

LA REPLICACIÓ DEL MATERIAL GENÈTIC EN ELS BACTERIS I EL SEU CICLE CEL·LULAR

**CURS D'ACTUALITZACIÓ DE CONCEPTES DE MICROBIOLOGIA
INSTITUT DE CIÈNCIES DE L'EDUCACIÓ
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

16 DE NOVEMBRE DE 2022

**Jordi Barbé Garcia
Dpt Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències (UAB)**

**AQUESTA XERRADA NO PRETÉN SER UNA CLASSE DE BATXILLERAT SINÓ
UNA REVISIÓ I ACTUALITZACIÓ DEL SABERS RECOLLITS SOTA LA DENOMINACIÓ GENÈRICA
“ANÀLISI DEL MECANISME DE REPLICACIÓ DEL DNA MITJANÇANT EL MODEL PROCARIOTA”
QUE FORMA PART DEL BLOC SOBRE GENÈTICA I CICLE CEL·LULAR DE
LA MATÈRIA DE BIOLOGIA DEL SEGON CURS DE BATXILLERAT D'ACORD AMB LA NOVA
DESCRIPCIÓ DEL CURRÍCULUM PER AQUEST NIVELL DE L'ENSENYAMENT
(DIARI OFICIAL DE LA GENERALITAT DE CATALUNYA DEL 22 DE SETEMBRE DE 2022)**

**EN AQUEST CONTEXT, ELS CONCEPTES QUE ES TRACTARAN NOMÉS SÓN ELS MÉS RELLEVANTS
DEL TEMA QUE HAN SOFERT NOVES FORMULACIONS EN, APROXIMADAMENT, ELS DARRERS 30 ANYS**

DE QUÈ PARLAREM?

- + SÍNTESI DELS PRECURSORS DE LA REPLICACIÓ DEL DNA EN BACTERIS
- + ETAPES EN LA REPLICACIÓ DELS CROMOSOMES BACTERIANS
- + FIDELITAT DE LA REPLICACIÓ DEL DNA
- + CICLE CEL·LULAR EN BACTERIS I LES SEVES CONSEQÜÈNCIES
- + CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL CICLE CEL·LULAR EN ARQUEUS

QUÈ CAL ABANS DE COMENÇAR LA REPLICACIÓ DEL CROMOSOMA?

DISPOSAR DELS PRECURSORS

1. dNTPs

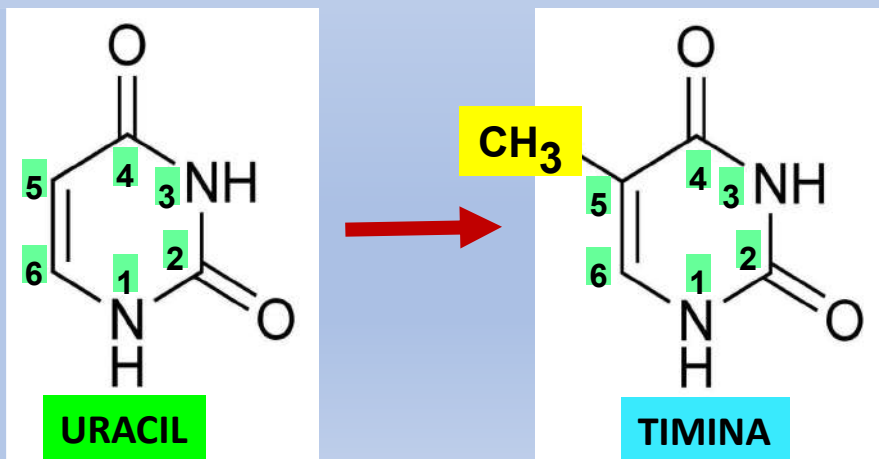
A *E. coli*, per cada 1.000 NTP tenim 1 dNTP

Les cèl·lules bacterianes necessiten molts NTPs per poder sintetitzar els RNAs, fonamentalment el RNA ribosomal

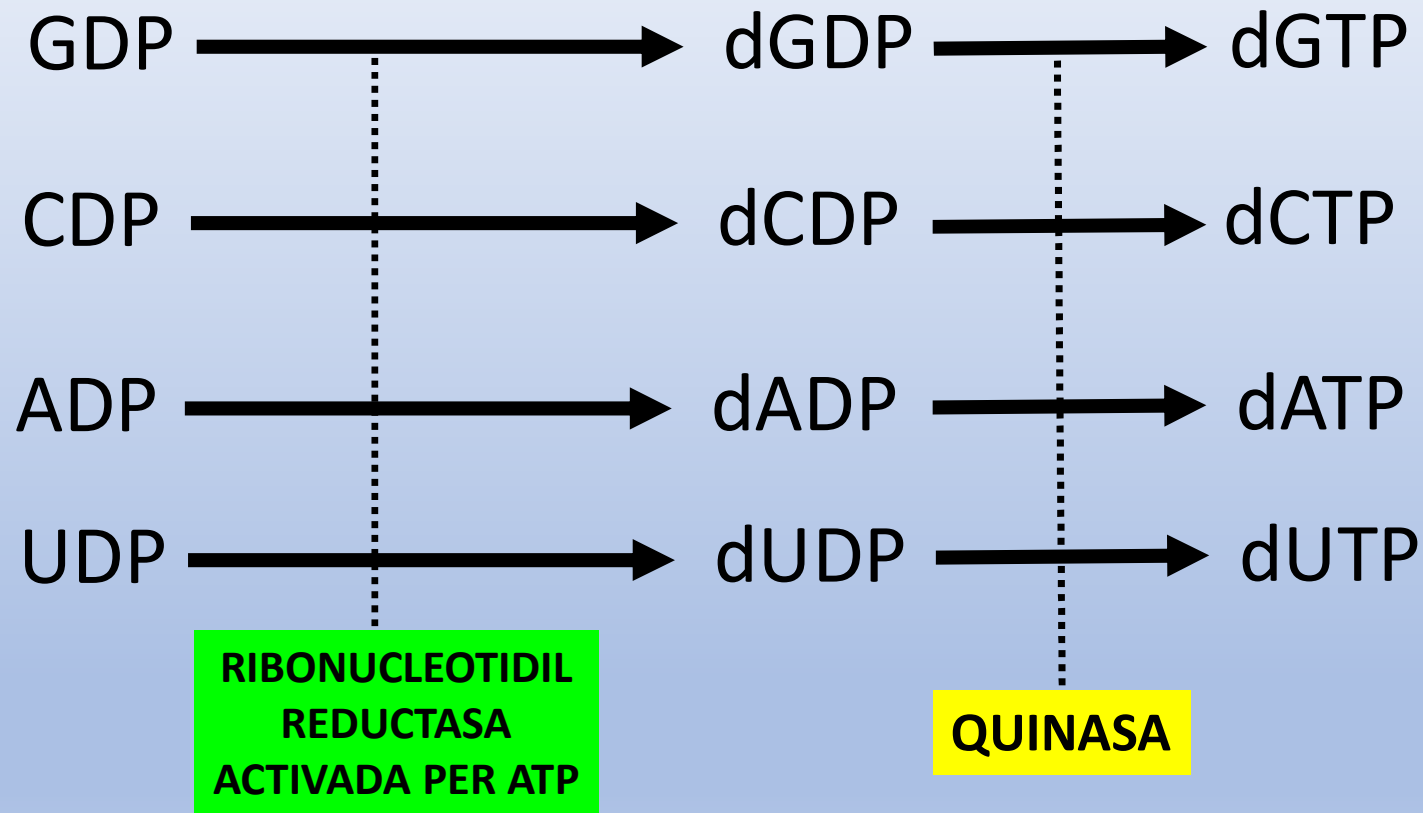


CONTROLAR LA SÍNTESI DELS dNTP

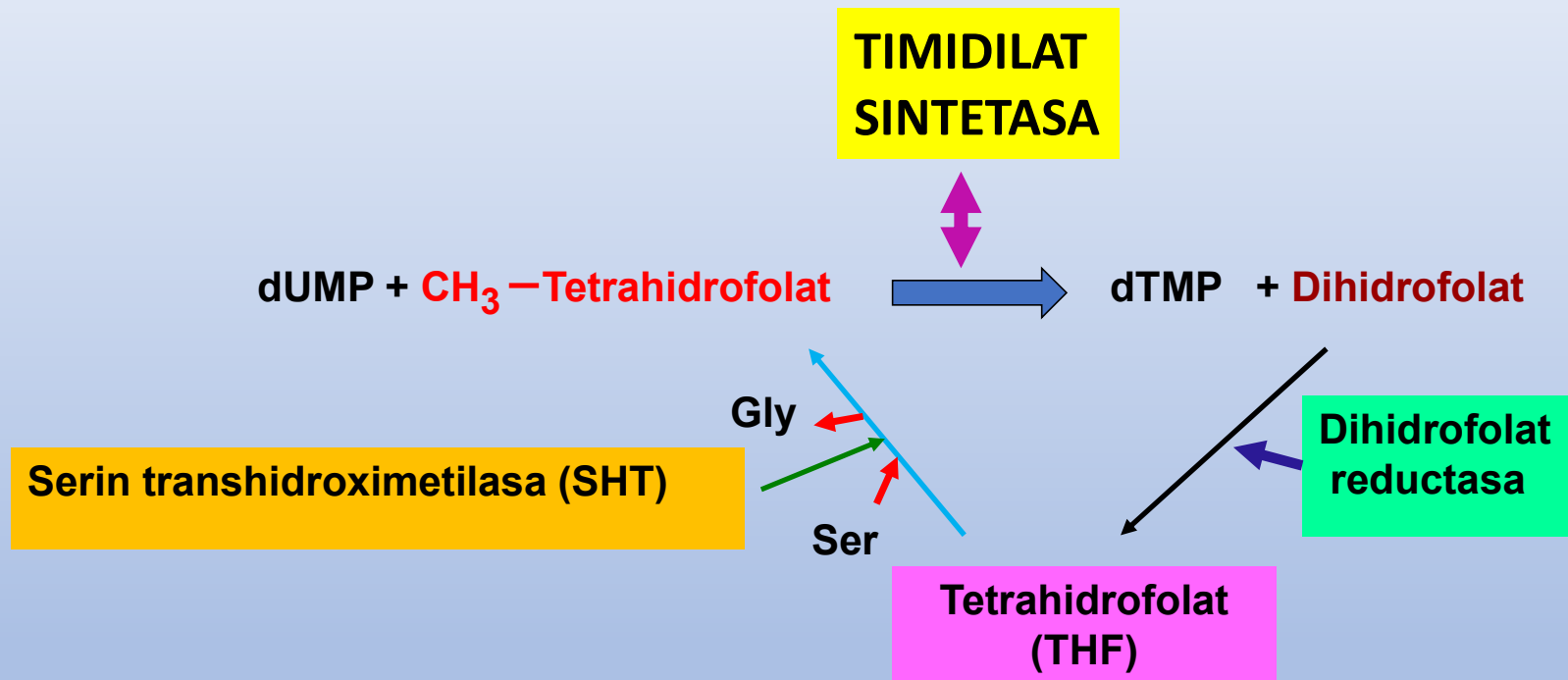
2. Timina



SÍNTESI DE dNTPs



SÍNTESI DE TIMIDINA



CONCLUSIONS ANÀLISI SÍNTESI PRECURSORS

UN ÚNIC ENZIM SINTETITZA TOTS ELS dNTPs
RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASA

VIA ÚNICA PER SINTETITZAR LA TIMIDINA
TIMIDILAT SINTETASA

**BONES DIANES
TERAPÈUTIQUES**

EL QUIMIOTERÀPIC TRIMETOPRIM
INHIBEIX L'ENZIM DIHIDROFOLAT
REDUCTASA I PROVOCA LA MORT
DE LES CÈL·LULES BACTERIANES
EN INHIBIR LA SÍNTESI DE dTMP

EL TRIMETOPRIM ÉS D'ÚS
HABITUAL, ENTRE ALTRES,
EN INFECCIONS URINÀRIES

UN COP TENIM ELS PRECURSORS, JA PODEM INICIAR LA REPLICACIÓ DEL CROMOSOMA

ETAPES DEL CICLE DE QUALSEVOL CÈL·LULA

DUPLICACIÓ MATERIAL GENÈTIC



OBERTURA DELS CROMOSOMES



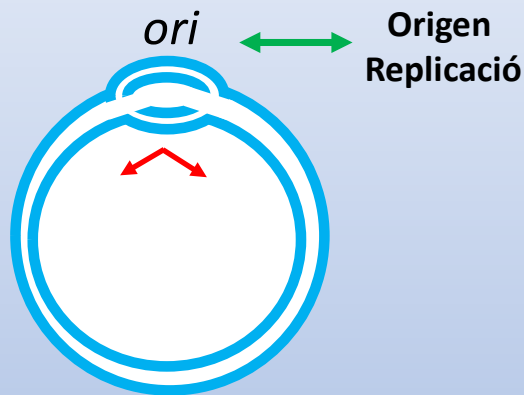
REPLICACIÓ DELS CROMOSOMES

REPARTIMENT DELS CROMOSOMES
i DIVISIÓ DE LES CÈL·LULES

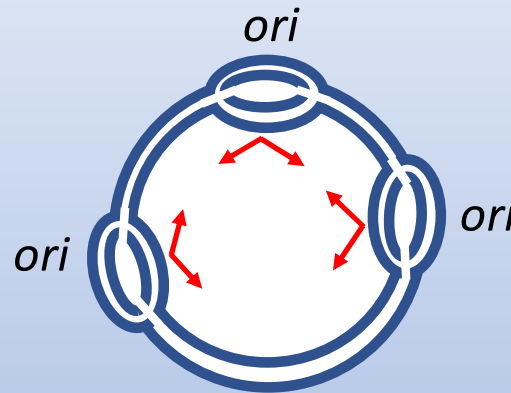
ESTRATÈGIES D'OBERTURA DELS CROMOSOMES A L'ARBRE FILOGENÈTIC DE LA VIDA

LUCA (Last Universal Common Ancestor)

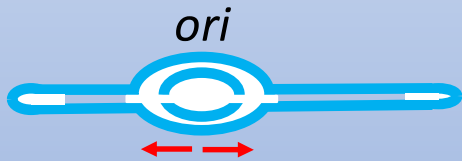
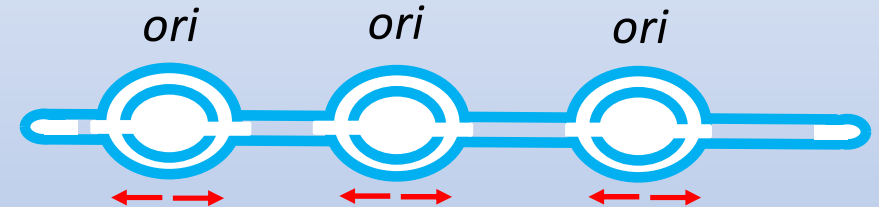
DOMINI BACTERIA



DOMINI ARCHAEA



DOMINI EUKARYA



CROMOSOMA CIRCULAR o LINEAL

1 ORIGEN DE REPLICACIÓ PER CROMOSOMA

CROMOSOMA CIRCULAR

ENTRE 2-4 ORÍGENS DE REPLICACIÓ PER CROMOSOMA

CROMOSOMA LINEAL

MÚLTIPLES ORÍGENS DE REPLICACIÓ PER CROMOSOMA

A *Saccharomyces cerevisiae* HI HA UNS 350 DISTRIBUÏTS

ENTRE ELS SEUS 16 CROMOSOMES

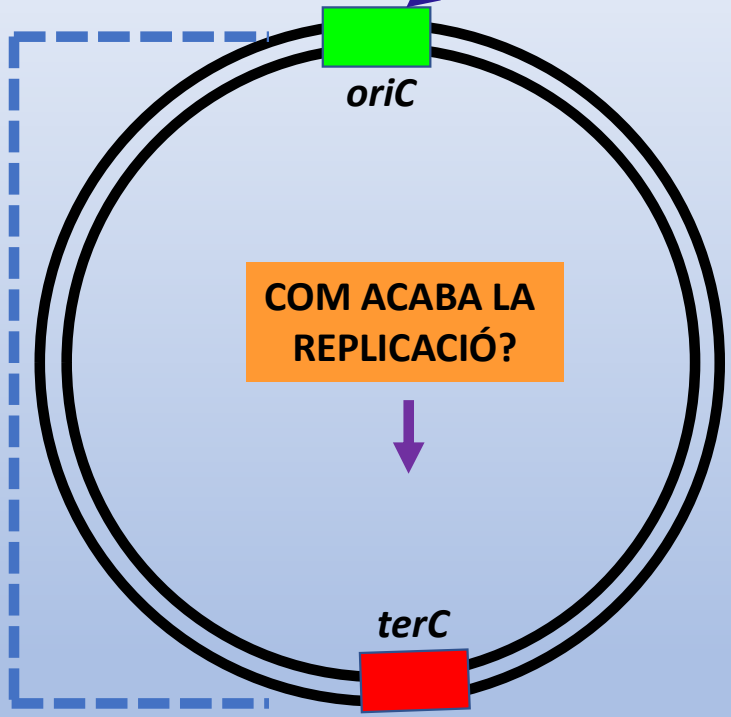
EN TOTS ELS CASOS LA REPLICACIÓ ÉS BIDIRECCIONAL (↔)

MECANISME MOLECULAR DE L'INICI I DE LA FINALITZACIÓ DE REPLICACIÓ D'UN CROMOSOMA CIRCULAR BACTERIÀ

DEGUT A QUE LA REPLICACIÓ ÉS BIDIRECCIONAL EL PUNT D'ORIGEN I EL DE FINALITZACIÓ ES TROBEN SEPARATS PER 180 GRAUS



LA VELOCITAT DE CÒPIA DEL DNA ÉS LA MATEIXA PER LES DUES DIRECCIONS



COM ACABA LA REPLICACIÓ?



Proteïna DnaA



La proteïna DnaA s'uneix a una seqüència específica en la regió *oriC*. Aquesta unió de la proteïna DnaA origina l'obertura de la doble cadena de DNA.

TOTS ELS BACTERIS TENEN LA MATEIXA VELOCITAT DE REPLICACIÓ?

Escherichia coli 1000 nucleòtids / segon
Bacillus subtilis 500 nucleòtids / segon

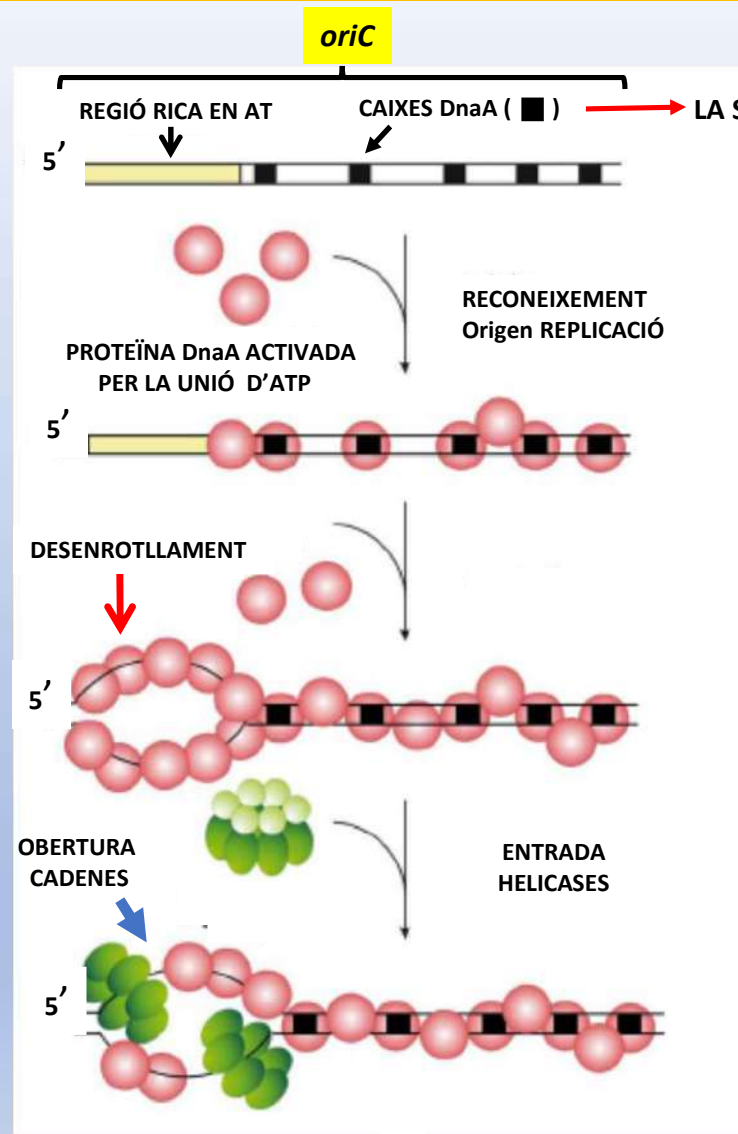
PER QUINA RAÓ?

Proteïna Tus



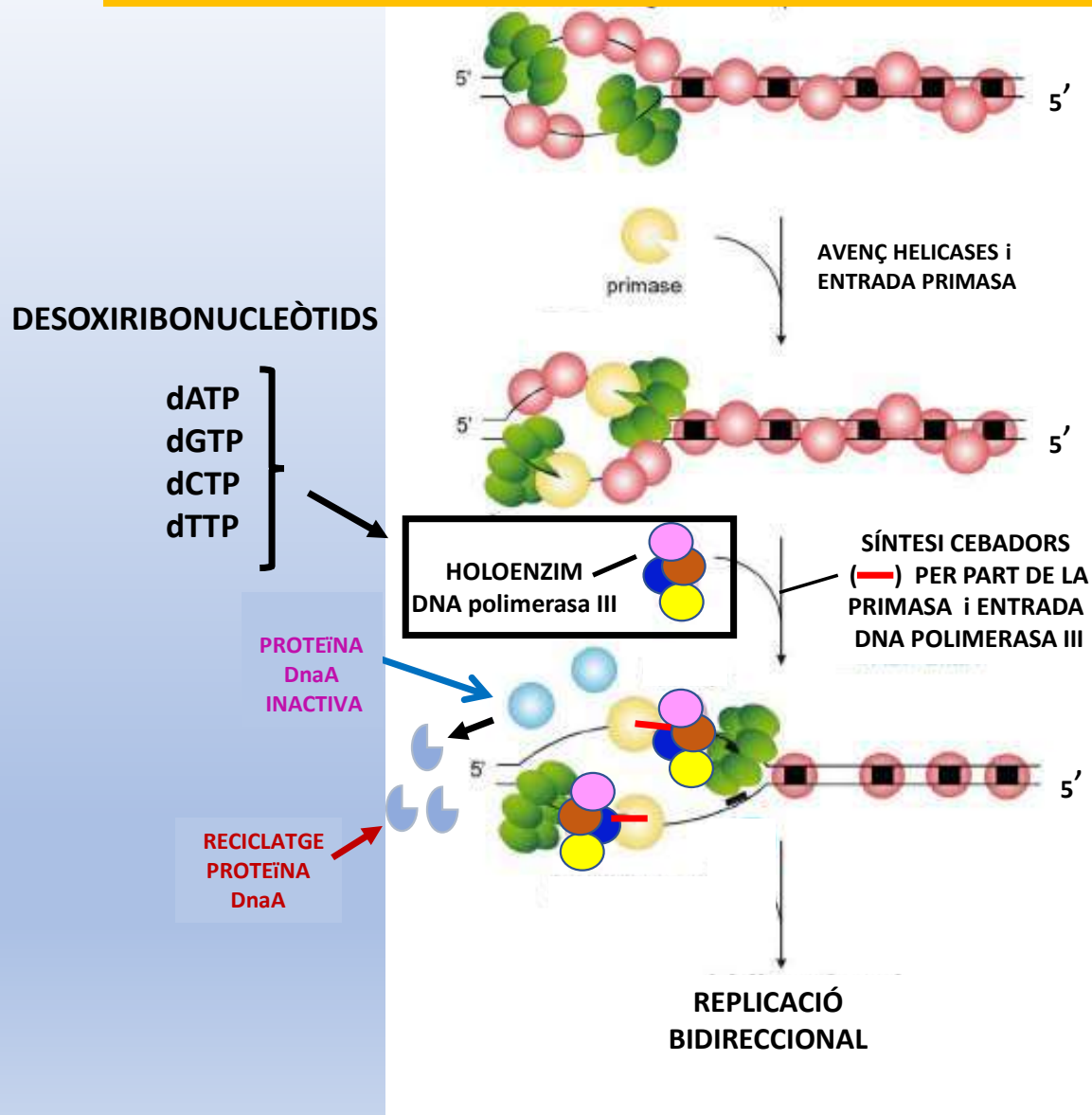
La proteïna Tus interacciona amb una seqüència específica que es troba en la regió *terC*. La unió de la proteïna Tus interfereix amb la progressió de la replicació el que provoca la finalització de la còpia del DNA.

COM S'OBRE EL CROMOSOMA BACTERIÀ I QUÈ SUCCEEIX DESPRÉS? (1)

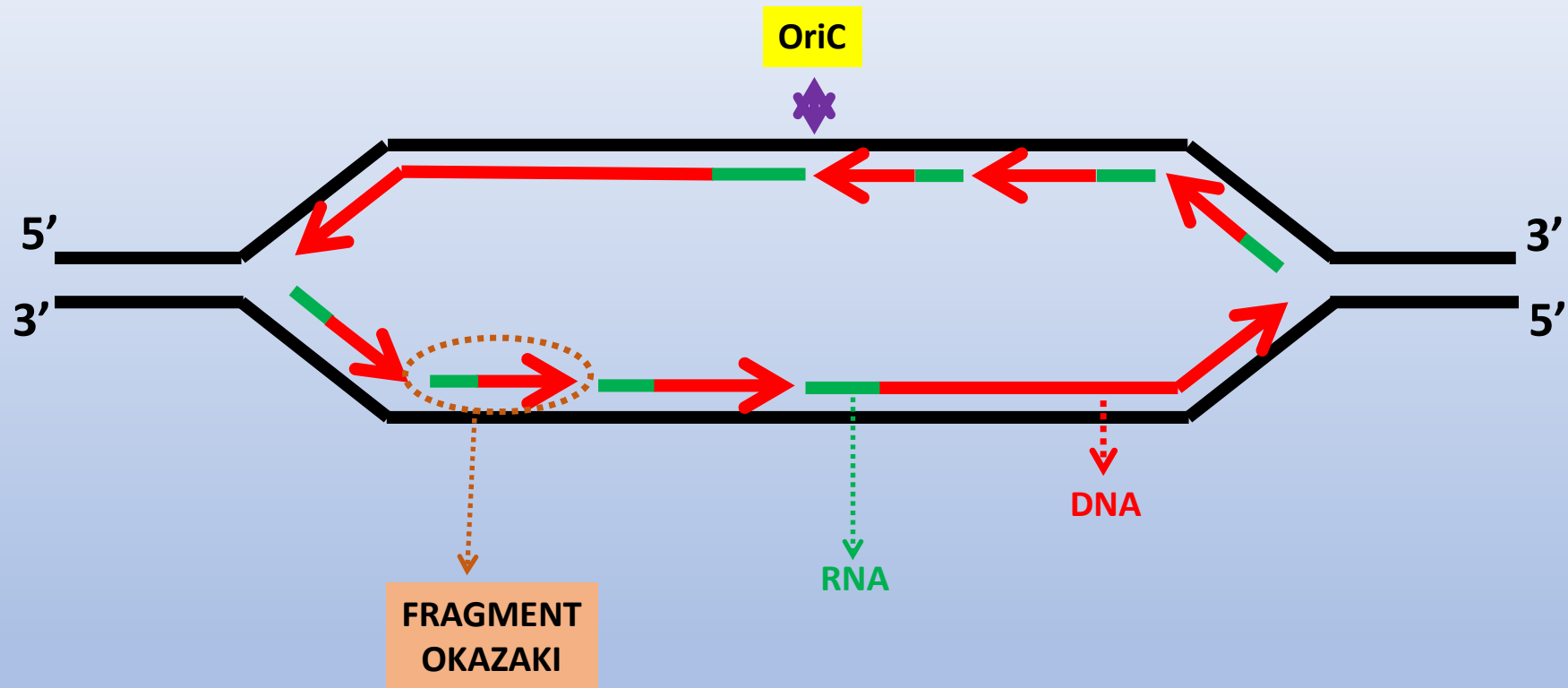


LA SEQÜÈNCIA DE LA CAIXA DnaA ÉS
TTATCCACA

COM S'OBRE EL CROMOSOMA BACTERIÀ I QUÈ SUCCEEIX DESPRÉS? (2)



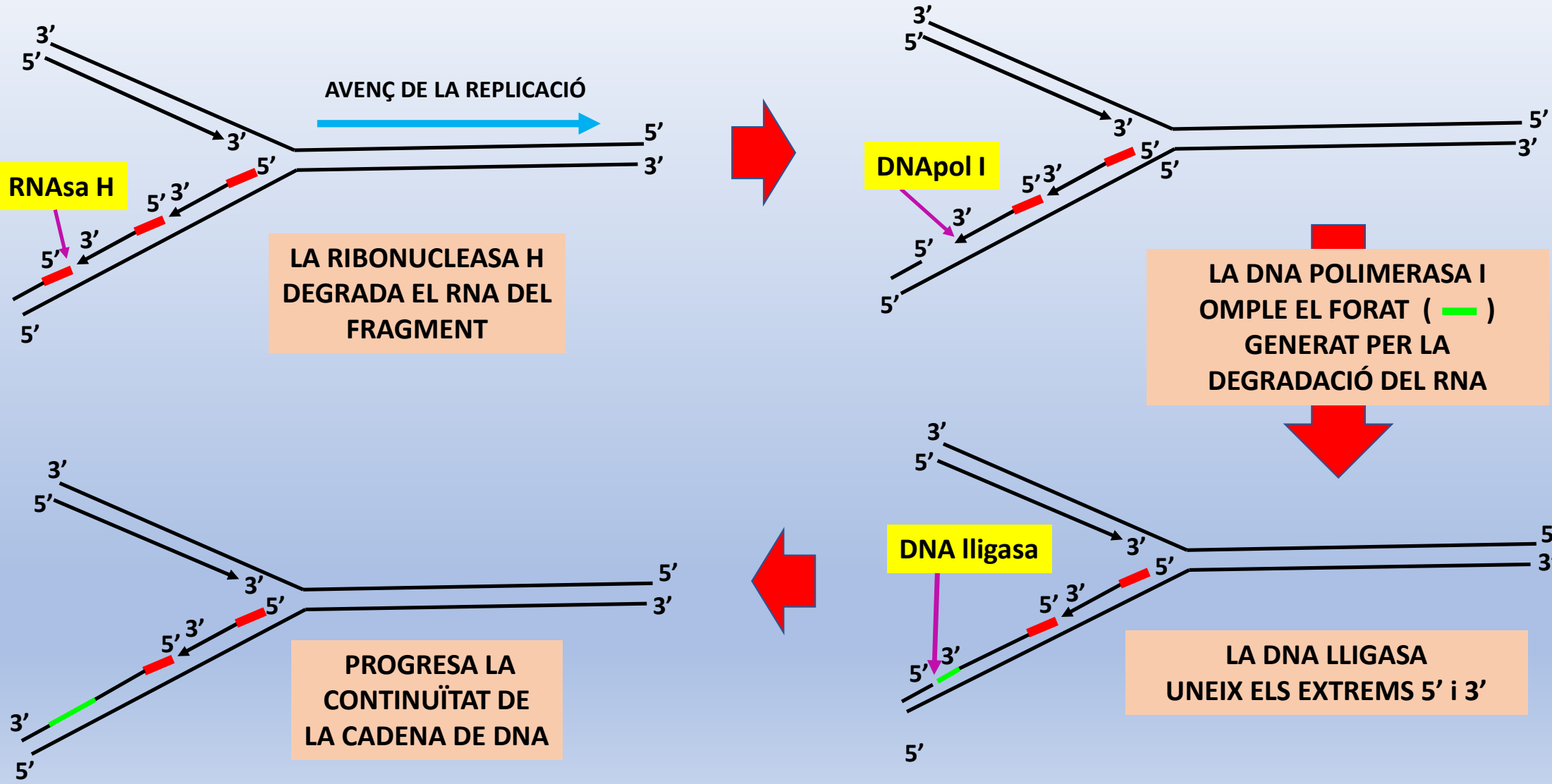
ASPECTE REGIÓ OriC D'UN CROMOSOMA BACTERIÀ IMMEDIATMENT DESPRÉS DE L'INICI DE LA REPLICACIÓ



A *E. coli* tenen una extensió de 1.000 – 2.000 nucleòtids amb uns 10 residus de RNA.

A eucariotes i arqueus, l'extensió és al voltant de 100 nucleòtids

COM ES PROCESSEN ELS FRAGMENTES D'OKAZAKI?



LES DNA POLIMERASES S'EQUIVOQUEN ESPONTÀNIAMENT

✓ **Taxa de mutació per genoma és de l'ordre de 10^{-4}**

✓ **Freqüència de mutació espontània detectada és de l'ordre de $10^{-6/-9}$**

Com es justifica aquesta diferència???

Reparació dels errors de còpia!!!



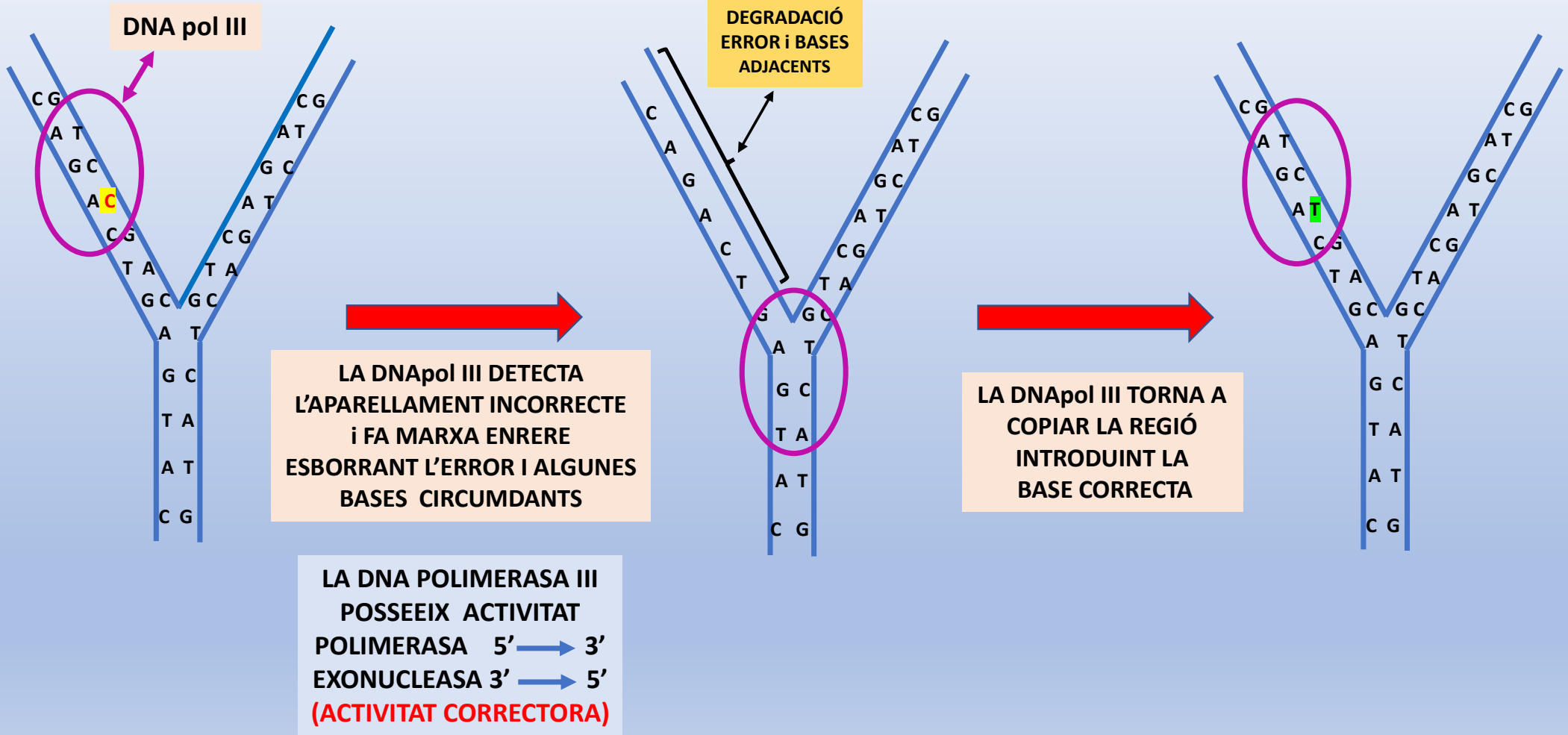
MECANISMES DE CORRECCIÓ DELS ERRORS DE CÒPIA DE LES DNA POLIMERASES

**LA CORRECCIÓ DELS ERRORS DE CÒPIA DE LES DNA POLIMERASES BACTERIANES
POT SEGUIR DUES ESTRATÈGIES DIFERENTS**

1. CORRECCIÓ DE L'ERROR DURANT LA REPLICACIÓ DE LA REGIÓ

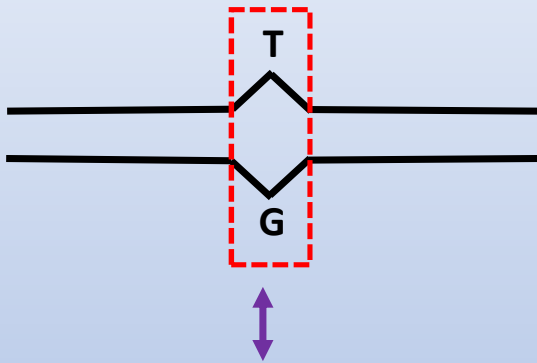
2. CORRECCIÓ UN COP FINALITZADA LA REPLICACIÓ DE LA REGIÓ

CORRECCIÓ DELS ERRORS DE CÒPIA DE LES DNA POLIMERASES DURANT LA REPLICACIÓ



CORRECCIÓ DELS ERRORS DE CÒPIA DE LES DNA POLIMERASES UN COP FINALITZADA LA REPLICACIÓ

APARELLAMENT INCORRECTE
(MISMATCH)



S'HA COMPLETAT
LA REPLICACIÓ
DE LA REGIÓ I LA
DNApol III NO HA
CORREGIT L'ERROR

LA NO CORRECCIÓ DE L'ERROR ORIGINARÀ MUTACIONS EN REPLICACIONS POSTERIORES

DONAT QUE LA DNApol III JA HA MARXAT NO POT CORREGIR L'ERROR

QUAN LA DNApol III HI ERA PODIA SABER QUINA ERA LA CADENA VELLA I
PER TANT QUINA BASE ERA LA ERRÒNIA

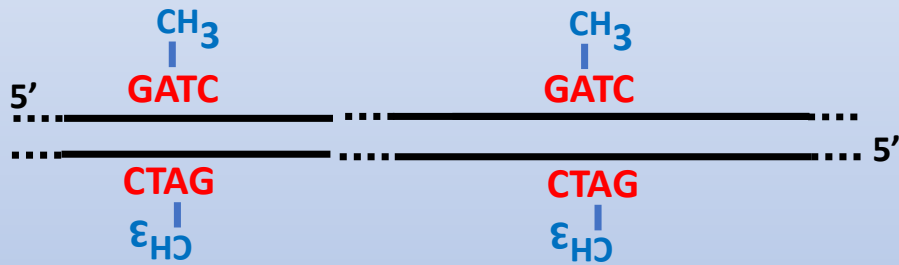
**PER CORREGIR L'ERROR, LA CÈL·LULA HA DE SABER QUINA
BASE ÉS LA INCORRECTE!!!**

COM HO POT ESBRINAR?

LES CÈL·LULES BACTERIANES TENEN UN SISTEMA PER DISTINGIR LES
CADENES DE DNA VELLES DE LES NOVES



EL SISTEMA DE METILACIÓ Dam d'*Escherichia coli*

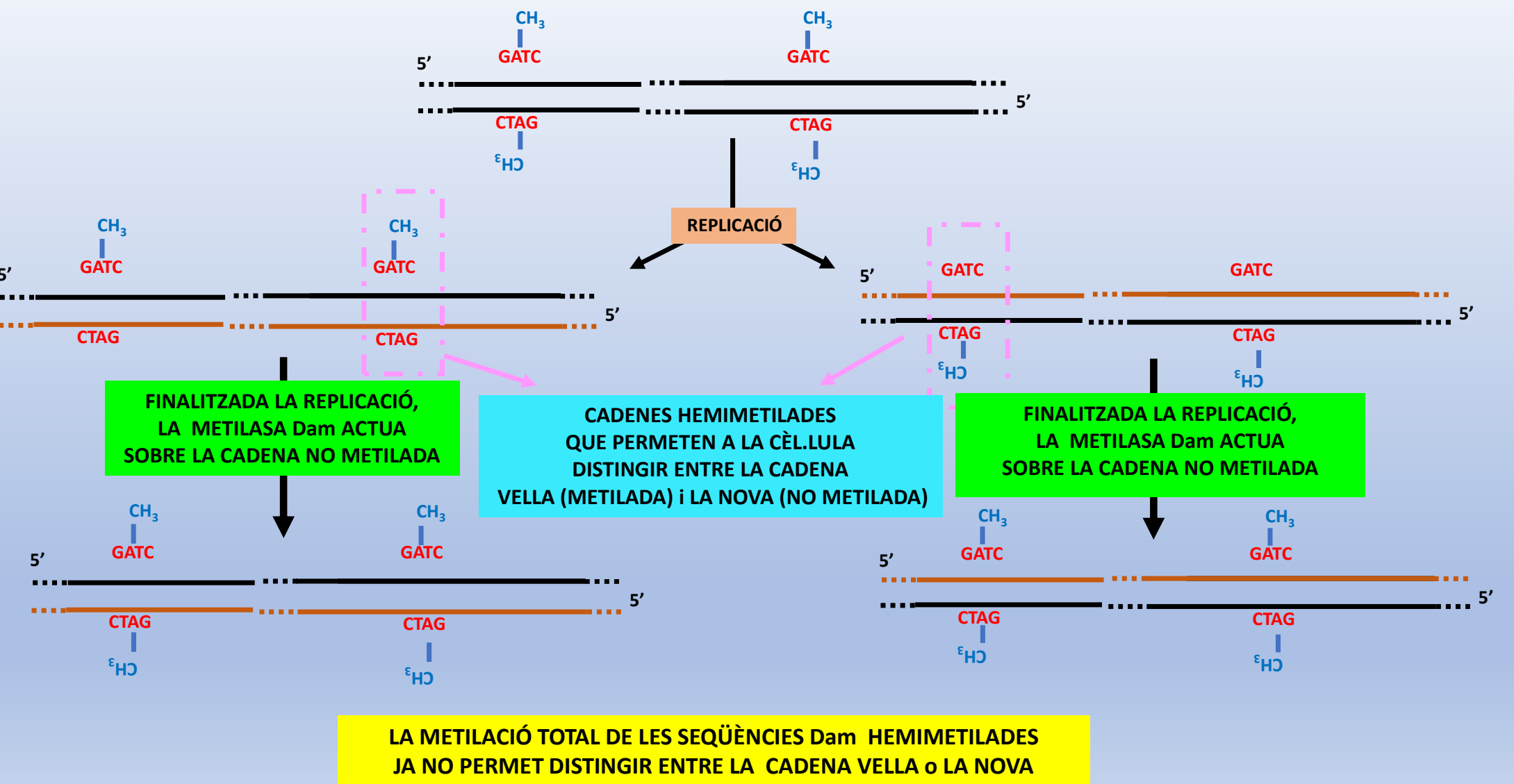


EL CROMOSOMA D'*E. coli* CONTÈ MOLTES CÒPIES DE LA SEQÜÈNCIA 5'-GATC-3' EN EL SEU CROMOSOMA

APROXIMADAMENT HI HA UNA CADA 250 NUCLEÒTIDS

UNA METILASA CODIFICADA PEL GEN *dam* (Desoxiadenina metilasa) RECONEIX LA SEQÜÈNCIA 5'-GATC-3' I METILA L'ADENINA

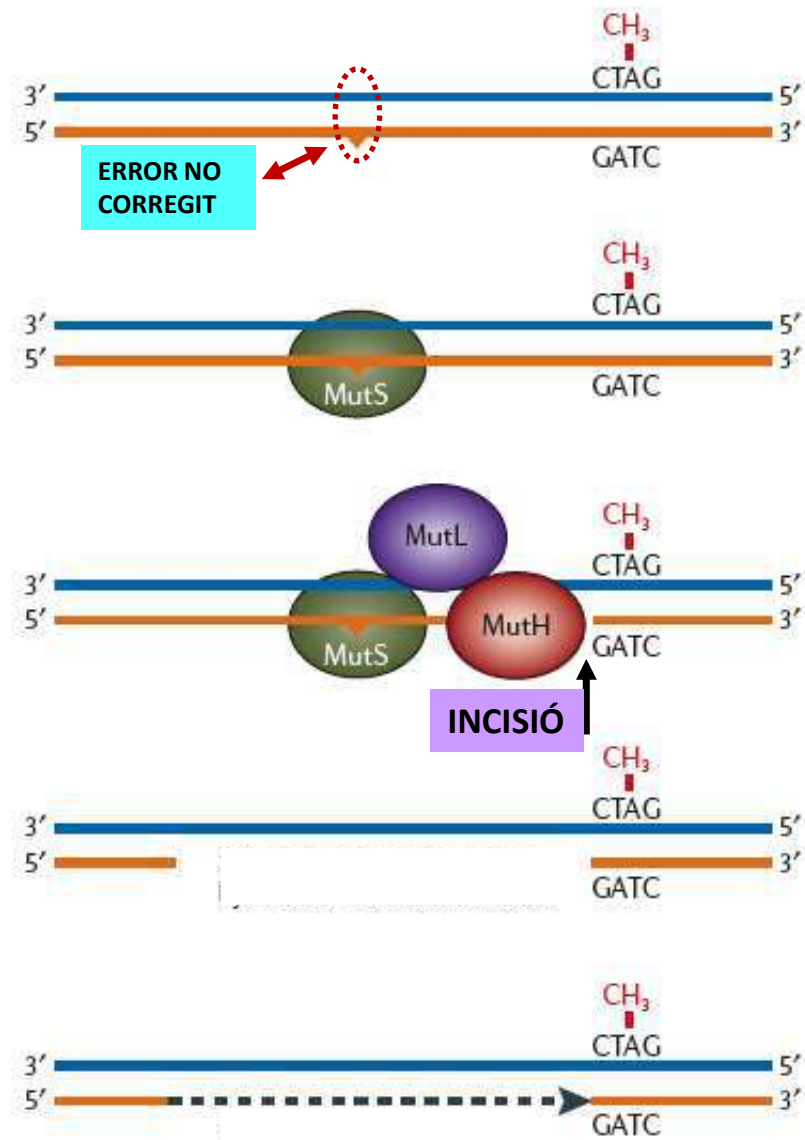
LA METILACIÓ Dam ÉS POSTREPLICATIVA



SISTEMA CORRECTOR D'ERRORS DE CÒPIA MITJANÇANT LES SEQÜÈNCIES Dam

ACTUACIÓ ABANS DE LA METILACIÓ DE LA CADENA NOVA

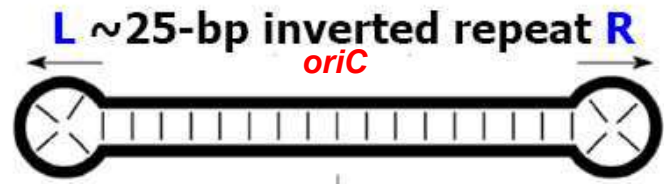
1. Reconeixement de la lesió per la proteïna MutS i identificació de la cadena metilada
2. Entrada de les proteïnes MutL i MutH al complex de reparació. Incisions a la cadena no metilada (nova)
3. Exonucleases degraden el DNA
4. Reompliment de la cadena per la DNA Pol III i acció de la lligasa



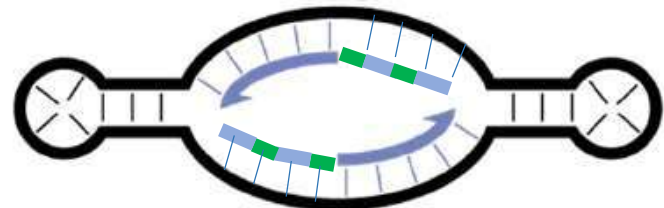
RECULL DE PROTEÏNES D'*E. coli* NECESSÀRIES PER A LA REPLICACIÓ DEL SEU CROMOSOMA

PROTEÏNA	FUNCIÓ
DnaA	OBERTURA CROMOSOMA
HELICASES	SEPARACIÓ DUES CADENES DE DNA
UNIÓ CADENA SENZILLA (Ssb)	ESTABILITZACIÓ CADENES SEPARADES
PRIMASA	RNA POLIMERASA QUE SINTETITZA EL RNA DELS FRAGMENTS D'OKAZAKI
HOLOENZIM DNA POLIMERASA III	REPLICACIÓ DEL CROMOSOMA (FORMADA PER 10 SUBUNITATS)
RIBONUCLEASA H	DEGRADA EL RNA DELS CEBADORS
DNA POLIMERASA I	DEGRADA EL DNA DELS FRAGMENTS D'OKAZAKI i CÒPIA EL MOTLLO
DNA LLIGASA	LLIGA ELS EXTREMS LLIURES PRODUÏTS AL LLARG DE LA REPLICACIÓ
DNA GIRASES	DESENROTLEN EL DNA
TIMIDILAT SINTETASA	SINTETITZA EL PRECURSOR dTMP
RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASA	SINTETITZA TOTS ELS dNDPs
METILASA DAM	METILA LA SEQÜÈNCIA GATC I PERMET DISTINGIR LA CADENA VELLA DE LA NOVA
PROTEÏNES Mut	REONEIXEN ERRORS EN L'APARELLAMENT DE BASES I ELS CORREGEIXEN
PROTEÏNA Tus	PROVOCA LA FI DE LA REPLICACIÓ
PROTEÏNES XerCD	PERMETEN LA DIFERENCIACIÓ DELS DOS CROMOSOMES A LA FI DE LA REPLICACIÓ

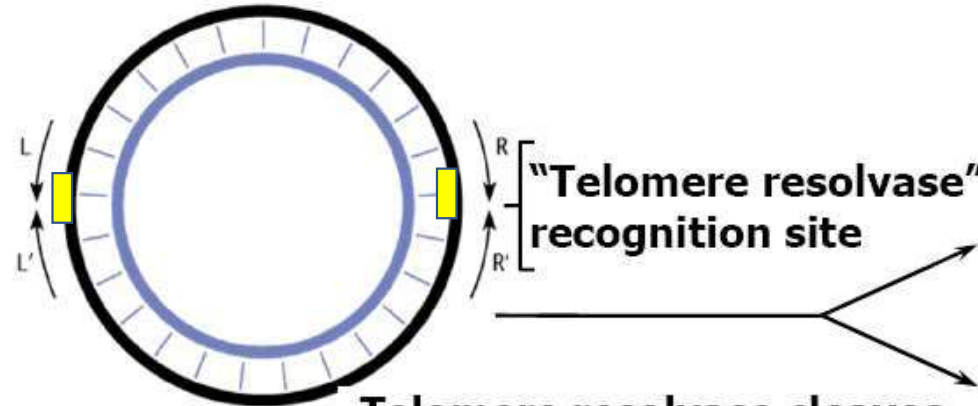
REPLICACIÓ DE CROMOSOMES LINEALS AMB TELOMERS



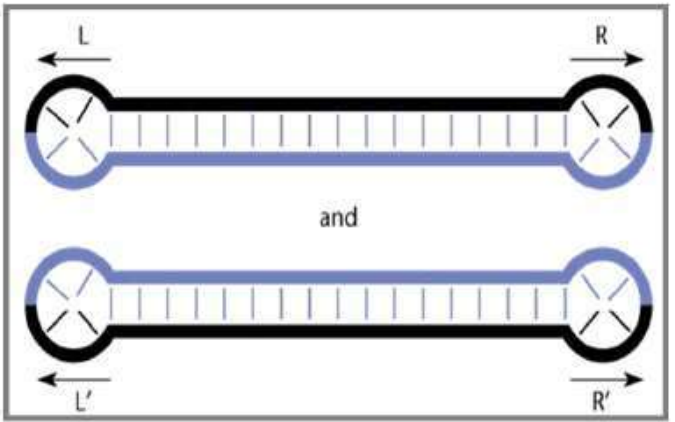
Replication initiated from internal origins



Replication produces a circular dimer



Telomere resolvase cleaves and ligates appropriate ends to form hairpins



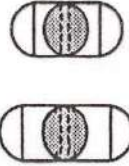
Adaptat de Casjens, S. (1999)

REPRESENTACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR BACTERIÀ: EXEMPLE A *E. coli*

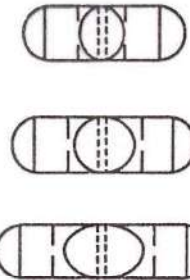
MORFOGÈNESI

Nova Cèl.lula

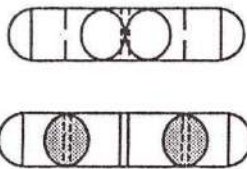
INICI ELONGACIÓ DE LA CÈL·LULA



AL LLARG DEL CICLE CEL·LULAR LES CÈL·LULES CREIXEN LONGITUDINALMENT DE FORMA CONTINUADA



INICI SEPTACIÓ



DIVISIÓ



Cèl·lules Noves

FASE DEL CICLE CEL·LULAR

FASE I

Temps necessari per a l'acumulació de la proteïna Dna A

Duració variable en funció de la riquesa del medi

FASE C

Inici replicació cromosoma
Finalització replicació
Diferenciació cromosomes

Duració 40 min*

FASE D

Formació del septe
Divisió cel·lular

Duració 20 min*

AQUESTA ESTRUCTURA DEL CICLE CEL·LULAR ÉS GENERAL PER A TOTES LES ESPÈCIES BACTERIANES!!

* Valors per *E. coli*

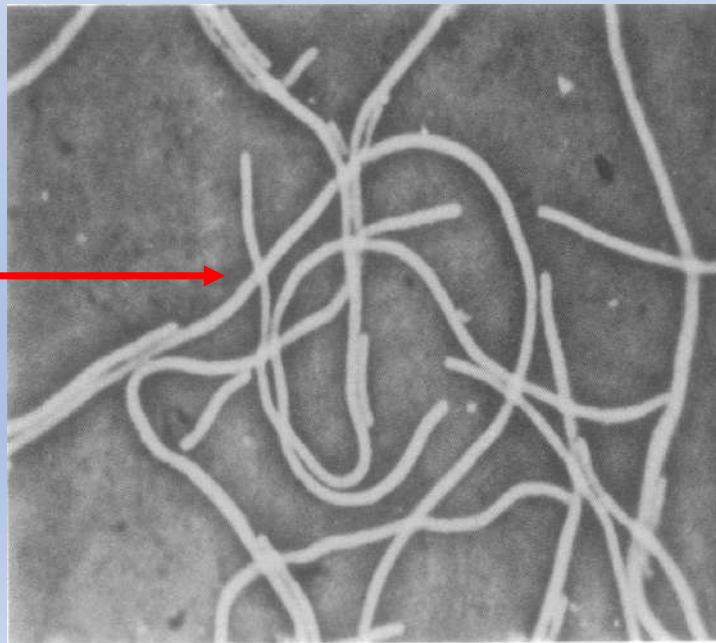
PODEN VARIAR EN ALTRES ESPÈCIES BACTERIANES

LES TRES FASES DEL CICLE CEL·LULAR BACTERIÀ ESTAN INTERRELACIONADES



LA INTERRUPCIÓ DE LA FASE I IMPLICA QUE NO COMENÇA LA FASE C i LA INTERRUPCIÓ DE LA FASE C COMPORTA QUE NO TE LLOC LA FASE D i PER TANT NO HI HA DIVISIÓ

FILAMENTS CEL·LULARS
ORIGINATS AL INTERROMPRE'S
LA FASE DE REPLICACIÓ C



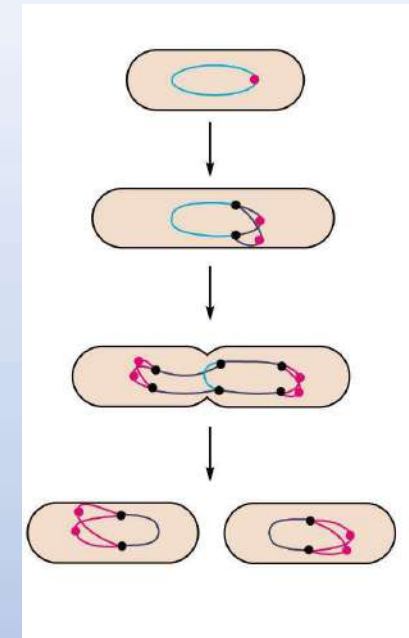
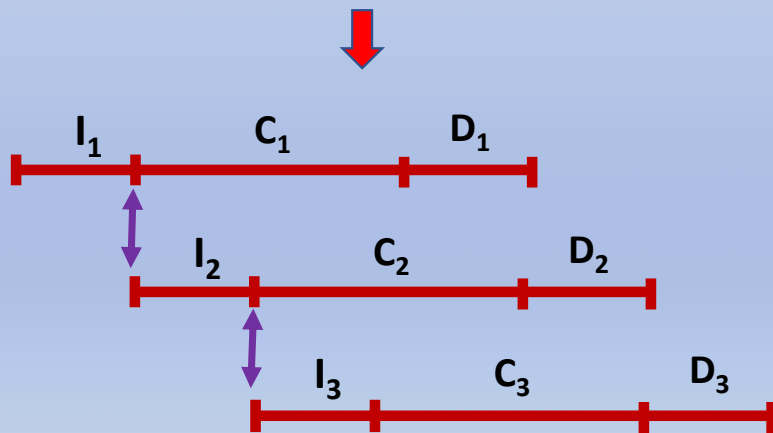
El cicle cel·lular bacterià i el número de còpies cromosòmiques

Inici de la replicació cromosòmica està marcat per

i) La concentració de DnaA i la unió d'aquesta a l'oriC

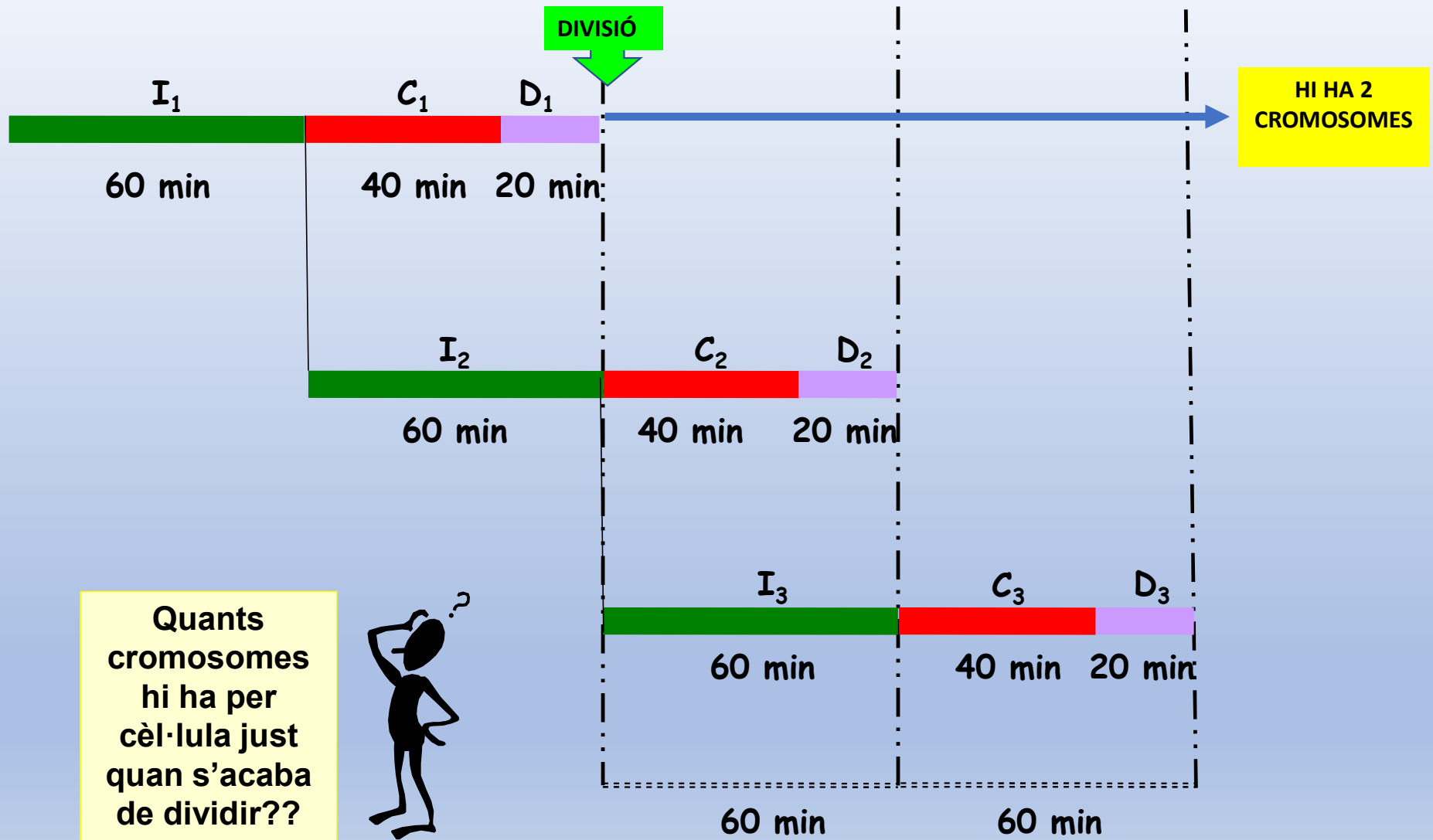
ii) Disponibilitat de dNTPs

Quan s'acaba una fase I s'inicia una nova fase I₂ donat que la cèl·lula sintetitza de forma continuada proteïna DnaA el que implica que quan s'aconsegueix el nivell necessari de proteïna DnaA per obrir l'*oriC* es torna a començar la fase (C) de replicació

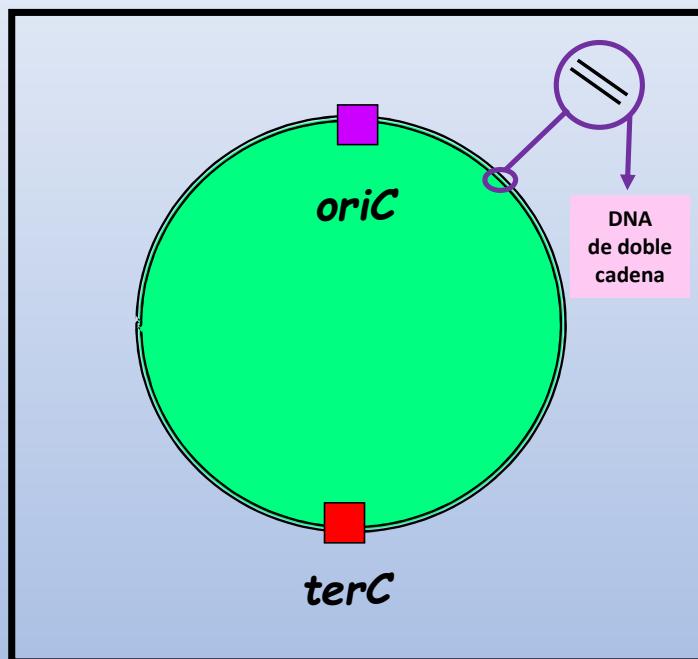


Podem tenir cèl·lules que continguin més d'una còpia del(s) seu(s) cromosoma(es)

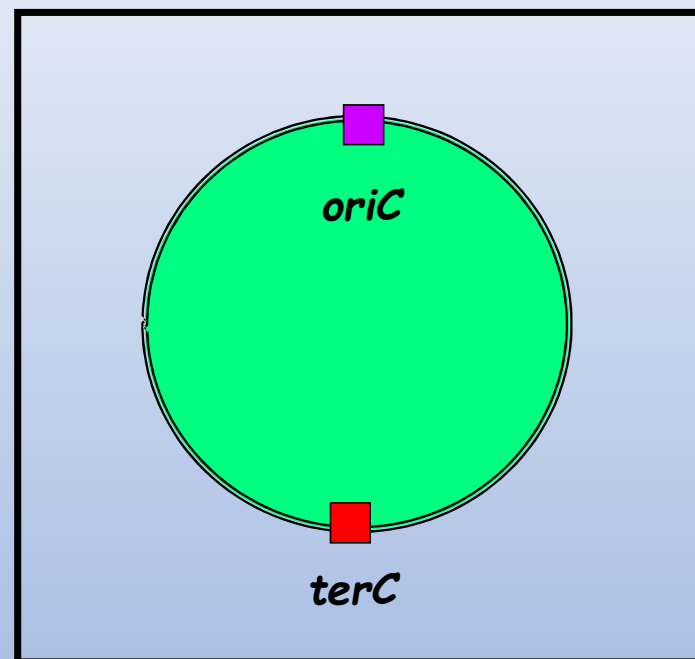
Durada de FASE I de 60 min



Durada de FASE I de 60 min

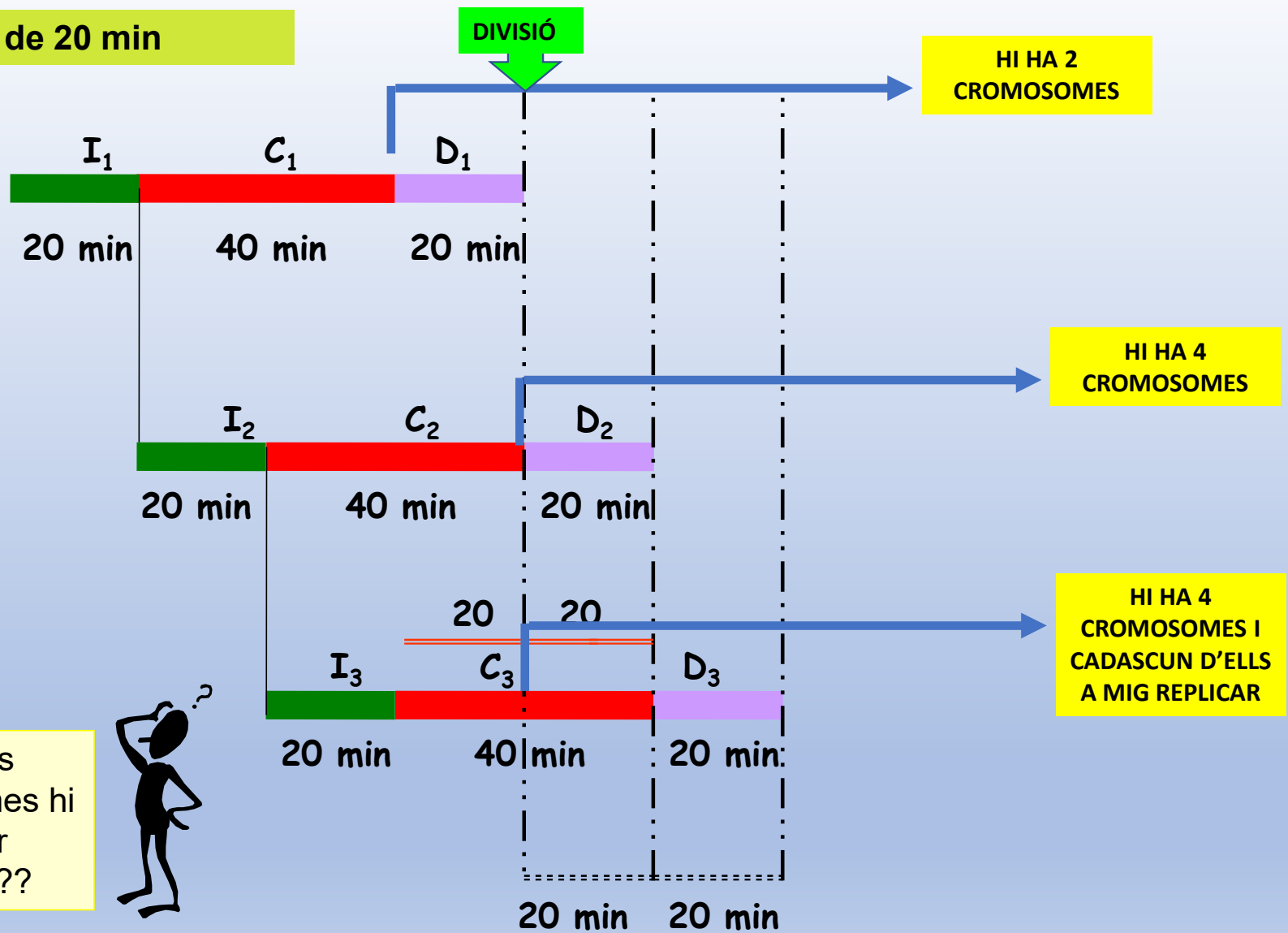


CÈL·LULA 1



CÈL·LULA 2

Durada de FASE I de 20 min

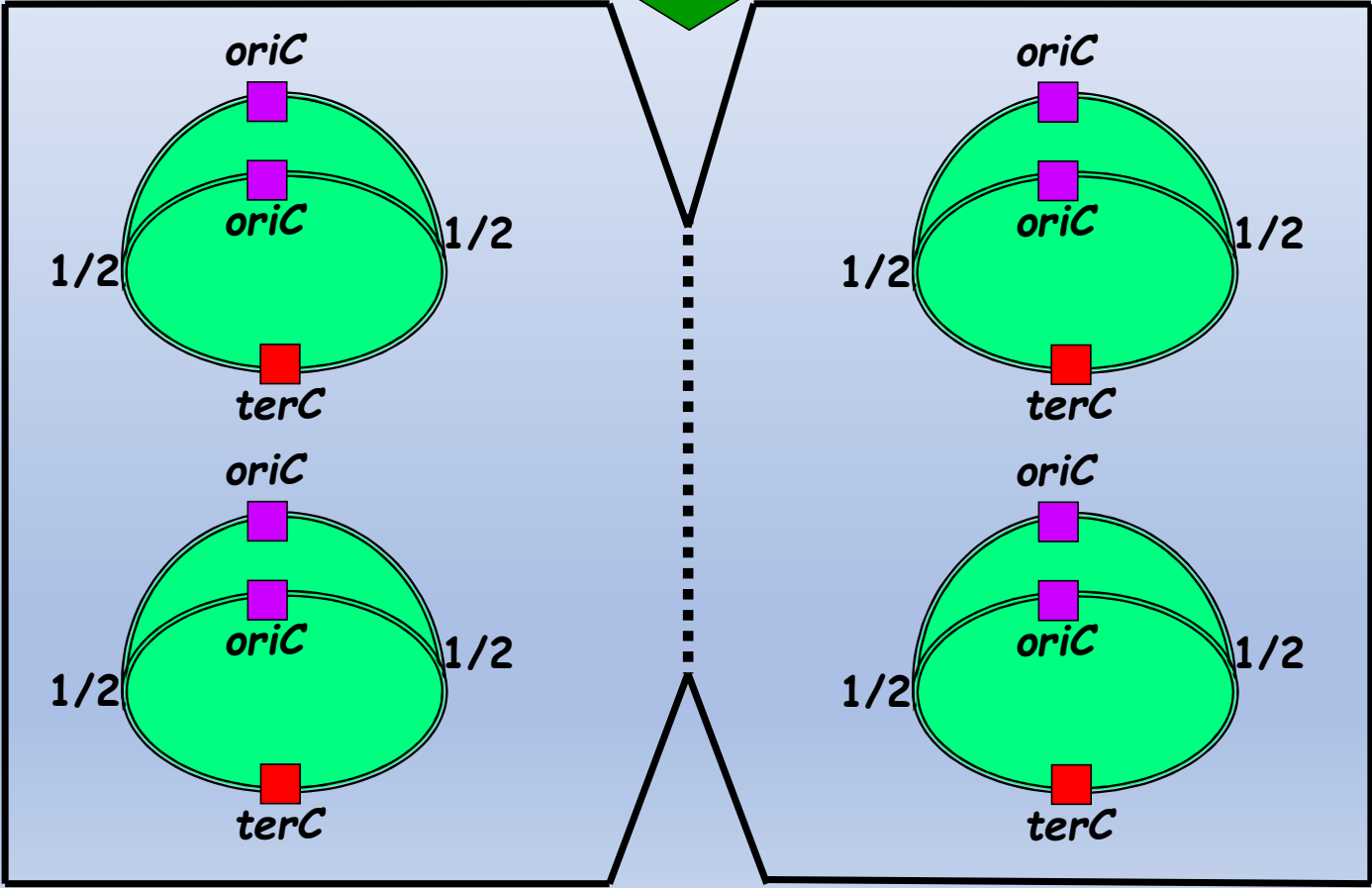


Durada de FASE I de 20 min

D1

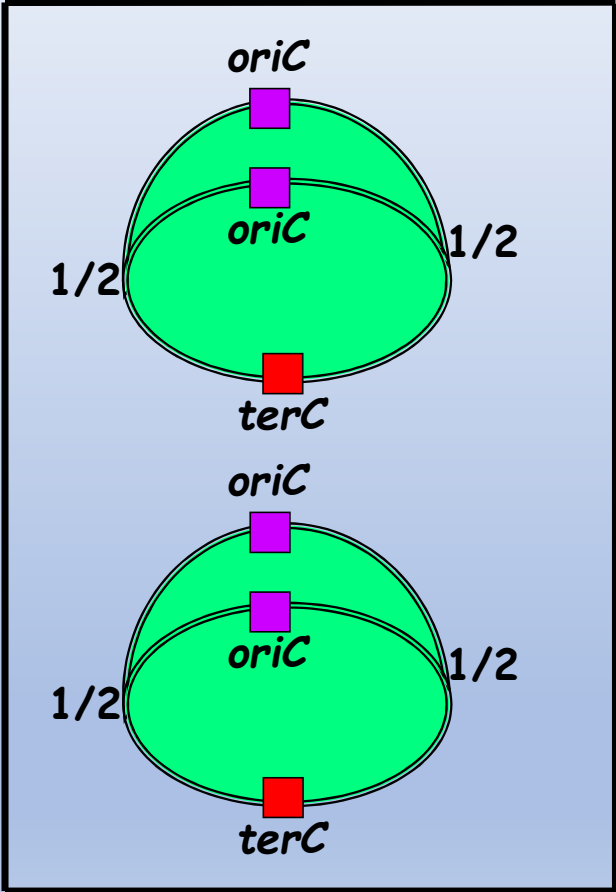
CÈL·LULA 1

CÈL·LULA 2

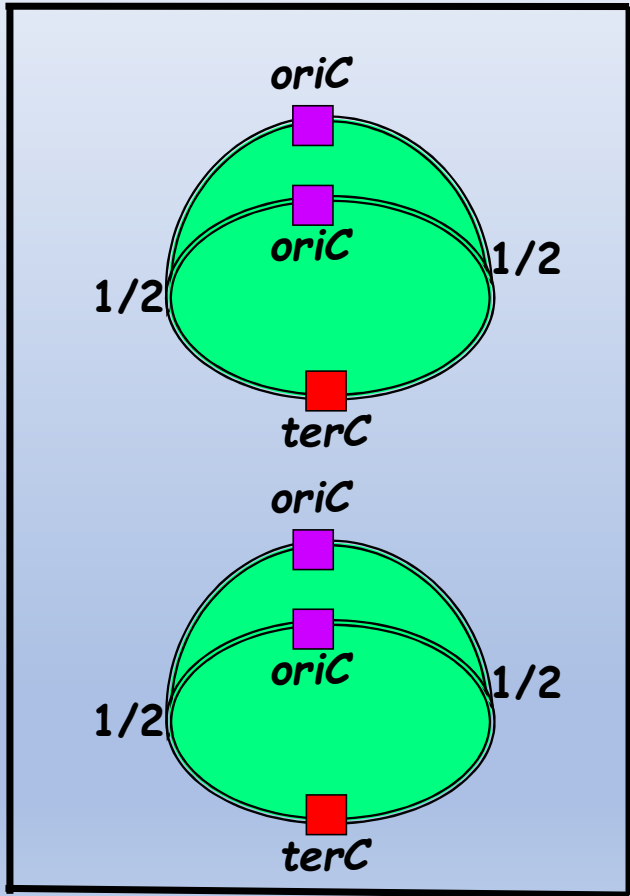


Durada de FASE I de 20 min

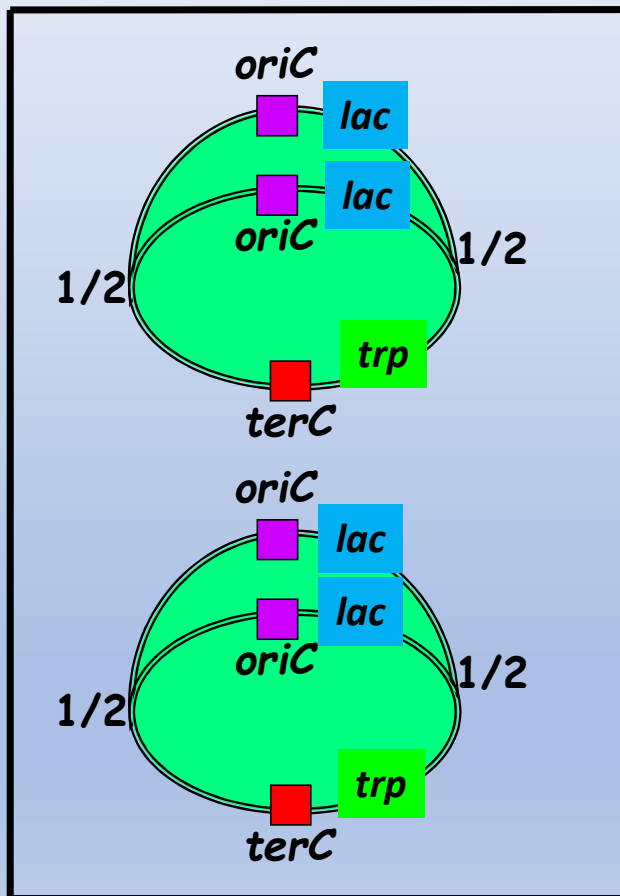
CÈL·LULA 1



CÈL·LULA 2



QUANTES CÒPIES GÈNIQUES TINDRÀ UNA CEL·LULA D' *E. coli* EN LA QUE LA SEVA FASE I TÉ UNA DURADA DE 20 MINUTS?



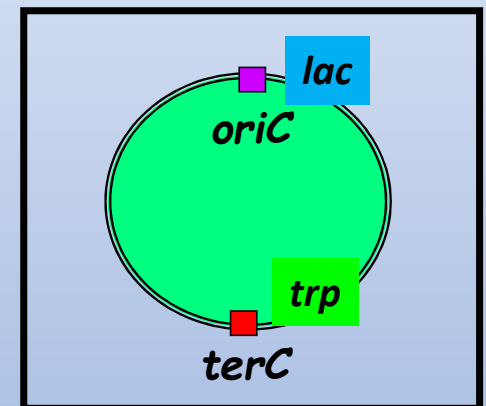
TINDRÀ 2 CROMOSOMES SENCERS i CADASCUN D'ELLS A MIG REPLICAR!!!

COLOQUEM ARA EN EL CROMOSOMA ELS OPERONS *lac* i *trp*

QUANTES CÒPIES DELS OPERONS *lac* i *trp* TINDRAN AQUESTES CÈL·LULES?

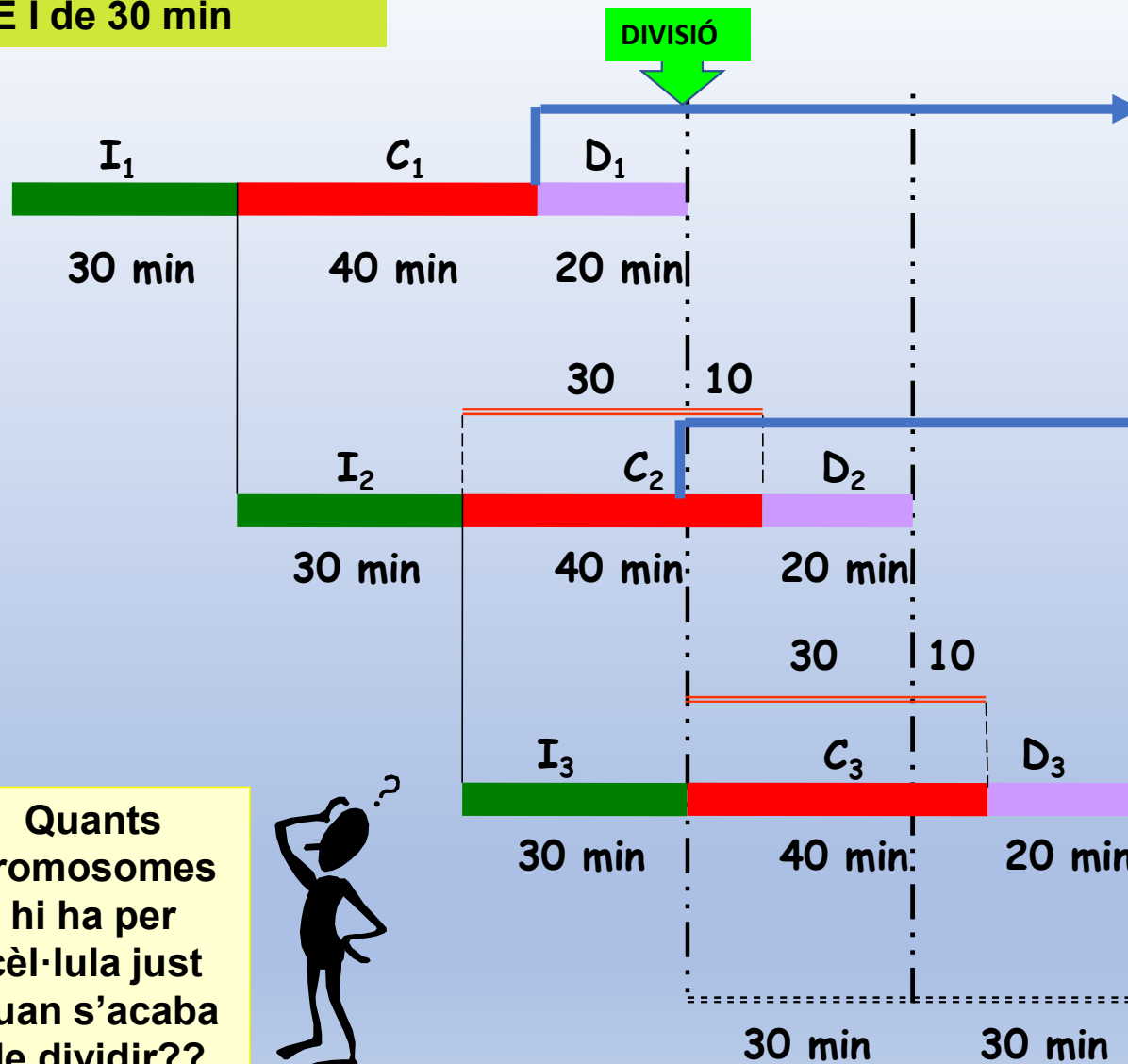
4 CÒPIES DE L'OPERÓ *lac*

2 CÒPIES DE L'OPERÓ *trp*



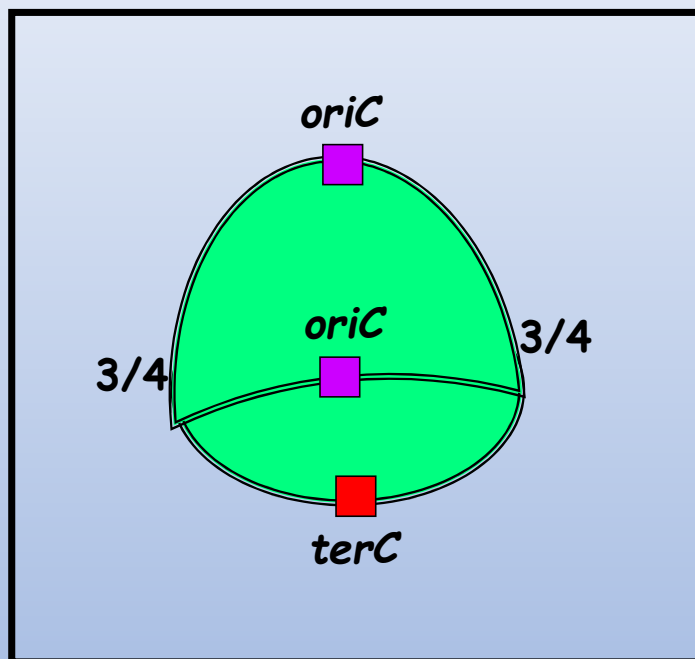
**QUANTES CÒPIES DELS OPERONS *lac* i *trp* TINDRÀ UNA CEL·LULA D' *E. coli*
EN LA QUE LA SEVA FASE I TÉ UNA DURADA DE 30 MINUTS?**

Durada de FASE I de 30 min

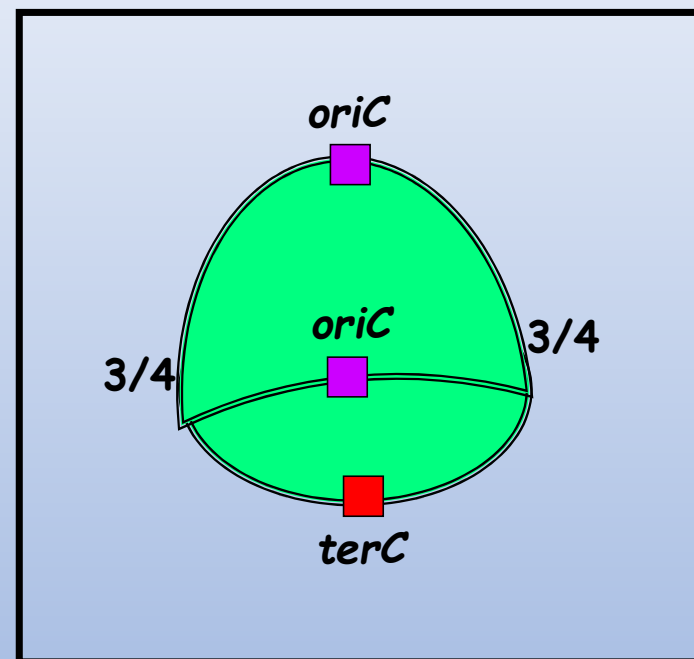


Durada de FASE I de 30 min

CÈL·LULA 1



CÈL·LULA 2



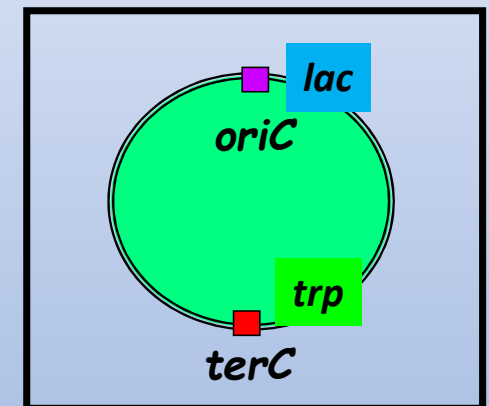
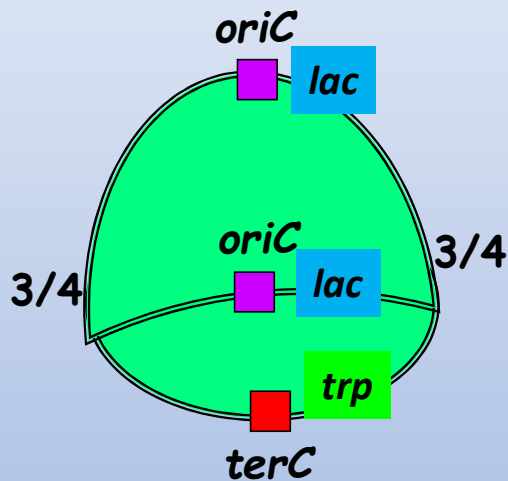
QUANTES CÒPIES GÈNIQUES TINDRÀ UNA CEL·LULA D' *E. coli* EN LA QUE LA SEVA FASE I TÉ UNA DURADA DE 30 MINUTS?

TINDRÀ 1 CROMOSOMA SENCER QUE ESTARÀ REPLICAT EN LES SEVES 3/4 PARTS

QUANTES CÒPIES DELS OPERONS *lac* i *trp* TINDRAN AQUESTES CÈL·LULES?

2 CÒPIES DE L'OPERÓ *lac*

1 CÒPIA DE L'OPERÓ *trp*



Número de còpies cromosòmiques de diferents espècies bacterianes en diverses condicions de cultiu

Espècie bacteriana	Nº Còpies Genoma en Medi Mínim	Nº Còpies Genoma en Medi Ric
<i>Desulfovibrio gigas</i>	8	16
<i>Azotobacter vinelandii</i>	2	32
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2	16

IMPLICACIONS DE L'ESTRUCTURA DEL CICLE CEL·LULAR BACTERIÀ

***LES CÈL·LULES BACTERIANES PODEN TENIR MÉS D'UNA CÒPIA DEL SEU CROMOSOMA, ADHUC AQUESTA DOSI CROMOSÒMICA ADDICIONAL NO TÉ PER QUÈ SER IGUAL A UN CROMOSOMA SENCER**

***LES CÈL·LULES BACTERIANES PODEN TENIR UN NÚMERO DIFERENT DE CÒPIES DELS DIVERSOS GENS**

***QUAN MÉS A PROP ESTÀ UN GEN DE L'ORIGEN DE REPLICACIÓ DEL CROMOSOMA D'UNA CÈL·LULA BACTERIANA, MÉS POSSIBILITAT HI HA QUE AQUEST GEN TINGUI UN MAJOR NÚMERO DE CÒPIES**

***AQUESTS EFECTES SOBRE LA DOSI GÈNICA ESTAN DIRECTAMENT LLIGATS A LA RIQUESA DEL MEDI DE CULTIU**

COM PUC CALCULAR AL LABORATORI LA DURADA DE LA FASE I?



QUIN ÉS EL TEMPS DE GENERACIÓ DE LA POBLACIÓ EN AQUEST DIAGRAMA?

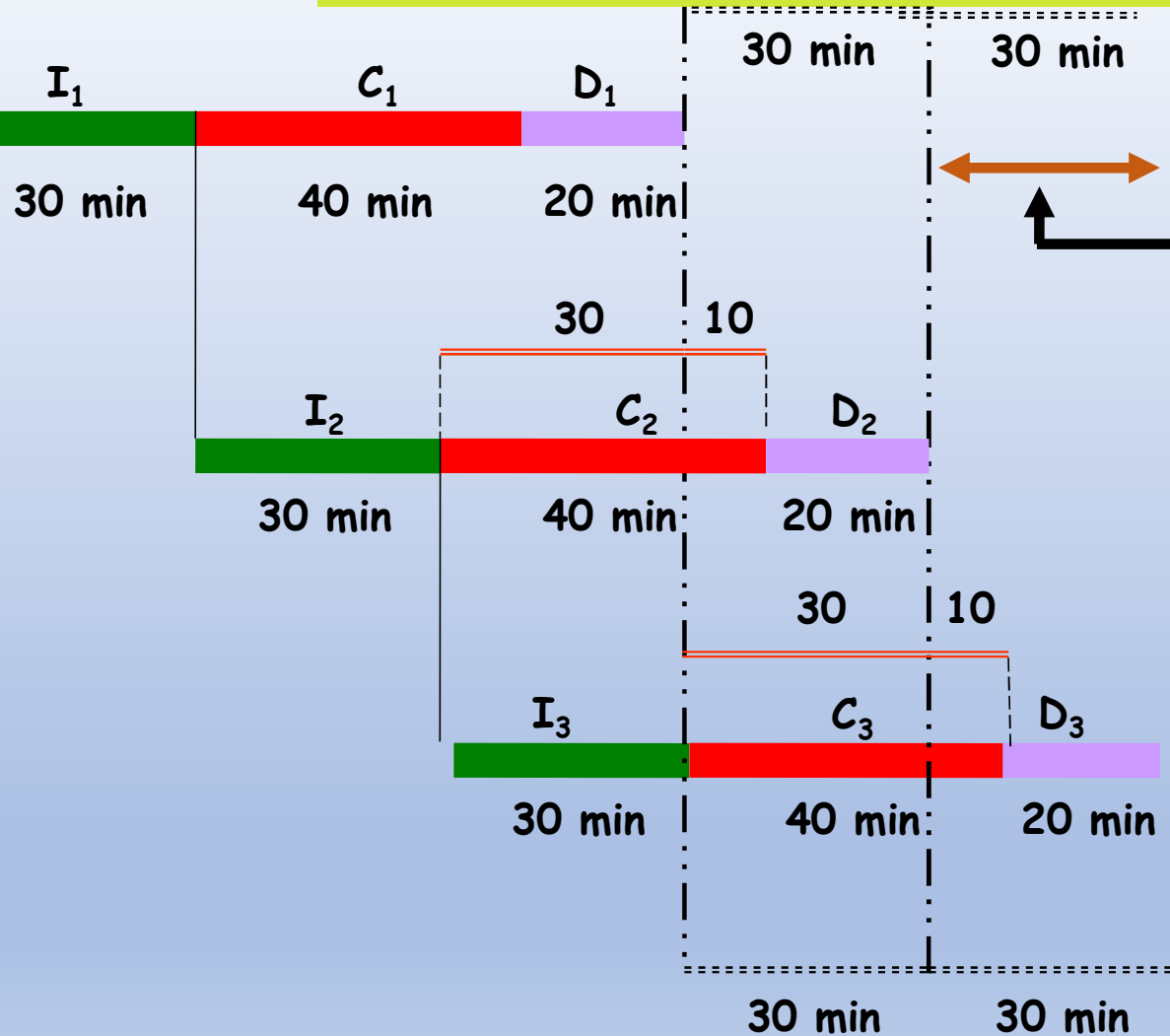
EL QUE TRANSCORRE DEL FINAL DE LA D₂ AL FINAL DE LA D₃

30 minuts

QUINA ALTRA ETAPA TAMBÉ DURA 30 minuts?

LA FASE I !!!!!!!

LA DURADA DE LA FASE I ÉS IGUAL AL TEMPS DE GENERACIÓ DEL CULTIU!!

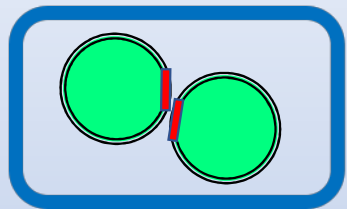


ALGUNES CONSEQÜÈNCIES DE LES CARACTERÍSTIQUES DE L'ESTRUCTURA DEL CICLE CEL·LULAR BACTERIÀ

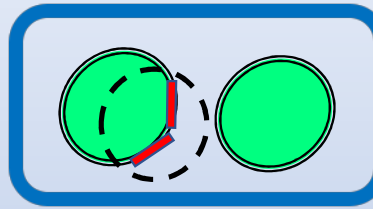
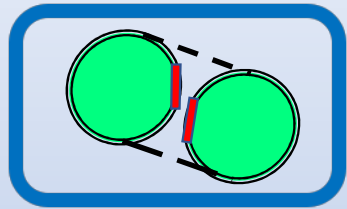
+ PROMOURE REORDENACIONS GENÈTIQUES I GENERAR NOVES VARIANTS DE FUNCIONS CEL·LULARS

+ AUGMENTAR EL NÚMERO DE CÒPIES DELS GENS MÉS PROPERS ALS *oriC*

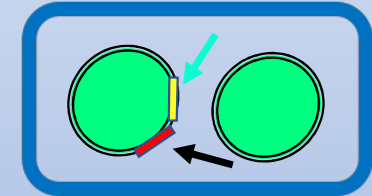
IMPACTE DE LA POLIPLOÏDIA EN L'EVOLUCIÓ DELS BACTERIS



LA PRESENÇA DE MÉS D'UNA CÒPIA D'UN CROMOSOMA POT PROVOCAR RECOMBINACIONS ENTRE LES SEVES REGIONS HOMÒLOGUES



AQUESTES RECOMBINACIONS PODEN ORIGINAR DUPLICACIONS EN UN MATEIX CROMOSOMA

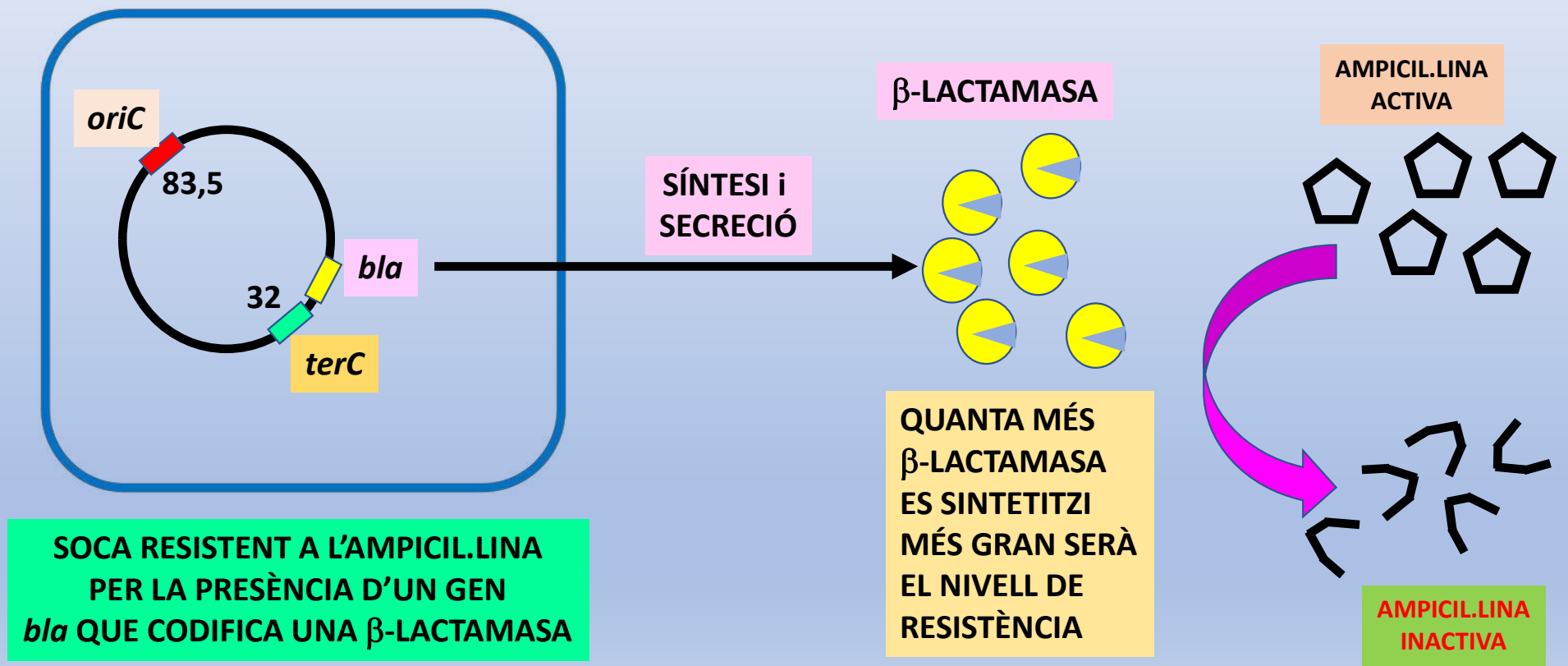


LES REGIONS DUPLICADES PODEN EVOLUCIONAR DE FORMA INDEPENDENT DONANT LLOC A **NOVES VARIANTS** DE LES FUNCIONES QUE CODIFICAVEN

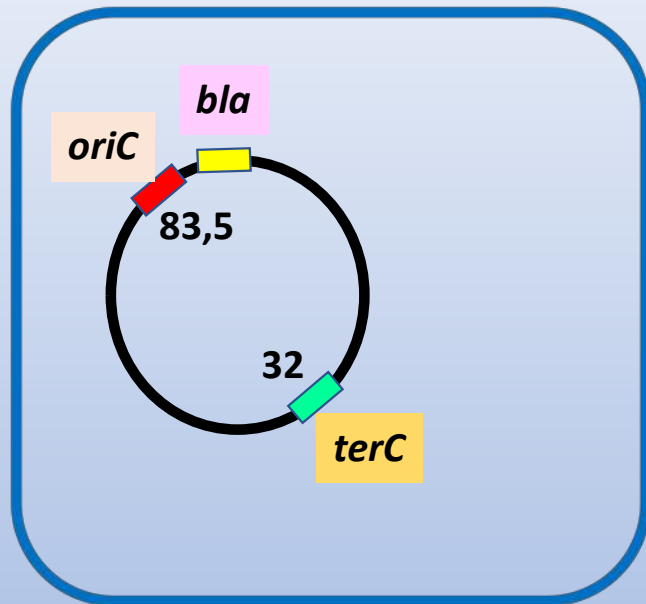


LA **TRANSFERÈNCIA GÈNICA HORIZONTAL** PERMET L'EXPANSIÓ DE **LES NOVES VARIANTS** ENTRE DIVERSES ESPÈCIES BACTERIANES

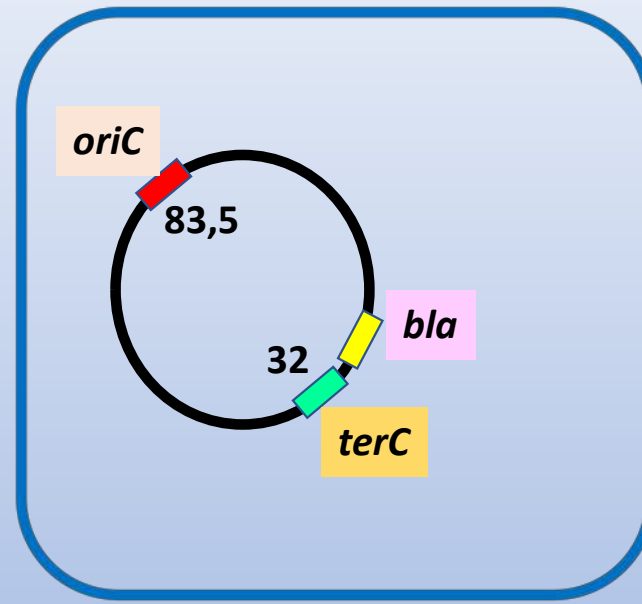
Els transposons són una estructura genètica que pot saltar des d'un plasmidi a un cromosoma bacterià i integrar-se en qualsevol lloc d'aquest. El transposó Tn3 conté el gen *bla* que codifica un enzim denominat β -lactamasa que trenca l'antibiòtic ampil·lina i fa que les cèl·lules bacterianes siguin resistents a aquest antibacterià.



La soca CAT1 d'*E. coli*, que porta el Tn3 inserit en la posició 90 del seu cromosoma, serà més resistent a l'ampicil·lina que la soca CAT2 en la que el Tn3 està inserit en la unitat 30 quan ambdues duguin a terme una infecció intestinal



SOCA CAT1



SOCA CAT2

AQUEST COMPORTAMENT ÉS DEGUT A QUE LA SOCA CAT1 TINDRÀ MES CÒPIES D'AQUEST GEN *bla* DONCS ESTÀ MES A PROP DE L'*oriC*

EN EL CAS QUE LA INFECCIÓ FOS EPIDÈRMICA, EL RESULTAT SERIA EL MATEIX?

NO!!

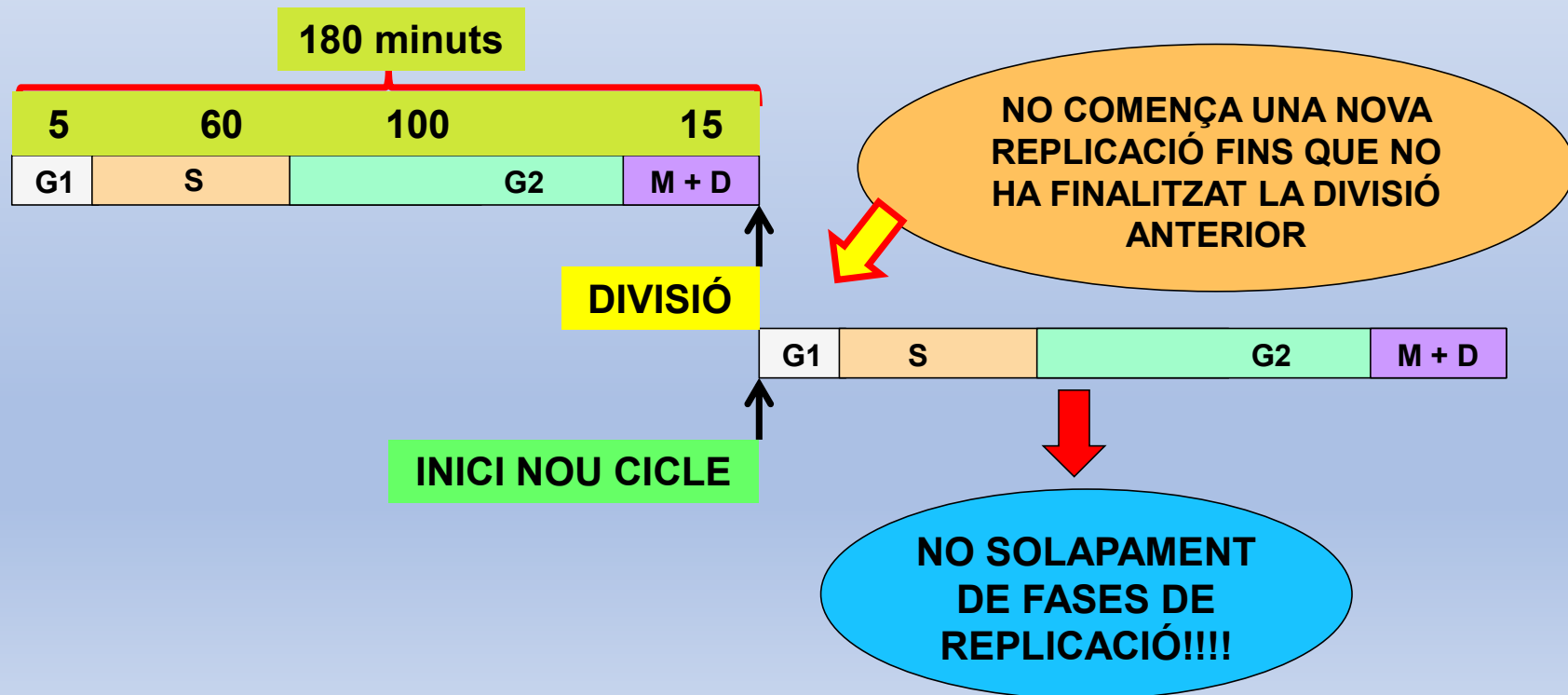
LA DISPONIBILITAT DE NUTRIENTS DAMUNT LA PELL NO ÉS LA MATEIXA QUE AL TRACTE DIGESTIU I PER TANT LA FASE **I** DEL CICLE CEL·LULAR SERIA MÉS LLARGA I EL NÚMERO DE CÒPIES DEL CROMOSOMA SERIA D'**UN** PER CÈL·LULA

FASES CICLE CEL·LULAR DE L'ARQUEUS *Sulfolobus solfataricus*

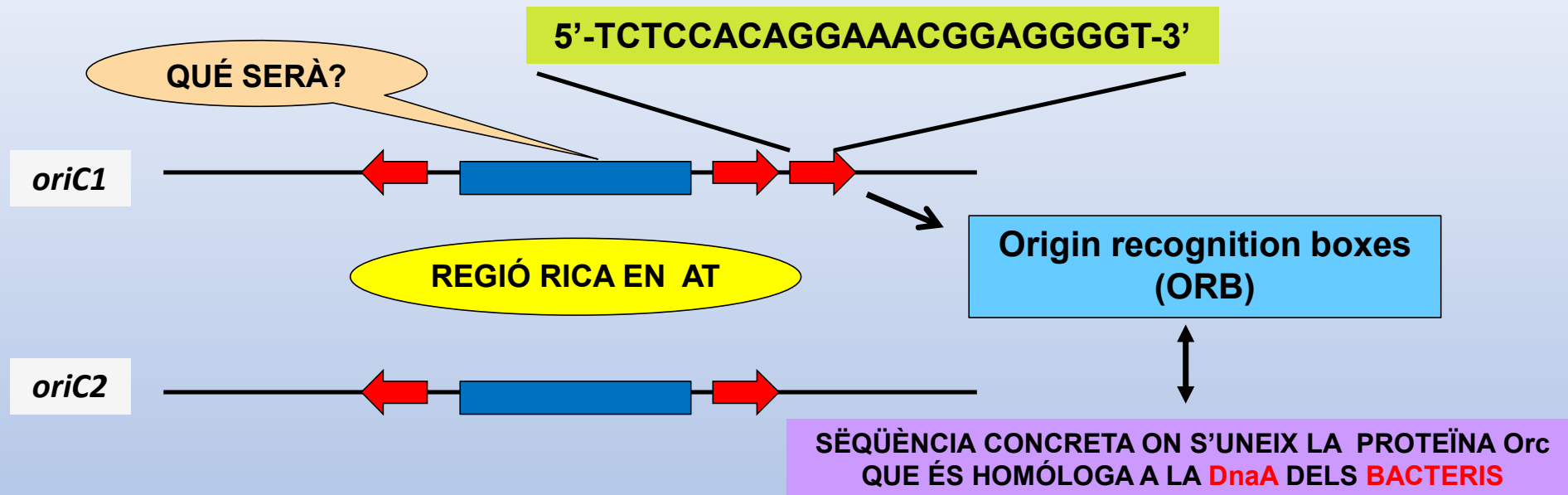
FASES i FUNCIONS

- G1: FASE PREREPLICATIVA
- S: FASE REPLICACIÓ
- G2: FASE PRESEGREGACIÓ GENOMES
- M: ALINEACIÓ CROMOSOMES i SEGREGACIÓ
- D: DIVISIÓ CEL·LULAR

Temps de generació va desde 3 a 7 hores en fase exponencial i en condicions de suficients nutrients



ESTRUCTURA ORIGENS REPLICACIÓ DE L'ARQUEUS *Sulfolobus solfataricus*

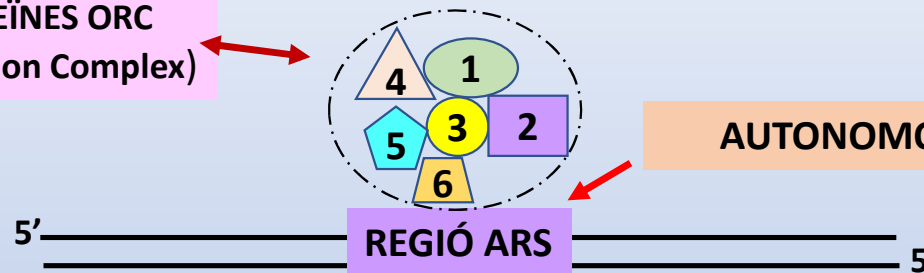


LA UNIÓ DE LA PROTEÏNA Orc PERMET L'OBERTURA DE LA REGIÓ, L'ENTRADA DE LA HELICASA *Mcm* (Homòloga a la dels eucariotes) I LA POSTERIOR ACTUACIÓ DEL REPLISOMA

ELS COMPONENTS DEL REPLISOMA SÓN HOMÒLOGS ALS DELS EUCARIOTES

TRETS GENERALS Origen REPLICACIÓ CROMOSOMES EUCARIOTES

COMPLEX DE 6 PROTEÏNES ORC
(ORC = Origin Recognition Complex)



AUTONOMOUS REPLICATION SEQUENCE

LA SEQÜÈNCIA A *Sacharomyces cerevisiae* ÉS
(T/A T T T A Pir A Pur T T T T/A)

EL COMPLEX DE LES 6 PROTEÏNES ORC INTERACCIÓNA AMB LA REGIÓ ARS PROVOCAANT L'OBERTURA DEL CROMOSOMA QUE FACILITA L'ACCIÓ DE LA DNA HELICASA M_{cm} I LA POSTERIOR INCORPORACIÓ DEL REPLISOMA

LA FILOSOFIA DE L'OBERTURA DELS CROMOSOMES ESTÀ CONSERVADA A L'EVOLUCIÓ

FI