seria més propera.
- L'ús de paraules més assequibles en els articles dirigits a un públic general farien que l'accessibilitat no fos un problema i la comprensió resultés senzilla pel lector.
- Cal tenir en compte que les fonts d'informació textuals no són tan amenes com les visuals i, per tant, si els telenotícies o els anuncis al·ludissin temàtiques científiques sobre els transgènics, el concepte ressonaria més en la societat i la normalització seria més veloç i efectiva.

Per les raons anteriors, es culmina que part del conflicte sobre la visió social ve donada per la desinformació i una mala sincronització entre el món científic i el periodístic. Tot i això, l'acceptació de la transgènesi està en creixement i s'estima que les properes generacions l'acolliran completament en la seva normalitat.

Finalment, després d'efectuar el treball de recerca, es conclou que les hipòtesis van ser correctament plantejades i resoltes a l'inici del projecte, tal i com es pot comprovar al llarg dels diversos apartats del marc teòric.

5. AGRÀIMENTS

Agraiments

(Versió anònima del treball)

6. BIBLIOGRAFIA

Articles i llibres

- Albareda, J. M. F. (1982). Características Y Aplicaciones De La Transgénesis En Animales Domésticos. *Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona*, 370–374.
- Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
- Babu, R. M., Sajeena, A., Seetharaman, K., & Reddy, M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management - an over view. In *Crop Protection* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1071–1086). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00142-X)
- Ballester, U. A. (2016). *Plantas transgénicas*.
- Bhat, S. R., & Srinivasan, S. (2002). *Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches*. www.elsevier.com/locate/plantsci
- Bloom, J. S., Ehrenreich, I. M., Loo, W. T., Lite, T. L. V., & Kruglyak, L. (2013). Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature*, 494(7436), 234–237. <https://doi.org/10.1038/nature11867>
- Brondi, S., Pellegrini, G., Guráň, P., Fero, M., & Rubin, A. (2021). Dimensions of trust in different forms of science communication: the role of information sources and channels used to acquire science knowledge. *Journal of Science Communication*, 20(3), 1–21. <https://doi.org/10.22323/2.20030208>
- Brown, C. A., Murray, A. W., & Verstrepen, K. J. (2010). Rapid Expansion and Functional Divergence of Subtelomeric Gene Families in Yeasts. *Current Biology*, 20(10), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.027>
- Bueno i Torrens, D. (2011). *¿Para qué sirven los transgénicos?: todas las claves de una tecnología útil y controvertida*. Universitat de Barcelona,. [https://cataleg.uab.cat/iii/encore/record/C__Rb1986875__Spara qu%27sirven los transg%27nicos__Orightresult__U__X6?lang=cat](https://cataleg.uab.cat/iii/encore/record/C__Rb1986875__Spara_qu%27sirven_los_transg%27nicos__Orightresult__U__X6?lang=cat)
- Bull, L. (2013). *Genetics , Mutations , and Polymorphisms Our DNA : The Basics. I*, 1–16.
- Cannan, W. J., & Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 3–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>

- Celebi, C., Guillaudeux, T., Auvray, P., Vallet-Erdtmann, V., & Jégou, B. (2003). The making of “transgenic spermatozoa.” *Biology of Reproduction*, 68(5), 1477–1483. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009340>
- Chen, C., Smye, S. W., Robinson, M. P., & Evans, J. A. (2006). Membrane electroporation theories: A review. In *Medical and Biological Engineering and Computing* (Vol. 44, Issues 1–2, pp. 5–14). <https://doi.org/10.1007/s11517-005-0020-2>
- Chen, H. (2015). Adeno-associated virus vectors for human gene therapy. *World Journal of Medical Genetics*, 5(3), 28. <https://doi.org/10.5496/wjmg.v5.i3.28>
- CIBIOGEM. (2018). *Nuevas técnicas de mejoramiento de plantas (NPBTs): Elementos de análisis y recomendaciones sobre su enfoque regulatorio*. 1–55.
- Clark, J., & Whitelaw, B. (2003). A future for transgenic livestock. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 825–833. <https://doi.org/10.1038/nrg1183>
- Danilova, S. A. (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. In *Russian Journal of Plant Physiology* (Vol. 54, Issue 5, pp. 569–581). <https://doi.org/10.1134/S1021443707050019>
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. In *J. gen. Microbiol* (Vol. 44).
- Featherstone, C., & Jackson, S. P. (1999). *DNA double-strand break repair*. 759–761.
- Felmer, R. (2004). Animales transgénicos: pasado, presente y futuro. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(2), 105–117. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2004000200002>
- Fernández-d’Arias, B., Gómez, S., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2014). Preparación de Dispersiones de Partículas en Resinas Viscosas Mediante Sonicación en Recirculación. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(4), 211–218.
- Fernández-González, R., Bermejo-Álvarez, P., Pérez-Crespo, M., Miranda, A., Laguna, R., Frutos, C., & Gutiérrez-Adán, A. (2012). The use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for gene transfer in mice. In *Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies* (Issue January). <https://doi.org/10.2174/978160805237011201010103>
- Fredlund, E. (2004). *Central carbon metabolism in the biocontrol yeast Pichia anomala: influence of oxygen limitation*. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Gallego, C., Gonçalves, M. A. F. V., & Wijnholds, J. (2020). Novel Therapeutic Approaches for the Treatment of Retinal Degenerative Diseases: Focus on CRISPR/Cas-Based Gene Editing. *Frontiers in*

- Neuroscience*, 14(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00838>
- Gayozzo, P. (2021). «Biohacking»: el transhumanismo de garaje. *Revista Iberoamericana de Bioética*, 16, 01–17. <https://doi.org/10.14422/rib.i16.y2021.002>
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (Vol. 51).
- George Gaskell, Agnes Allansdottir, Nick Allum, Paula Castro, Yilmaz Esmer, Claude Fischler, Jonathan Jackson, Nicole Kronberger, Jurgen Hampel, Niels Mejlgaard, Alex Quintanilha, Andu Rammer, Gemma Revuelta, Sally Stares, Helge Torgersen, & Wolfgang Wager. (2011). *The 2010 Eurobarometer on the life sciences*.
- Gibbons, A., Bevacqua, R. J., Fernández-Martín, R., Pereyra-Bonnet, F., Cueto, M., Bruno-Galarraga, M., & Salamone, D. (2014). Transgénesis: Una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 40(2), 141–144.
- Gleba, Y., Marillonnet, S., & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: The “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 182–188). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Gómez-Tatay, L., & Aznar, J. (2019). CRISPR-CAS9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética. *Cuadernos de Bioética: Revista Oficial de La Asociación Española de Bioética y Ética Médica*, 30(99), 171–185. <https://doi.org/10.30444/CB.31>
- Granados, C. D., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). *Métodos de transformación genética de plantas*.
- Greenpeace. (2009). Impactos Sociales Y Económicos De Los Transgénicos. *Greenpeace -Pág.* 1(4), 1–4.
- Hansen G, & Wright M. (1999). *Recent advances in the transformation of plants*.
- Hellens R, & Philip M. (2000). *A guide to Agrobacterium binary Ti vectors*.
- Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: insights from yeast. In *Current genetics* (Vol. 59, Issues 1–2, pp. 1–31). <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0388-8>
- Houdebine, L.-M. (2003). *Animal Transgenesis and Cloning*. <http://mendeley.csuc.cat/fitxers/598852b78070c78f1327d498a24cac25>
- Hu, H., Li, B., & Duan, S. (2019). The alteration of subtelomeric DNA methylation in aging-related diseases. *Frontiers in Genetics*, 10(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00697>

- Jaenisch, R. (1988). *Transgenic Animals*. www.sciencemag.org
- Jauhar, P. P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. In *Crop Science* (Vol. 46, Issue 5, pp. 1841–1859). <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.07-0223>
- Jouve, N. (2000). Transgénesis y terapia génica. *Universidad de Alcalá*, 1–8. http://www3.uah.es/benito_fraile/ponencias/transgenesis.pdf
- Jozkowicz, A. (2017). *Helper-dependent adenoviral vectors in experiment gene therapy Europe PMC Funders Group Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy* *. 52(February 2005), 589–599. <https://doi.org/10.18388/abp.2005>
- Kajiyama S, Inoue F, Yoshikawa Y, Shoji T, Fukusaki E, & Kobayashi A. (2007). *Novel plant transformation system by gene-coated gold particle introduction into specific cell using ArF excimer laser*.
- Kohli, A., Twyman, R. M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E., & Christou, P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 52).
- Larrick, J. W., & Thomas, D. W. (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(4), 411–418. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00236-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00236-6)
- Lee, K., & Sang, E. L. (2007). *Saccharomyces cerevisiae Sae2- and Tell-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining*. *Genetics*, 176(4), 2003–2014. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.076539>
- Legorreta-herrera, M., Martínez-flores, F., Sánchez Hernández, F., & Zentella-dehesa, A. (2012). Los Vectores Virales Y La Transgénesis. *VERTIENTES Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 15(1), 5–14. <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2012/vre121a.pdf>
- Leiser, R., ZIEGLER-GRAFFt, V., REUTENAUERt, A., Herrbach, E., Guilley, H., RICHARDSt, K., & JONARDt, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. In *Plant Biology* (Vol. 89).
- Lentz, E. M., Kuon, J. E., Alder, A., Mangel, N., Zainuddin, I. M., McCallum, E. J., Anjanappa, R. B., Gruissem, W., & Vanderschuren, H. (2018). Cassava geminivirus agroclones for virus-induced gene silencing in cassava leaves and roots. *Plant Methods*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0340-5>
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000). *Section 8 . 5 Gene Replacement and Transgenic Animals Specific Sites in Cloned Genes Can Be Altered in Vitro DNA Is Transferred into Eukaryotic Cells in Various Ways*

- Normal Genes Can Be Replaced with Mutant Alleles in Yeast and Mice.* 1–8.
- Lu, Y., & Sharkey, T. D. (2006). The importance of maltose in transitory starch breakdown. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 29, Issue 3, pp. 353–366). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01480.x>
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1–8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Marqués, Margarita M.; Baro, Marta F.; Nicolás, Silvia; Bayón, Y. (2014). Biotecnología animal: Transgénesis en animales de granja. *AmbioCiencias*, 14, 34–49.
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005). Ultrasound-mediated gene delivery: Kinetics of plasmid internalization and gene expression. *Journal of Controlled Release*, 104(1), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.011>
- Moreno-Castro, C., Mendoza-Poudereux, I., & Vengut-Climent, E. (2020). *El papel que desempeña la comunicación de la ciencia en la opinión de la ciudadanía en España.* <https://concise-h2020.eu>
- Morigaki, K., & Walde, P. (2007). Fatty acid vesicles. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 12, Issue 2, pp. 75–80). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.05.005>
- Mosquera, M. (2001). Cultivos transgénicos: una mirada desde la economía Transgenic cultures: from the economic viewpoint. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 3(1), 44–52. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/30062/30260%3A%3Apdf>
- Munoz-Lopez, M., & Garcia-Perez, J. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 11(2), 115–128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
- Müther, N., Noske, N., & Ehrhardt, A. (2009). Viral hybrid vectors for somatic integration - Are they the better solution? In *Viruses* (Vol. 1, Issue 3, pp. 1295–1324). <https://doi.org/10.3390/v1031295>
- Órgano de divulgación de la Academia Colombiana de Ciencias, V. (2007). *Academia Colombiana de Ciencias Veterinarias.* 184.
- Palmiter, R. D., & Brinstert, R. L. (1985). Transgenic Mice Minireview. In *Cell* (Vol. 41).
- Parada, S., Schaper, M., & UN. ECLAC. Environment and Human Settlements Division. (2001). *Organismos genéticamente modificados: su impacto socioeconómico en la agricultura de los países de la Comunidad Andina, Mercosur y Chile.* Naciones Unidas, CEPAL, División de Medio Ambiente y Asentamientos Humanos.

- Peñaranda, M., & Asensio, F. (2019). Animales modificados genéticamente - Técnicas de obtención. *Biotecnología, 1*, 22–30. <http://www.nature.com/focus/rnai/animations/ani->
- Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Simancas, N. B., Bisschops, M. M. M., van den Brink, J., Solis-Escalante, D., Gallone, B., De Maeyer, D., van Bael, E., Wenseleers, T., Michiels, J., Marchal, K., Daran-Lapujade, P., & Verstrepen, K. J. (2018). The crabtree effect shapes the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase during the switch between different carbon sources. *MBio, 9*(5), 1–18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01331-18>
- Rocha-Martins, M., Cavalheiro, G. R., Matos-Rodrigues, G. E., & Martins, R. A. P. (2015). From gene targeting to genome editing: Transgenic animals applications and beyond. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 87*(2), 1323–1348. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140710>
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician, 9*(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>
- Sánchez, A.; Gadea, J. (2015). Animales transgénicos para producción de proteínas humanas. *18*(2014), 7–18.
- Sanford, J. C. (1999). *The development of the biolistic process.*
- Seol, J. H., Shim, E. Y., & Lee, S. E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 809*, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002>
- Sharma, K. K., Sharma, H. C., Seetharama, N., & Ortiz, R. (2002). Development and deployment of transgenic plants: Biosafety considerations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 38*(2), 106–115. <https://doi.org/10.1079/IVP2001268>
- Shastri, B. S. (2007). SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *Journal of Human Genetics, 52*(11), 871–880. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0200-z>
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Aslankoohi, E., Christiaens, J. F., Gemayel, R., Meert, W., New, A. M., Pougach, K., Saels, V., Van Der Zande, E., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2012). Selecting and generating superior yeasts for the brewing industry. *Cerevisia, 37*(2), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2012.08.001>
- Sutton, S. (2011). Microbiology Topics. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. In 46 *JOURNAL OF VALIDATION TECHNOLOGY*. www.microbiol.org
- Vasil, I. K. (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews, 7*(3), 387–394.

<https://doi.org/10.1007/s11101-007-9075-z>

- Vigara Fernández, Javier; Vega Piqueres, J. M. (2016). *Alimentos del futuro: impacto de los transgénicos*. Editorial Universidad de Sevilla., https://cataleg.uab.cat/iii/encore/record/C__Rb2082710__Salimentos del futuro: impacto de los transg%E9nicos__Orightresult__U__X4?lang=cat
- Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: A review. In *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (Vol. 41).
- Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Li, S., Cheng, L., Wang, Q., Wu, Y., Huang, P., Sun, Q., ... Yang, H. (2017). Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Research*, 27(6), 801–814. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.76>
- Zastrow, C., Hollatz, C., de Araujo, P., & Stambuk, B. (2001). Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (Vol. 27). <https://academic.oup.com/jimb/article/27/1/34/5990354>
- Zhu, Y. O., Siegal, M. L., Hall, D. W., & Petrov, D. A. (2014). Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1323011111>