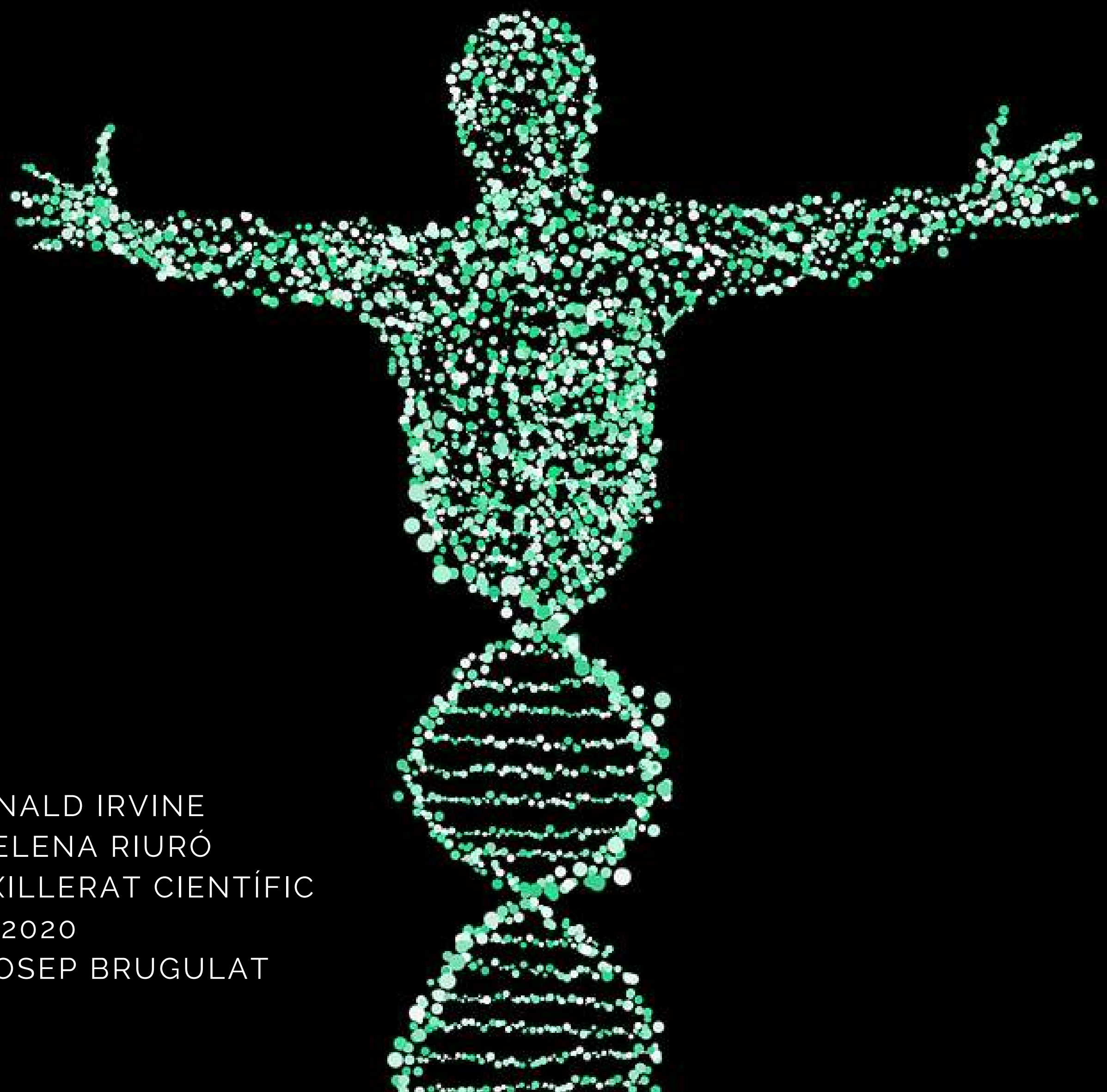


POSANT ALS PUNTS SOBRE LES "I"

EPIGENÈTICA I OBESITAT INFANTIL



AUTOR: DONALD IRVINE
TUTORA: HELENA RIURÓ
2N DE BATXILLERAT CIENTÍFIC
PROMOCIÓ 2020
INSTITUT JOSEP BRUGULAT

EL TÍTOL: “*Posant els punts sobre les “i”. Epigenètica i obesitat infantil*”.

“Posant els punts sobre les “i” ”, fa referència al tema de fons més important del treball: l’Epigenètica.

Després d’haver sentit a persones expertes definir de manera més simplificada aquest concepte com a “l’epigenètica són els accents de la genètica” o “és posar els punts sobre les is”, vaig pensar que, posar al meu treball aquest títol, seria una bona manera per fer referència que l’epigenètica és perfilar la genètica, acabar de definir un caràcter heretable.

A més, vaig pensar amb el sentit figurat de l’oració, la frase feta. El seu significat és “dir les coses clares”. Així doncs, agafant aquesta definició com al meu objectiu personal del treball, vaig proposar-me que, tot i ser un tema molt complex i amb molts tecnicismes, volia ser capaç d’explicar-lo de manera clara i relativament més amena.

“Environmental poisons are the leading cause of epigenetic changes. Such changes can and do get passed down the generations.” - Douglas Preston

“Els verins ambientals són la primera causa dels canvis epigenètics. Aquests canvis, són els que es traspassen a les properes generacions.” – Douglas Preston

RESUM

La Síndrome de Prader Willi (PWS) és una malaltia genètica deguda a alteracions a la regió 15q11-q13 del cromosoma. Una de les característiques clíniques més destacable és l'obesitat que tenen els pacients.

Aquest treball consisteix en un estudi realitzat a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi) per intentar demostrar que els gens de la regió 15q11-q13 tenen a veure amb el desenvolupament de malalties metabòliques, tals com l'obesitat, en pacients no portadors d'aquesta malaltia.

RESUMEN

El Síndrome de Prader Willi (PWS) es una enfermedad genética debida a alteraciones de la región 15q11-q13 del cromosoma 15. Una de las características clínicas más destacable es la obesidad que padecen los pacientes.

Este trabajo consiste en un estudio realizado por el *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi)* para intentar demostrar que los genes de la región 15q11-q13 están relacionados con el desarrollo de enfermedades metabólicas, tales como la obesidad, en pacientes que no padecen esta enfermedad.

ABSTRACT

Prader Willi Syndrome (PWS) is a genetic disease caused by alterations in the 15q11-q13 region of chromosome 15. One of the most important clinical characteristics is that patients with this disease also have obesity.

This project is based on a study undertaken by *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi)* to try to demonstrate whether the genes of the 15q11-q13 region can be related to developing metabolic diseases, such as obesity, in patients that do not have this syndrome.

AGRAÏMENTS

Tot i que aquest treball ha estat escrit per mi, considero que hi ha un seguit de persones sense les quals portar-lo a terme no hagués estat possible. Per això m'agradaria agrair a:

La Farah Fauth, la Martina Masanas i l'Elisabeth Vine per fer-me recordar del que sóc capaç i animar-me quan més m'ha convingut.

La Maria Teresa Colomer, la meva tutora del treball, per guiar-me, per haver tingut tota la paciència del món (sobretot a l'hora d'escollir el tema del treball) i per fer-me apuntar a la lluna per intentar aconseguir realitzar aquest treball de la millor manera possible.

L'Helena Riuró per ajudar-me a tirar endavant el treball i mostrar un immens interès en ell.

La Judit Bassols, l'Ariadna Gòmez, la Berta Mas, l'Esther Lizarraga i la Sílvia Xargay (grup de recerca de metabolisme materno-fetal i d'obesitat i risc cardiovascular en pediatria de l'IdIBGi) per acollir-me, assessorar-me i fer-me sentir com un investigador més de l'IdIBGi (Institut d'Investigació Biomèdica de Girona).



Grup de recerca de metabolisme materno-fetal i d'obesitat i risc cardiovascular en pediatria de l'IdIBGi.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	8
1. Motivacions.....	9
2. Hipòtesi.....	9
3. Objectius.....	9
PART TEÒRICA.....	10
1. Genètica: ADN i replicació de l'ADN.....	11
1.1. Composició dels àcids nucleics.....	11
1.2. Àcid desoxiribonucleic (ADN).....	12
1.3. La replicació de l'ADN <i>in vitro</i>	12
2. Gens “imprinting”.....	13
3. Epigenètica.....	14
4. Metilació d'ADN.....	15
4.1. Concepte teòric.....	15
4.2. Mètodes d'estudi de la metilació de l'ADN.....	16
5. La placenta.....	17
6. La Síndrome de Prader Willi.....	18
6.1. Característiques clíniques generals.....	18
6.2. Causes.....	21
PART PRÀCTICA.....	23
1. Institut de recerca.....	24
2. Material.....	24
2.1. Subjectes d'estudi.....	24
2.2. Obtenció d'ADN a partir de teixit placentari matern - Extracció d'ADN.....	25
2.3. Diferència entre citosines metilades i no metilades – Bisulfitació.....	29
2.4. Coneixement de la temperatura idònia perquè la PCR doni lloc - Optimització de “Primers”.....	32

2.5. Obtenció de còpies de l'ADN bisulfitat - Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	35
3. Mètodes.....	38
3.1. Obtenció d'ADN a partir de teixit placentari matern - Extracció d'ADN.....	39
3.2. Diferència entre citosines metilades i no metilades – Bisulfitació.....	42
3.3. Coneixement de la temperatura idònia perquè la PCR doni lloc - Optimització de “Primers”.....	44
3.4. Obtenció de còpies de l'ADN bisulfitat - Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	46
3.5. Estudi de les citosines metilades – EpiTYPER.....	48
4. Resultats.....	50
4.1. Obtenció d'ADN a partir de teixit placentari matern - Extracció d'ADN.....	50
4.2. Diferència entre citosines metilades i no metilades – Bisulfitació.....	51
4.3. Coneixement de la temperatura idònia perquè la PCR doni lloc - Optimització de “Primers”.....	52
4.4. Obtenció de còpies de l'ADN bisulfitat - Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	53
4.5. Estudi de les citosines metilades – EpiTYPER.....	54
5. Discussió.....	58
5.1. Obtenció d'ADN a partir de teixit placentari matern - Extracció d'ADN.....	58
5.2. Diferència entre citosines metilades i no metilades – Bisulfitació.....	59
5.3. Coneixement la temperatura idònia perquè la PCR doni lloc - Optimització de “Primers”.....	59
5.4. Obtenció de còpies de l'ADN bisulfitat - Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	60
5.5. Estudi de les citosines metilades – EpiTYPER.....	60
CONCLUSIONS.....	62

BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA.....	64
--------------------------------------	-----------

ANNEXOS.....	68
---------------------	-----------

1. Glossari.....	69
2. Protocols de laboratori.....	70
3. Dissenys de plaques.....	74
4. Taules de resultats.....	79

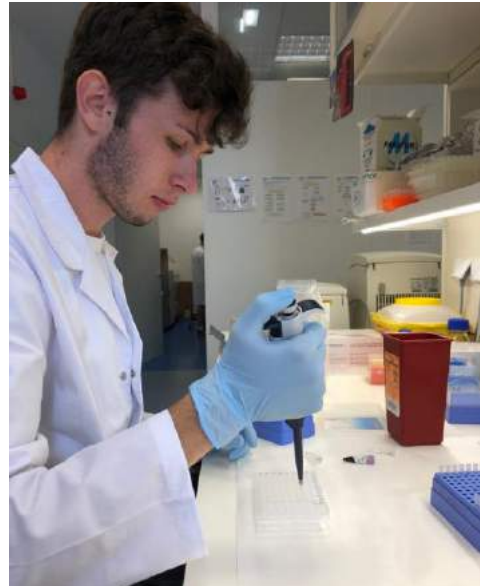
INTRODUCCIÓ

El que es coneix com a material genètic, és aquell que es transmet de pares a fills i que, d'aquesta manera, els donen a aquests els gens que codifiquen els caràcters que conformen aquest nou individu. Tot i això, l'herència de gens dels progenitors no és l'únic que conforma l'ADN de cada persona, sinó que també intervenen factors externs tant durant l'embaràs de la mare, com al llarg de la vida, que acaben de codificar certs caràcters de l'ADN. Això és el que s'anomena epigenètica.

Encara que estigui centrat bàsicament en l'epigenètica relacionada amb la Síndrome de Prader Willi (PWS), aquest treball servirà per entendre millor com funciona, a grans trets l'epigenètica i com pot afectar a les generacions més properes d'un individu.

També s'explicarà què és la metilació de l'ADN i què comporta que un gen estigui metilat.

La part pràctica és un estudi realitzat a l'IdIBGi (Institut d'Investigació Biomèdica de Girona), on vaig estar fent l'estada a l'empresa del 25 de juny al 19 de juliol. Aquest treball consisteix en estudiar la metilació dels gens implicats en la PWS, una malaltia genètica on es destaca la característica clínica de patir obesitat infantil, en placenta materna d'embarassos normals per veure si poden condicionar l'aparició d'obesitat infantil i trastorns de creixement en població normal. Per a fer-ho, s'han utilitzat els mètodes següents: extracció d'ADN, bisulfiteació, optimització de primers i Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR), per poder acabar aplicant el mètode epiTYPER. Tots aquests mètodes s'expliquen a la part teòrica i més profundament a l'apartat de mètode de la part pràctica.



Al llarg del treball hi haurà paraules importants que seran definides al glossari a l'apartat d'annexos.

1. MOTIVACIONS

La motivació principal del meu Treball de Recerca ha estat poder trobar un tema on es tractin temes de genètica i, sobretot, de pediatria.

Per un costat, la genètica i l'epigenètica han estat temes que m'han interessat molt des de sempre i per l'altre, m'agradaria estudiar Medicina i segurament, especialitzar-me en Pediatria. D'aquesta manera, he trobat un tema que tracta tant la matèria que m'agrada, com els futurs estudis que m'agradaria cursar i la feina que m'agradaria fer.

Després d'haver fet una sortida a l'IdIBGi, de revisar els seus grups de recerca i ser guiat per la tutora, em va semblar molt interessant el fet d'investigar, juntament amb científics, una malaltia genètica i relacionar-la amb la pediatria, és a dir, aplicada a infants.

Vaig tenir en compte que, tenir un institut de recerca relativament a prop, em suposaria una facilitat a l'hora d'obtenir informació de fonts de confiança i molt ben valorada. També vaig pensar amb la facilitat que tindria al realitzar la part pràctica del treball de recerca si aconseguia poder dur-la a terme al mateix institut de recerca on he fet l'estada a l'empresa a la línia de recerca de metabolisme materno-fetal.

2. HIPÒTESI

Diferències en els nivells de metilació placentària materna dels gens implicats en la PWS poden condicionar l'aparició d'obesitat infantil i trastorns de creixement en població normal.

3. OBJECTIUS

- Objectiu global: Estudiar la metilació dels gens implicats en la PWS en placenta d'embarassos normals.
 - Objectiu específic 1: Conèixer els gens implicats en la PWS.
 - Objectiu específic 2: Extreure ADN de placenta d'embarassos normals.
 - Objectiu específic 3: Identificar la metilació de l'ADN dels gens implicats en la PWS mitjançant epiTYPER.

PART TEÒRICA



1. ADN I REPLICACIÓ DE L'ADN

1.1. COMPOSICIÓ DELS ÀCIDS NUCLEICS

Els àcids nucleics són biomolècules orgàniques formades per la unió de nucleòtids. Cada nucleòtid està format per àcid fosfòric (H_3PO_4); un glúcid, concretament una pentosa, que en l'àcid ribonucleic (ARN) és la ribosa i en l'àcid desoxiribonucleic (ADN) és la 2-desoxiribosa i, per últim, una base nitrogenada, que pot ser una púrica (adenina o guanina) o pirimidínica (citosina, timina o uracil). La timina és una base nitrogenada exclusiva de l'ADN i l'uracil de l'ARN (vegeu figura 1).

Els àcids nucleics presenten dos extrems, l'extrem 5' on hi ha l'àcid fosfòric unit al glúcid del primer nucleòtid, i l'extrem 3', on es troba un radical hidroxil (-OH) unit al glúcid del carboni 3' de l'últim nucleòtid.

Els àcids nucleics se sintetitzen des de l'extrem 5' al 3' gràcies a un enzim anomenat ADN-polimerasa, que afegeix nucleòtids a l'extrem 3' però no n'existeix cap que ho faci a l'extrem 5'.

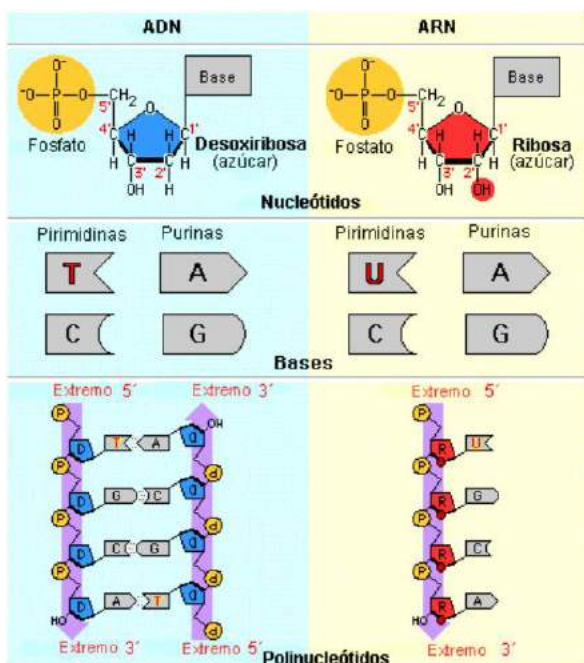


Figura 1. A la primera fila es veu la composició de l'ADN i l'ARN, a la segona les bases nitrogenades pròpies de cada molècula i, a l'última fila, la disposició a l'espai de cada tipus de cadena. (Font: Alemany, C. i Carcolé, E., s.d.)

1.2. L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC

L'ADN és la molècula que emmagatzema la informació biològica que es transmet dels progenitors a la seva descendència. Aquesta molècula, generalment, està constituïda per dues cadenes antiparal·leles de nucleòtids “enrotllades” entre si formant una doble hèlix plectonímica, és a dir, per separar les dues cadenes s’ha de “desenrotllar” una respecte l’altra.

Les dues cadenes d'ADN estan unides entre si per complementarietat de bases nitrogenades, que és l’afinitat que té una base nitrogenada per a una altra. L’adenina i la timina són complementàries i la citosina i la guanina també. Això significa que en una molècula d'ADN hi ha tantes adenines com timines i tantes citosines com guanines. Aquestes bases s’uneixen entre si a través d’enllaços d’hidrogen.

1.3. LA REPLICACIÓ DE L'ADN *in vitro*

La replicació d'ADN *in vitro* és aquella que no es porta a terme dins d’una cèl·lula, sinó en condicions de laboratori. Per realitzar una duplicació d'ADN d’aquesta manera és essencial l’ADN-polimerasa. Perquè pugui actuar aquest enzim és necessària la presència de desoxiribonucleòtids-5-trifosfats d’adenina, timina, guanina i citosina. Aquests nucleòtids han d’estar trifosfatats perquè en l’acció d’unir-se a la cadena replicada es necessita energia que es troba en el trencament de dos dels enllaços fosfòrics, fent així que es quedi el nucleòtid monofosfatat.

A més, és indispensable que hi hagi un filament encebador o “primer”, que és un tros d'ADN on s’uneix l’ADN-polimerasa i afegeix els nucleòtids a l’extrem 3’ i un filament patró perquè l’enzim pugui afegir els nucleòtids segons complementarietat de bases (vegeu figura 2).

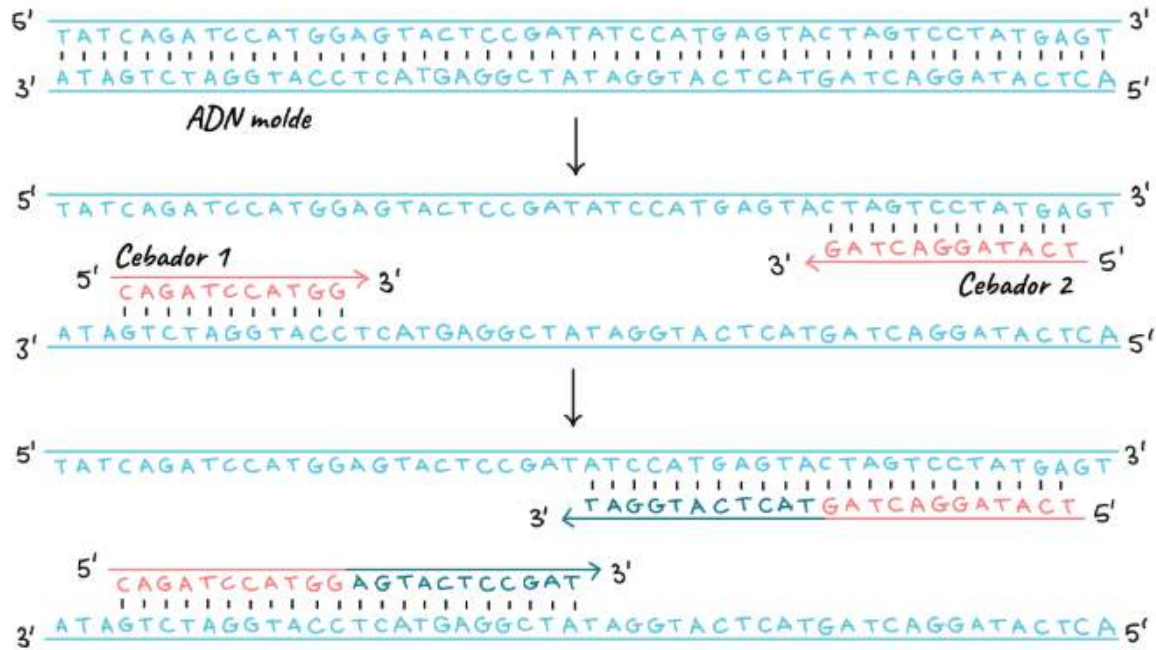


Figura 2. Procés de replicació d'ADN *in vitro*. Cadena principal (blau clar), "Primers" (vermell) i còpia de l'ADN (turquesa). (Font: Khan Academy, 2017b)

2. GENS “IMPRINTING”

Els organismes anomenats diploides ($2n$) són els que presenten dos cromosomes, un provinent de cada progenitor i, per tant, tenen dos gens que ocupen el mateix locus¹ a cada cromosoma al qual pertanyen. Generalment, s'expressen els dos gens que tenen el mateix locus dels cromosomes somàtics², un del pare i l'altre de la mare.

En el cas dels gens “imprinting”, només un dels al·lels³ s'expressa. Aquest fet passa perquè el “centre de control imprinting” (IC), que és el que regula l'expressió genètica del gen que es silenciació, està metilat. Llavors l'altre gen que ocupa el mateix locus, si no té el seu IC metilat, és el que s'acabarà expressant.

Malgrat tot, també podria ser que l'IC dels dos gens estiguessin al cent per cent metilats. Llavors, no s'expressa cap dels dos gens i esdevé una malaltia genètica.

Per exemple, el gen de PWS és un “imprinting” matern. El gen que no s'expressa és el que prové de la mare. Quan l'IC patern d'aquesta zona es troba metilat i no s'expressa és quan apareix la síndrome (vegeu figura 3).

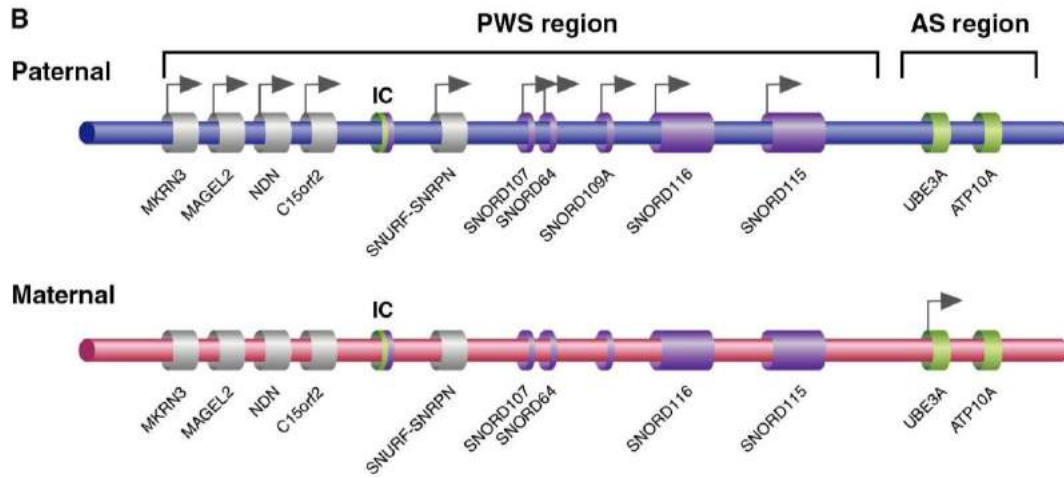


Figura 3. Gens "imprinting" de la regió de PWS i de la Síndrome d'angelman (AS) de la mare (rosa) i del pare (blau). Els gens propis de PWS (lila) són controlats per l'IC. Les fletxes indiquen els gens que s'expressen d'una persona sana. (Font: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015)

3. EPIGENÈTICA

L'epigenètica estudia tots aquells factors heretables que modifiquen o matisen el material genètic dels éssers vius sense alterar la seqüència de nucleòtids i és aplicable tant a cèl·lules eucariotes⁴ com a procarïotes⁵. Això explica que dos bessons idèntics tinguin diferències biològiques.

La regulació epigenètica és donada per canvis en la conformació de la cromatina⁶ envers les histones⁷. Depenent de la disposició del filament d'ADN sobre aquestes histones, el gen s'expressarà o no. És a dir, si un gen es troba "embolicat" sobre una histona, el gen serà silenciats i no s'expressarà i, si no ho està, sí que ho farà. En total, s'han determinat tres processos epigenètics de regulació.

La metilació de l'ADN és la metilació d'algunes de les citosines d'un gen, és a dir, algunes de les citosines es presenten enllaçades amb un radical metil ($-CH_3$). Hi pot haver diferents percentatges de metilació d'un gen.

La modificació de les histones pot passar després de la traducció⁸ i consisteix en combinacions de la histona que serveixen de codi per determinar quin gen ha de ser silenciats i quin ha de ser expressat. Hi ha diferents tipus de modificacions històniques: l'addició d'un radical que pot ser un acetil, un grup fosfòric o metil; l'eliminació d'un grup amoníac; el canvi d'un aminoàcid de la histona per un altre o l'addició d'un polipèptid⁹.

L'ARN no codificant és un altre procés epigenètic de regulació que consta d'una seqüència d'entre 21 i 23 nucleòtids complementària amb una regió d'un ADN o ARN i no permet la traducció dels nucleòtids als quals s'ha unit per complementarietat de bases.

4. METILACIÓ DE L'ADN

4.1. CONCEPTE TEÒRIC

La metilació de l'ADN és un procés epigenètic que es troba en uns gens promotors. La zona que controla la duplicació de l'ADN envia un senyal a un enzim anomenat ADN-metiltransferasa que afegeix un grup metil al carboni 5' de la base nitrogenada citosina i, generalment, reprimeix l'expressió del gen si està un 100% metilat (vegeu figura 4).

Aquest procés epigenètic es dona generalment en dinucleòtids CpG. Només pot estar metilada una citosina quan al darrere hi té una guanina. Estan unides mitjançant un grup fosfat¹⁰. Es representa CpG.

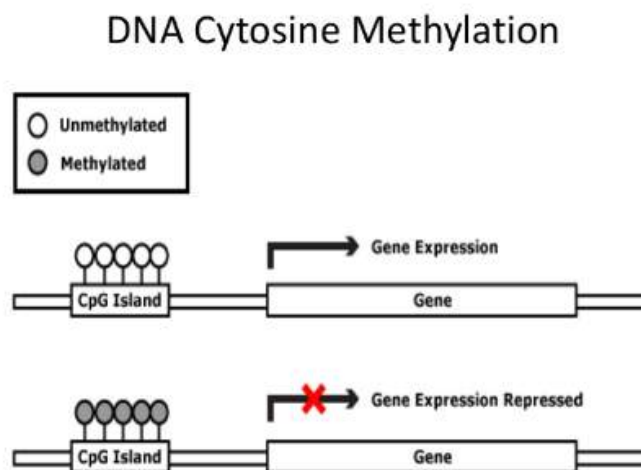


Figura 4. Metilació de l'ADN. Si no està metilat, el gen s'expressa i si està metilat, no s'expressa. (Font: Bassols, J., 2017)

Aquest procés és molt important, ja que està associat a la inactivació del cromosoma X, que determina el sexe; a l'envelliment de l'individu i als gens “imprinting”, que són gens que determinen de quin progenitor s'ha d'expressar la informació biològica i que, si no s'expressa la del progenitor correcte, pot provocar una malaltia. En el cas dels gens “imprinting”, el gen d'un dels progenitors estarà més metilat (i no s'expressarà) i el de l'altre s'expressarà.

4.2. MÈTODES D'ESTUDI DE LA METILACIÓ DE L'ADN

Per poder estudiar l'ADN, s'ha de realitzar una extracció d'ADN de les cèl·lules. Aquest procés es realitza mitjançant uns enzims¹¹ que degraden les diferents biomolècules per poder accedir fàcilment a l'ADN.

Seguidament es realitza una bisulfitació, que és un mètode que permet diferenciar les citosines metilades de les que no ho estan. A través de diversos compostos químics, primer es desaminen¹² les citosines no metilades i després es converteixen en uracils per diferenciar-les de les citosines metilades. Això comporta dos problemes:

1. Una cadena d'ADN amb uracils és molt poc estable perquè aquesta base nitrogenada pertany només l'ARN.
2. A l'obtenir com a resultat una cadena monocatenària, és molt làbil i no es pot conservar durant molt temps.

Per resoldre aquestes problemàtiques i per tenir més volum de mostra es fa una Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Abans de realitzar la PCR, s'han d'optimitzar els “primers” que s'han dissenyat prèviament. Una optimització s'ha de fer sempre abans de realitzar qualsevol procés *in novo*. Quan és el primer cop que s'utilitza un mètode per a un estudi, primer s'han de fer proves per esbrinar quines són les condicions òptimes perquè l'experiment tingui el màxim rendiment. En aquest cas s'ha de conèixer quina és la temperatura òptima perquè els “primers” s'uneixin a la zona desitjada de l'ADN ja bisulfitat per complementarietat de bases i perquè així l'enzim ADN-polimerasa faci el màxim de rèpliques de l'ADN i de la millor qualitat possible. Els resultats es comproven amb electroforesi en gel, que permet veure la longitud de parells de bases i la quantitat d'ADN que s'ha replicat de cada mostra a través d'una lectura per raigs UV de les mostres sobre un gel d'agar.

La PCR és un mètode d'amplificació i duplicació d'una regió específica d'ADN *in vitro*. Es fan varies còpies del tros d'ADN que es vol estudiar en condicions de laboratori per, així, tenir un volum gran del gen. Si l'ADN es troba bisulfitat, a les bases amb uracil, s'uneixen timines i també, per complementarietat de bases, en les cadenes següents, es converteixen en adenines. Durant aquest procés hi ha una incubació on se li aplica la temperatura que s'ha trobat òptima com a resultat de l'optimització de “primers”.

Abans d’enviar els resultats a seqüenciar, es fa una altra electroforesi en gel per comprovar que totes les mostres s’hagin amplificat i finalment, les mostres es porten a seqüenciar.

5. PLACENTA

La placenta és un òrgan que es troba a l’úter provinent dels mateixos gàmetes que formen l’embrió que presenten els mamífers durant el període de gestació. Gràcies al fet que està en contacte amb el fetus a través del cordó umbilical, fa d’intermediària entre la gestant i el fetus i porta a terme les seves funcions. Aquestes són la nutrició i l’intercanvi de gasos, l’excreció i la termoregulació. La placenta és l’òrgan que permet transferir sang amb nutrients i oxigen de la mare al fetus i tornar sang al fetus amb residus (i diòxid de carboni). A més, també ajuda a combatre infeccions i produir hormones pròpies de la gestació.

Aquest òrgan presenta dues parts: la placenta fetal, que és la que es troba a la part interna i conté cèl·lules amb el mateix ADN que el fetus, i la placenta materna que és la capa externa de la placenta i conté el mateix ADN que la mare (vegeu figura 5).

La placenta és expulsada del cos de la gestant entre els 15 -30 minuts després del part.

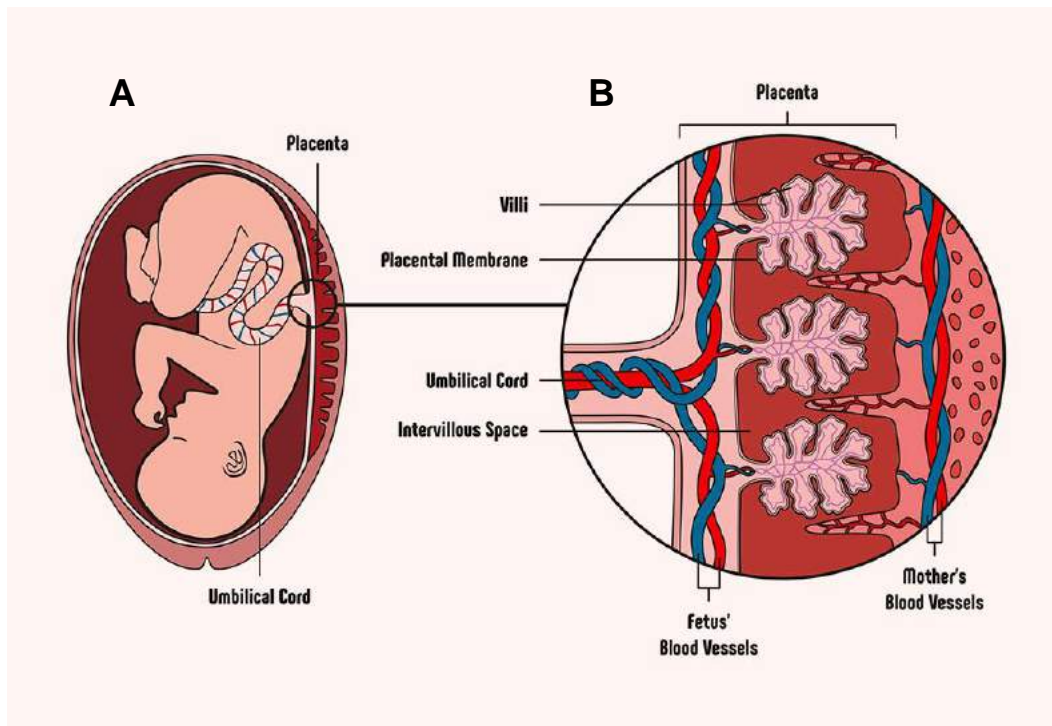


Figura 5. A: Visió del fetus dins la placenta amb el cordó umbilical. B: Visió de l'interior de la placenta. Els vasos sanguinis fetal (Fetus' Blood Vessels) i els de la mare (Mothers' Blood Vessels). (Font: Tian, C., 2019)

Aquest òrgan és un dels que s'utilitzen més a l'hora d'estudiar ADN humà perquè conté ADN tant de la mare com del fetus durant el període de gestació i a més, és de relativament fàcil accés, ja que, un cop expulsada la placenta es sol descartar.

6. LA SÍNDROME DE PRADER WILLI (SPW)

La Síndrome de Labhart Prader Willi (SPW) va ser descoberta pels doctors suïssos Andrea Prader, Alexis Labhart i Heinrich Willi l'any 1956.

És una malaltia genètica poc freqüent. S'estima que un de cada quinze mil nounats pateix aquesta síndrome. Pot ser deguda a diferents causes. Totes tenen en comú que afecten la regió cromosòmica 15q11-q13, pròpia d'aquesta síndrome, del cromosoma 15.

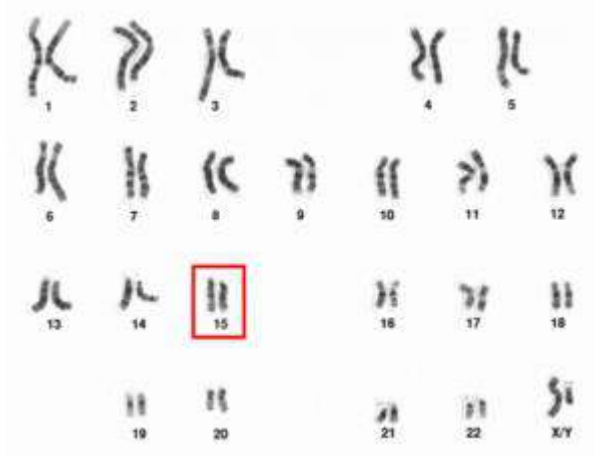


Figura 6. Cariograma humà. (Font: Chromosome 15, 2019)

6.1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques GENERALS

Hi ha moltes característiques clíniques pròpies de la PWS, però les més rellevants són les següents.

La hiperfàgia és un trastorn que, en aquest cas, s'instaura quan l'individu té entre 9 i 24 mesos, on es mostra una sensació de gana constant a causa d'alteracions en la secreció¹³ de diferents hormones.

La ghrelina és una hormona amb naturalesa proteica que fa la funció de neuropèptid¹⁴ (essencial per a la comunicació entre neurones) i, a més, de regular “l'apetit”, juga un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi energètica¹⁵ i incrementa l'hormona de creixement (GH). La ghrelina generalment augmenta per donar la sensació de gana i

disminueix després de la ingesta d'aliments. En el cas del SPW, després d'un àpat, els nivells d'aquesta hormona no disminueixen significativament i per aquest motiu els afectats mengen més, fet que comporta que siguin més propensos a l'obesitat.

Al fallar la regulació de la secreció de la GH, aquesta disminueix i per aquest motiu tenen problemes de creixement.

Altres hormones que també influeixen en la regulació de la sacietat i l'obesitat són la leptina, la resistina i el pèptid Triosina.

L'adiponectina és una hormona que regula la sensibilitat de la insulina¹⁶ i és la causant de que molts SPW també pateixin diabetis tipus II¹⁷.

La hipotonia muscular és una disminució de la tensió muscular residual, que fa referència a les contraccions parcials, passives i contínues dels músculs. La tensió muscular residual ajuda a mantenir la postura. Per exemple, si un bebè de tensió muscular pot aixecar el cap quan està panxa avall, un que pateix la PWS no el podria aixecar (vegeu figura 7).

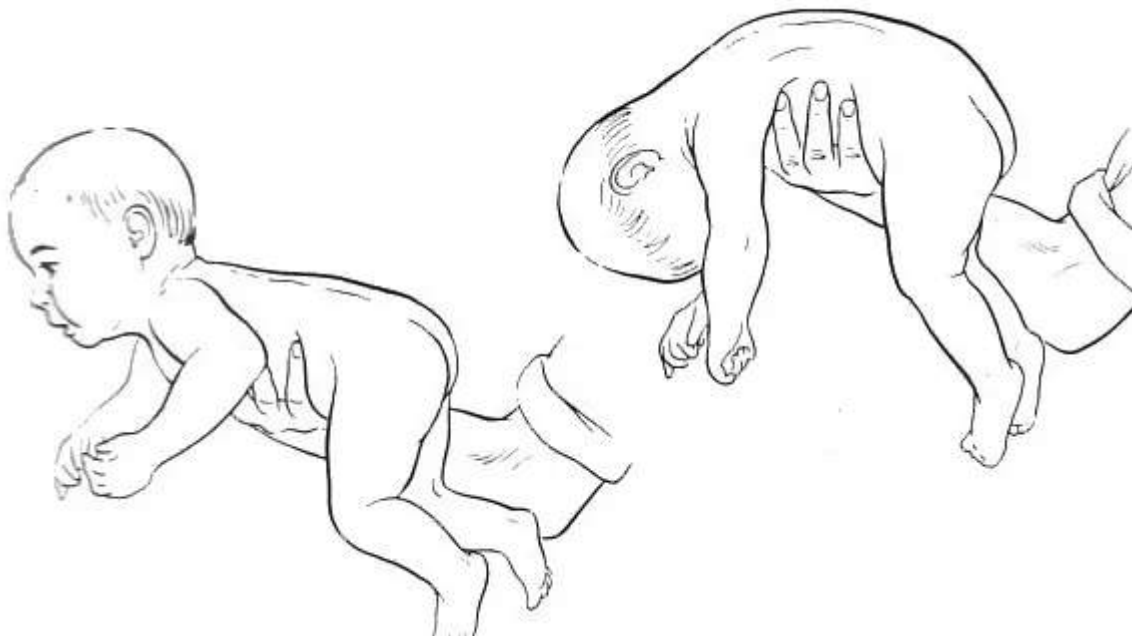


Figura 7. A l'esquerra de la imatge es pot veure un nadó que no pot aguantar el cap amunt a causa d'hipotonia muscular. A la dreta es veu un bebè sa. (Font: Granada, M., 2014)

L'hipogonadisme hipotalàmic és un trastorn en què l'hipotàlem¹⁸ o la glàndula pituïtària¹⁹ no secreten prou gonadotropina, una hormona que permet el desenvolupament dels genitals i

obtenir la maduresa sexual. Això comporta que no desenvolupin característiques físiques ni masculines ni femenines, no arribin a la maduresa sexual i siguin estèrils. La majoria de mascles que neixen amb aquesta síndrome, durant els primers 28 dies de vida, pateixen criptorquídia, que és la no descendència dels testicles a la bossa escrotal.

Els individus que tenen Prader Willi, solen tenir discapacitat cognitiva lleu que correspon a un Coeficient Intel·lectual (CI) entre 60 i 70. Generalment no aprenen a caminar fins als 24 mesos i també és freqüent patir dificultats en el llenguatge.

També es poden distingir algunes conductes comunes entre els malalts, que són rigidesa, “rabiets”, manipulació i caràcters compulsius. Un 25% de persones que pateixen la PWS també tenen el Trastorn de l’Espectre Autista (TEA) i un 10% el Trastorn per Dèficit d’Atenció i Hiperactivitat (TDAH).

Altres característiques comunes són manca de l’hormona de creixement (GH), alteracions de la respiració, escoliosis (curvatura de la columna vertebral en forma de “s” o “c”) (vegeu figura 8) a conseqüència de la hipotonia i del creixement ràpid de l’hormonació de GH, desviació de l’alineament d’un dels ulls respecte a l’altre (estrabisme) (vegeu figura 9), densitat mineral òssia baixa amb risc de patir osteoporosi, que comporta un major risc de trencaments i fractures òssies i poca sensibilitat al dolor i alteracions de la termoregulació interna.



Figura 8. A l'esquerra es veu una columna vertebral d'una persona amb escoliosis i a la dreta una columna sana. (Font: Suken, A., 2017)



Figura 9. Nen amb estrabisme. (Font: Linea y salud, 2009)

6.2. CAUSES

L'error genètic més freqüent que causa aquesta malaltia, corresponent al 70% dels casos, és la deleció²⁰ de la regió 15q11-q13 del cromosoma homòleg patern. La recurrència en aquest cas és inferior a l'1%. Hi ha molt poca probabilitat que els progenitors de l'individu malalt en tornin a tenir un altre amb el mateix problema.

Una altra mutació genètica que dóna lloc a aquesta síndrome és quan, en lloc de tenir un cromosoma 15 de cada progenitor, l'individu té els dos provinents de la mare (disomia uniparental). Aquest error representa el 25% dels casos. En aquest cas la recurrència és la mateixa que en l'anterior, de l'1%.

Un 5% la pateixen per alteracions en gens “imprinting”, és a dir, que s'expressa el gen provinent de la mare, quan s'hauria d'expressar el gen del pare. La recurrència en el cas del “imprinting”, és molt variable depenent de si la mutació es deu a l'atzar i és el primer membre portador de la mutació (mutació *de novo*) o si es deu a herència. La variabilitat va des de l'1% fins al 50% respectivament.

Per últim, menys d'un 1% pateixen PWS per reorganitzacions cromosòmiques que afecten la zona cromosòmica 15q11-q13, és a dir, que alteren la seqüència de nucleòtids de la regió del cromosoma 15 esmentada. Com al cas anterior, el percentatge de recurrència varia segons si és una mutació *de novo* (menys de l'1%) o si un dels progenitors és portador (del 5 al 50%).

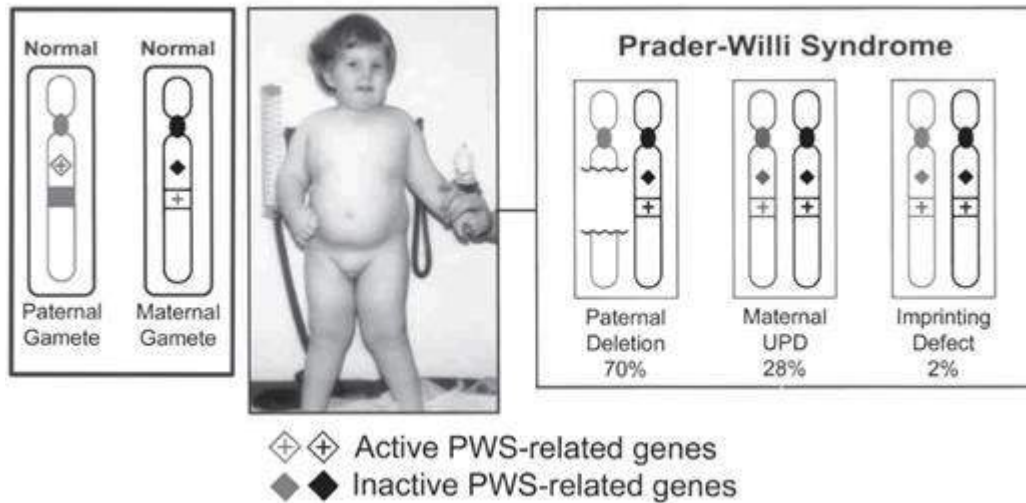


Figura 10. A la dreta es poden veure com són les cromàtides germanes en una persona sana: la cromàtide paterna té els gens relacionats amb PWS actius i la de la mare inactius. A l'esquerra es poden veure com són les cromàtides germanes per les diferents causes que una persona pot patir PWS. Com es pot veure, en tots els casos els gens relacionats amb PWS estan inactius. (Font: Prader-Willi Syndrome, 2017)

Aquest estudi estarà centrat en la relació entre la metilació dels gens “imprinting” relacionats amb la PWS i les característiques clíniques d’obesitat infantil i problemes de desenvolupament.

PART PRÀCTICA



1. INSTITUT DE RECERCA

L’Institut d’Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi, 2005) és un centre de recerca de la xarxa de centres CERCA de la Generalitat de Catalunya, que facilita, suporta i segueix l’activitat dels seus centres.

El centre, està associat amb diferents institucions: Institut Català de la Salut (ICS), Institut Català d’Oncologia (ICO), Universitat de Girona (UdG), Institut de Diagnosi per la imatge IDI i Institut d’Assistència Sanitària (IAS).

El seu objectiu principal és fer recerca mitjançant l’ajut dels hospitals de la xarxa hospitalària pública de la província de Girona.

Aquesta entitat té cinquanta-cinc projectes de recerca, quatre-cents setanta-dos estudis de recerca clínica, mil quatre-cents setanta-vuit articles en revistes internacionals i deu projectes d’innovació.

Els més de 300 investigadors duen a terme el noranta per cent de la investigació biomèdica de Girona. Aquests investigadors estan repartits en: dos grups cardiovasculars, sis grups de metabolisme i inflamació, quatre grups en neurociència, un d’oncohematologia i estan en procés de crear un grup d’imatge mèdica i un altre de salut mental.

L’estudi del treball està portat a terme pel grup de recerca de metabolisme materno-fetal i el d’obesitat i risc cardiovascular en pediatria, liderats per la Dra. Judit Bassols i el metge Dr. Abel López-Bermejo, respectivament.

2. MATERIAL





2.1. SUBJECTES D’ESTUDI



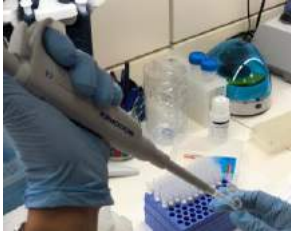

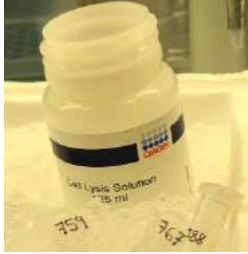

Les mostres utilitzades en l’estudi són de placentes de mares anònimes de població normal, els fills de les quals són d’edat pediàtrica, que van participar en un estudi de risc cardiovascular a l’hospital Josep Trueta. Malgrat haver-hi centenars de mostres, al ser un estudi de cohort, s’han de seleccionar les placentes maternes que segueixen un perfil determinat i, a més, que es tingui el màxim d’informació del seguiment del fill o filla.







Un estudi de cohort és un estudi realitzat amb mostres que comparteixen unes característiques determinades. Per exemple, en aquest estudi, s’agafaven mostres de mares no fumadores, d’entre d’altres.


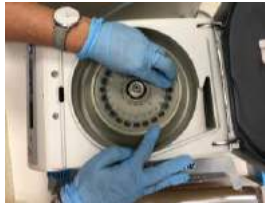



2.2. OBTENCIÓ D’ADN A PARTIR DE TEIXIT PLACENTARI MATERN -
EXTRACCIÓ D’ADN

Taula 1. Material necessari per a l’extracció d’ADN. A la primera columna hi ha el nom de l’instrument o reactiu, a la segona hi ha la marca i l’última té la imatge del material. Totes les imatges són de creació pròpia.

Material	Marca	Imatge
Bisturí		
Pinces		
Plaques de Petri		
Lleixiu		







<p>Aigua</p>		
<p>Eppendorfs</p>	<p>Eppendorf</p>	
<p>Pipetes</p>	<p>Socorex</p>	
<p>Mostres de placenta</p>		
<p>Cell Lysis Solution</p>	<p>Qiagen</p>	
<p>Proteinase K</p>		







Rnase	Invitrogen	
Protein precipitation Solution	Qiagen	
Aigua miliQ		
Isopropanol		
Etanol		
Balança	Sartorius Model: TE 15025	







Vòrtex	VALEP Scientifica Model: ZX3 Advanced Vortex Mixer	
Centrifugadora	Thermo científic Model MicroCL 17R Centrifuge	
Bany	Grant Model SUB aqua Pro	
Termobloc	Eppendorf	
Nanodrop	Thermo científic Model nanodrop 1000	


2.3. DIFERÈNCIA ENTRE CITOSINES METILADES I NO METILADES – BISULFITACIÓ

Taula 2. Material necessari per a la bisulfitació. A la primera columna hi ha el nom de l'instrument o reactiu, a la segona hi ha la marca i l'última té la imatge del material. Totes les imatges són de creació pròpia.

Material	Marca	Imatge
Placa de 96 pouets	AB applied Biosystems	
Pipetes	Handrop	
Eppendorfs	Eppendorf	
Columnes i tubs	Eppendorf	
Mostres d'ADN		
Aigua miliQ		

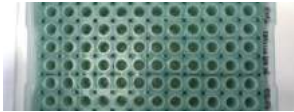
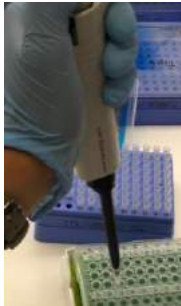
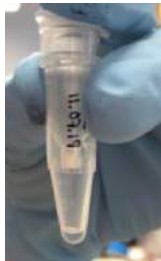

<p>CT-conversion reagent</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>M-dilution buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>M-dissolving buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>Etanol</p>		
<p>Wash buffer concentrate</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>M-binding buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	






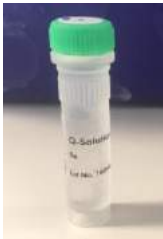
<p>M-wash buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>M-desulphonation buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>M-elution buffer</p>	<p>Zymo Research EZ ADN Methylation Kit</p>	
<p>Vòrtex</p>	<p>VALEP Scientifica Model: ZX3 Advanced Vortex Mixer</p>	
<p>Termociclador</p>	<p>AB Applied Biosystems</p>	
<p>Centrifugadora</p>	<p>Thermo scientific Model MicroCL 17R Centrifuge</p>	







Nanodrop	Thermo scientific Model nanodrop 1000	
----------	--	---


2.4. CONEIXEMENT DE LA TEMPERATURA IDÒNIA PERQUÈ LA PCR
DONI LLOC - OPTIMITZACIÓ DE "PRIMERS"

Taula 3. Material necessari per a l’optimització de “primers”. A la primera columna hi ha el nom de l’instrument o reactiu, a la segona hi ha la marca i l’última té la imatge del material. Totes les imatges són de creació pròpia.

Material	Marca	Imatge
Placa de 96 pouets	Applied Biosystems AB	
Pipetes	Handrop	
3 mostres d'ADN bisulfitat (BS ADN)		
2 mostres d'ADN		


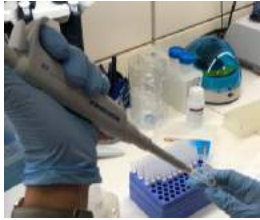
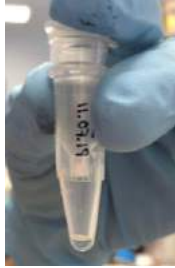

Aigua miliQ		
Hot star buffer	Qiagen	
dNTPs	Qiagen	
Forward primer (FW) i Reverse primer (RW)	Metabion international AG	
ADN-polimerasa	Qiagen	
Q-solution	Qiagen	







<p>Agarosa</p>	<p>Invitrogen Ultra Pure Agarose</p>	
<p>Midori</p>	<p>Qiagen</p>	
<p>Buffer</p>	<p>ThermoScientific</p>	
<p>Loading buffer</p>	<p>New England BioLabs</p>	
<p>Termociclador</p>	<p>AB Applied Biosystems</p>	
<p>Motlle pel gel d'agar</p>		






Màquina de raigs UV	Quantum Model: Vilber Lourmat	
---------------------	----------------------------------	---

2.5. OBTENCIÓ DE CÒPIES DE L’ADN BISULFITAT - REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Taula 4. Material necessari per a la PCR. A la primera columna hi ha el nom de l’instrument o reactiu, a la segona hi ha la marca i l’última té la imatge del material. Totes les imatges són de creació pròpia.

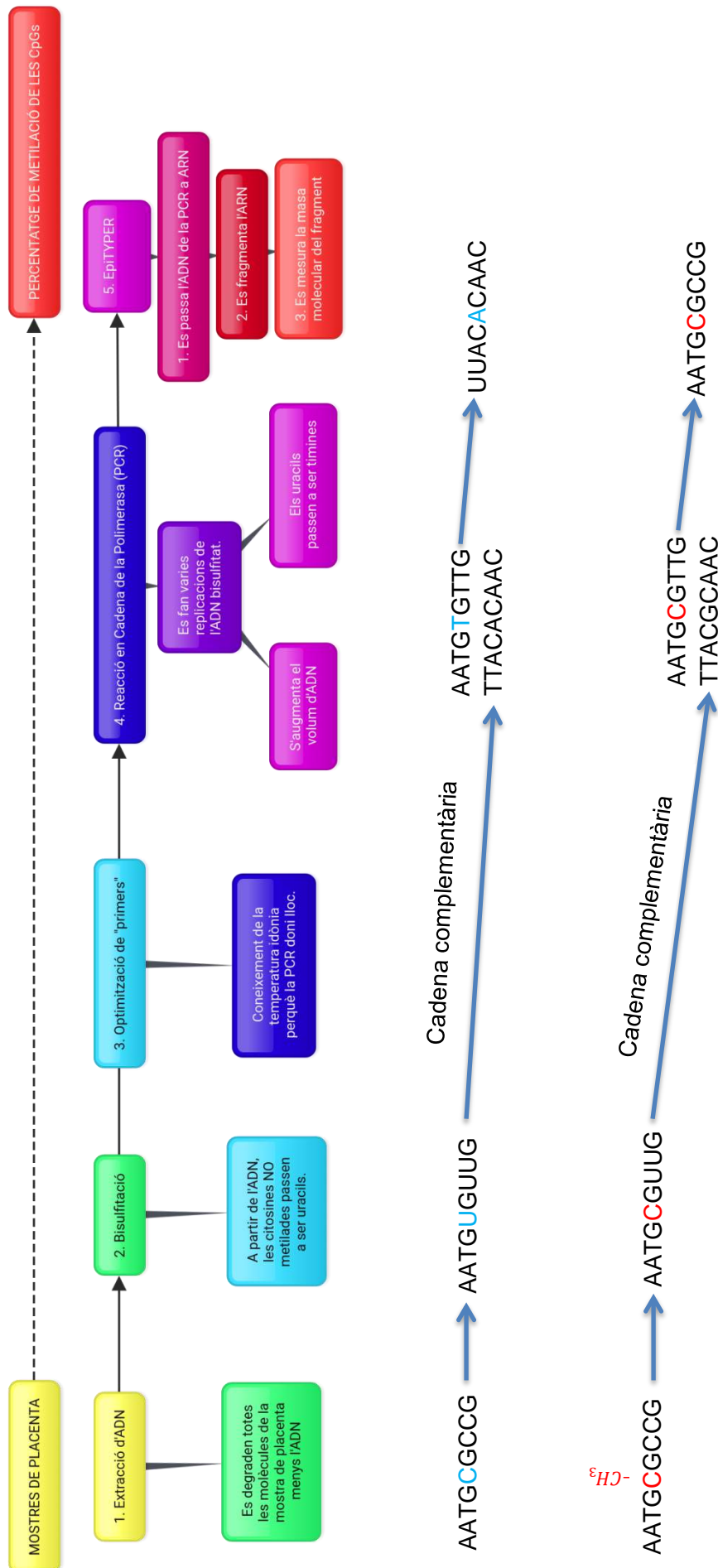
Material	Marca	Imatge
3 plaques de 96 pouets	AB Applied Biosystems	
Pipetes	Socorex	
Mostres de BS ADN		
Aigua miliQ		

Hot star buffer	Qiagen	
dNTPs	Qiagen	
Forward primer	Metabion international AG	
ADN-polimerasa	Qiagen	
Agarosa	Invitrogen Ultra pure Agarose	
Midori	Qiagen	

Buffer d'electroforesis	ThermoScientific	
Loading buffer	Qiagen	
Termociclador	AB Applied Biosystems	
Motle pel gel d'agar		
Màquina de raigs UV	Quantum Vilber Lourmat	

*Tots els reactius que s'anomenen “buffer” són productes de cases comercials que mantenen la fórmula del compost en secret.

3. MÈTODES



Abans de portar a terme qualsevol experimentació al laboratori, és molt important que tant els instruments que s'utilitzaran com el taulell de laboratori estiguin el màxim esterilitzats possible (vegeu figura 11), que durant el procés s'utilitzin guants i canviar la punta de la pipeta cada cop que s'hagi de pipetejar un líquid diferent. D'aquesta manera s'eviten contaminacions que posteriorment afectarien els resultats.



Figura 11. Netejant el taulell de laboratori i els instruments. (Font: creació pròpia)

Per evitar confusions i equivocacions, abans de portar a terme qualsevol experimentació, és essencial haver dissenyat la placa (vegeu taules 5, 7, 8, 10 i 11 a annexos), si és necessària, apuntant en cada pouet la mostra que s'hi posarà. D'aquesta manera, el tècnic de laboratori té clar el que ha d'introduir en cada pouet.

És important puntualitzar que, en cas que algun dels resultats no sigui el desitjat, es tornarà a dur a terme el mètode per esbrinar si es pot deure a una contaminació. Per assegurar que els resultats no estan contaminats, es posa un control que ha de donar negatiu. En el cas que el control no doni negatiu, s'haurà de repetir tot el procediment.

3.1. OBTENCIÓ D'ADN A PARTIR DE TEIXIT PLACENTARI MATERN - EXTRACCIÓ D'ADN

Per poder realitzar un estudi amb ADN, aquesta molècula és indispensable, però no es troben molècules d'ADN lliures pel medi, sinó que es troben en un embolcall dins de totes les cèl·lules dels animals i plantes, anomenat nucli cel·lular. Aquest procés degrada els altres tipus de biomolècules per poder obtenir el filament d'ADN sol.

Abans de començar el procés d'extracció, s'ha de preparar un bany a 55°C.

1. Es mesuren 15 mg de placenta de cada mostra, que s'ha de tallar sobre la placa de Petri amb el bisturí i cada una es guarda utilitzant pinces en un Eppendorf d'1'5 ml.

És important que les pinces i el bisturí es rentin amb lleixiu i aigua després d’haver estat en contacte amb cada mostra de placenta.

2. Cada Eppendorf es posa en gel perquè així es conservi la mostra a 4°C i s’afegeixen 300µl de l’enzim “Cell Lysis Solution”. D’aquesta manera l’ADN queda lliure en la dissolució.
3. S’afegeixen 2 µl de “Proteinase K”, que és un enzim que degrada les proteïnes i es barreja invertint cada Eppendorf unes 25 vegades per evitar que la mostra de placenta quedi precipitada al fons.
4. La barreja s’ha de deixar incubant al bany a 55°C una nit.

L’endemà, abans de tornar a començar, s’ha de preparar el bany a 37°C.

5. S’afegeixen 1’5 µl de “RNase A” per degradar restes d’ARN que hi pot haver. S’ha de tornar a agitar la mostra 25 vegades. Seguidament s’incuben al bany a 37°C i després es refreden 1 minut a 4°C.
6. S’afegeixen 100µl de “Protein Precipitation Solution” que fa que precipitin les proteïnes que encara resten a la mostra.
7. Es fa un vòrtex de 20 segons per acabar de barrejar totes les solucions i es deixa durant 10 minuts centrifugant a 16000 g perquè així quedi per un costat la part on hi ha l’ADN (SBNT) i per l’altra precipitin les proteïnes, l’ARN i les altres molècules que no interessin.
8. Es traspasa el SBNT en tubs nets i en aquests s’hi afegeixen 300µl d’isopropanol que, juntament amb una centrífuga d’1 minut a 16000 g, farà que l’ADN precipiti.

9. Es descarta el SBNT amb cura que l'ADN que ha precipitat quedi a l'Eppendorf, s'afegeixen 300µl d'etanol per netejar el *pellet* (l'ADN precipitat) i es torna a centrifugar 1 minut a 16000 g.



Figura 12. Descartant el SBNT amb cura perquè l'ADN precipitat quedi a l'Eppendorf. (Font: creació pròpia)

10. Es descarta l'etanol i es deixa assecar el tub perquè s'evaporin les restes d'etanol.

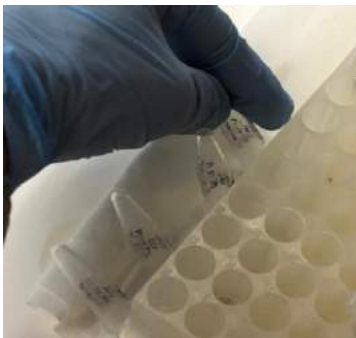


Figura 13. Eppendorfs assecant-se. (Font: creació pròpia)

11. Un cop l'Eppendorf està totalment sec, s'afegeixen 25µl d'aigua miliQ (aigua purificada i ionitzada) per diluir l'ADN.
12. Es mantenen les mostres a 65°C durant 1 hora, mantenir en agitació “over night” a 200 rpm.
13. Per últim, s'ha de mesurar l'absorbància amb el nanodrop per quantificar la puresa i determinar la concentració d'ADN de cada mostra.

Si alguna mostra està massa diluïda, s'haurà de repetir l'extracció.

3.2. DIFERÈNCIA ENTRE CITOSINES METILADES I NO METILADES - BISULFITACIÓ

La bisulfitació és un mètode que permet diferenciar les citosines metilades de les que no ho estan. Aquest procés fa una còpia de l'ADN que es vol estudiar canviant les citosines no metilades per uracil (vegeu figura 14), una base nitrogenada de l'àcid ribonucleic (ARN).

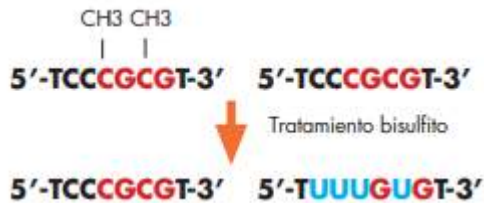


Figura 14. Representació d'una cadena d'ADN abans i després de la bisulfitació. (Font: Balaguer, F. i Moreira, L., 2010)

Abans de començar la bisulfitació, s'han de preparar en Eppendorfss les mostres d'ADN perquè tinguin un volum de 20 µl i estiguin a una concentració de 50 ng/µl. Utilitzant la fórmula $C_0 \cdot V_0 = C_f \cdot V_f$ es pot aïllar el volum que s'ha d'agafar de la mostra inicial (V_0) i després es resta aquest valor a 20 µl per saber el volum d'aigua miliQ que s'ha de posar perquè cada mostra estigui a la mateixa concentració (vegeu taules 5 i 6 a annexos).

1. Es prepara el CT-conversionreagent, que és un reactiu sensible a la llum i per tant s'ha de fer servir el més ràpid possible: Primerament, a cada tub de CT-conversionreagent s'ha de posar 900 µl d'aigua miliQ, 300µl de M-dilution buffer i 50 µl de M-dissolving buffer i després *vortejar* (agitar) durant uns 10 minuts. Quan la dissolució està feta, s'afegeixen 130 µl de la dissolució de CT-conversionreagent a cada mostra.
2. Es posen les mostres al termociclador on s'aplicaran 98°C durant 10 minuts, 64°C durant 2 hores i mitja i finalment es conservarà a 4°C.

Tots els passos que s'han fet fins aquest punt han servit per desaminar, és a dir, per trencar els enllaços entre el grup amino i les citosines.

3. A part, s'ha de preparar el M-wash buffer afegint 96 ml d'etanol a 24 ml de wash buffer concentrate.
4. Un cop acabat el termocicle, les mostres s'han de deixar reposar en gel durant 10 minuts. És molt important que les mostres estiguin tapades amb paper d'alumini durant tot aquest procés.

5. Mentre les mostres reposen, s'aboquen 600 µl de M-Binding Buffer a les columnes, que és el reactiu que té afinitat per l'ADN i fa que es quedi a la columna i que els altres reactius baixin al tub. Tapar les columnes i invertir varies vegades i, seguidament, afegir els 150 µl de mostra a la columna. Es posen els tubs a la centrifugadora a 16000 g durant 30 segons i es descarta el líquid que resta al tub.
6. S'aboquen 100 µl del M-wash buffer, preparat anteriorment, que és un reactiu que neteja les restes d'altres substàncies. Es torna a centrifugar a 16000 g durant 30 segons i es descarta el sobrant.
7. Es posen 200 µl de M-desulphonation buffer, que és el reactiu que passa les citosines no metilades a uracils i es deixa reposar 20 minuts encara tapat de la llum.
8. Un cop passats els 20 minuts, es torna a centrifugar a 16000 g durant 30 segons i s'afegeixen 200 µl més de M-wash buffer. Es torna a centrifugar amb les mateixes condicions i es descarta el líquid del tub. Aquest procés es torna a repetir.
9. Es centrifuga a 16000 g per assecar les columnes, es llencen els tubs i s'elueix l'ADN bisulfitat (BS ADN). L'elusió consisteix en transferir la columna en un Eppendorf de 1.5 ml; afegir-hi 15 µl de M-elution buffer, que és el que farà que es desprengui l'ADN bisulfitat de la columna i es quedi a l'Eppendorf. Es centrifuga a 16000 g durant 30 segons.
10. Finalment, s'afegeixen uns 40 µl d'aigua miliQ perquè estiguin a una concentració d'uns 10 ng/µl i es quantifica amb el nanodrop per saber la puresa i la concentració de cada mostra.

En cas que la puresa i la concentració d'alguna mostra sigui molt baixa, s'haurà de repetir la bisulfitació d'aquestes.

3.3. CONEIXEMENT DE LA TEMPERATURA IDÒNIA PERQUÈ LA PCR DONI LLOC - OPTIMITZACIÓ DE “PRIMERS”

L’optimització dels "primers" consisteix en esbrinar quina és la temperatura òptima perquè els “primers” s’uneixin a la zona del BS ADN desitjada i l’enzim ADN-polimerasa faci les màximes rèpliques possibles. És una prova on s’apliquen diferents temperatures a mostres amb el mateix contingut per esbrinar quina és la temperatura que proporciona més volum d’ADN per aplicar després a la PCR.

Aquesta optimització té molts factors a tenir en compte. Per exemple el fet que hi ha dues regions d'ADN que s’estudien, s’han aplicat diferents temperatures a determinades mostres, que la meitat de les mostres porten Q-solution i l’altra meitat no, i que hi ha mostres de BS ADN i d'ADN, per aquest motiu és molt important fer un bon disseny de la placa, per tenir clar què hi ha a cada pouet (vegeu taula 7 a annexos).

1. Primer de tot, s’ha de calcular la quantitat de dissolució inicial de cada ADN que s’ha de diluir en aigua miliQ per aconseguir 4 µl a una concentració de 5 ng/µl a cada pouet utilitzant la igualació $C_0 \cdot V_0 = C_f \cdot V_f$.
2. Als pouets de les columnes parelles es posen 2,84 µl d’aigua miliQ, 1µl de “Hot Star Buffer” que és una dissolució que serveix per aconseguir les condicions òptimes perquè es dugui a terme la replicació de l'ADN; 1 µl de “Forward primer” i 1 µl de “Reverse Primer” de concentració 2 µM que són trossos d'ADN monocatenari que estan dissenyats perquè s’enganxin a determinades regions de l'ADN per complementarietat de bases perquè, en unir-se l’ADN-polimerasa, pugui replicar la cadena; 0,08 µl de dNTP 25 mM que són els nucleòtids trifosfats que la ADN-polimerasa utilitza per fer la cadena complementària; 0,08 µl d'ADN-polimerasa 5 U/µl que és l’enzim que uneix els nucleòtids i 4 µl d'ADN o BS ADN .
3. Als pouets de les columnes senars amb 0,84 µl d’aigua miliQ, 1 µl de “Hot Star Buffer”, 1 µl de “Forward primer” i “Reverse primer”, 0,08 µl de dNTP, 0,08 µl d'ADN-polimerasa, 1,5 µl d'ADN o BS ADN (amb la mateixa concentració que s’ha posat a les parelles) i Q-solution que és una solució que fa que la replicació d'ADN sigui més eficaç.
4. Un cop tots els pouets estan omplerts i s’han posat els controls, es tapen i es deixa la plaqueta al termociclador:

- a. Manté totes les mostres a 95°C durant 15 minuts
 - b. Fa 4 cicles de 95°C durant 20 segons, 65°C durant 30 segons i 72°C durant 60 segons
 - c. Fa 4 cicles de 95°C durant 20 segons, 58°C durant 30 segons i 72°C durant 60 segons
 - d. Fa 38 cicles de 95°C durant 20 segons, la temperatura que s’ha adjudicat a cada parell de columnes (53°C les dues primeres, 55°C el segon i tercer parell, 57°C el quart i cinquè parell i 59°C els dos últims) durant 30 segons.
 - e. Posa les mostres a 72°C durant 3 minuts, 15°C durant 10 segons i les manté a 4°C.
5. Després s’ha de preparar un gel d’agarosa on s’hi posa: agarosa, que és el que dona consistència; midori, que fa d’agent intercalant de l’ADN i buffer. Les quantitats de cada substància varien segons si es volen uns resultats qualitius o quantitius, en aquest cas no cal molta agarosa, ja que els resultats són qualitius.
 6. Mentre es deixa reposar el gel en un motlle que fa uns pouets al gel, es fa una nova dissolució a partir de cada mostra que consisteix en 5 µl de la dissolució anterior i 1 µl de “Loading Buffer” que dona color i pes a les mostres.
 7. Per últim es posa el gel en una placa submergit en Buffer; posar cada mostra, control i un marcador a un dels pouets del gel. El marcador es posa al principi de cada fila de pouets per comparar cada mostra i saber la quantitat de bases que hi ha. Després s’ha de fer passar pel gel un corrent perquè “corrin” les mostres, deixar durant mitja hora perquè “corrin” les mostres i posar el gel a la màquina de raigs UV perquè llavors es mostrin els resultats a l’ordinador.

Un cop es tenen els resultats, s’escull de cada zona les bandes que s’ajusten més a la longitud de parell de bases esperat i la intensitat de les bandes (que és proporcional a l’efectivitat de la replicació de l’ADN).

3.4. OBTENCIÓ DE CÒPIES DE L'ADN BISULFITAT - REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacció en cadena de la polimerasa és un mètode d'amplificació i duplicació d'una regió específica d'ADN *in vitro*. És a dir, es fan còpies del tros d'ADN que es vol estudiar en condicions de laboratori, per així tenir un volum gran del gen (vegeu figura 16). A més d'amplificar el gen d'interès, si prèviament s'ha fet una bisulfitació, es canvien els uracils per timines (vegeu figura 15).

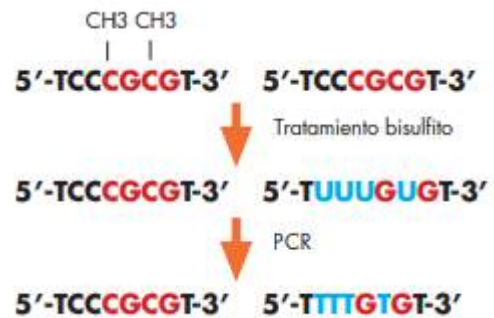


Figura 15. Representació d'una cadena d'ADN després de ser bisulfitada i després de la PCR. (Font: Balaguer, F. i Moreira, L., 2010)

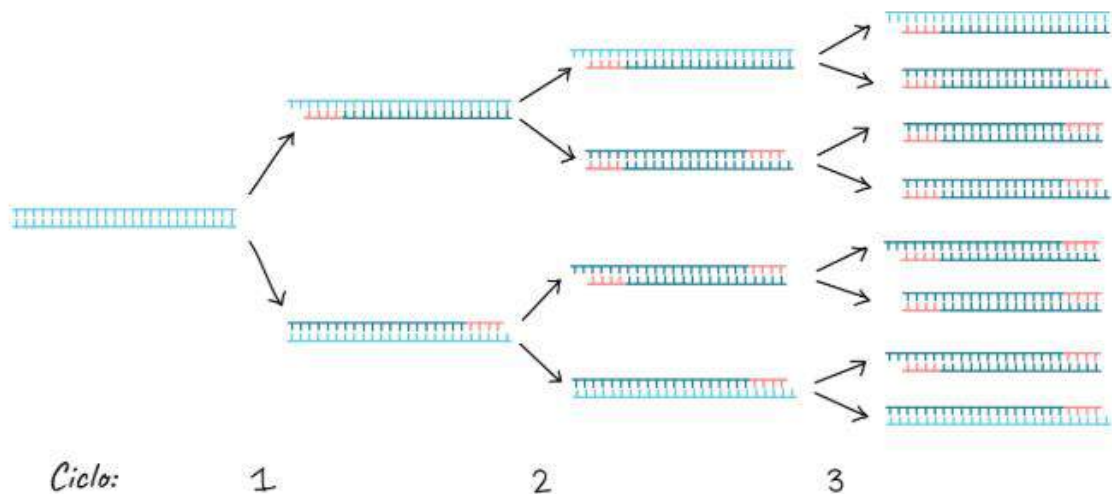


Figura 16. Representació de les replicacions de l'ADN que es fan durant el mètode de la PCR. (Font: Khan Academy, 2017b)

Aquesta PCR es fa només de la regió de l'ADN PWS_IC2 (a l'optimització) perquè és la regió que dóna més informació sobre les CpGs metilades.

Abans de començar amb la PCR, s'han de fer els càlculs amb la fórmula $C_0 \cdot V_0 = C_f \cdot V_f$ per saber el volum d'aigua i d'ADN que cal per obtenir un volum de 20 μ l a una concentració de 5 ng/ μ l (vegeu taula 9 a annexos).

Per aquesta PCR, es faran servir tres mostres de cada BS ADN per després fer la mitjana dels tres resultats, per tant, en aquest cas, el procés és el següent:

1. Primer es fa una placa mare on hi ha tot el volum d'ADN i aigua miliQ per a 4 mostres (ja que és convenient treballar amb excés) de cada BS ADN (vegeu taula 8 a annexos).
2. Després es passa cada mostra a tres pouets diferents i s'afegeixen els reactius necessaris: 2,84 μ l d'aigua miliQ, 1 μ l de "Hot Star Buffer", 1 μ l de "Forward primer" i 1 μ l de "Reverse Primer" de concentració 2 μ M, 0,08 μ l de dNTP 25 mM, 0,08 μ l d'ADN-polimerasa 5 U/ μ l i 1,5 μ l de BS ADN (vegeu taules 10 i 11 a annexos).
3. Un cop omplertes les plaquetes i posat el control, es posen al termociclador a:
 - a. 95°C durant 15 minuts
 - b. Fa 4 cicles de 95°C durant 20 segons, 65°C durant 30 segons i 72°C durant 60 segons
 - c. Fa 4 cicles de 95°C durant 20 segons, 58°C durant 30 segons i 72°C durant 60 segons
 - d. Fa 38 cicles més de 95°C durant 20 segons, la temperatura que s'ha adjudicat gràcies a l'optimització: 55°C durant 30 segons i per acabar es posa a 72°C durant 3 minuts, 15°C durant 10 segons i manté les mostres a 4°C.
4. Finalment es fa electroforesi en gel per acreditar que la PCR ha amplificat significativament totes les mostres de BS ADN.

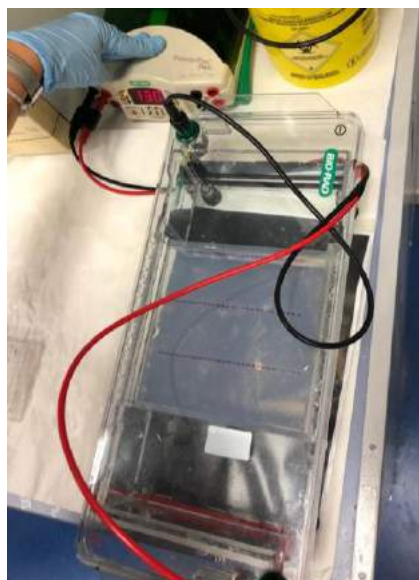


Figura 17. Electroforesi en gel. (Font: creació pròpia)

3.5. ESTUDI DE LES CITOSINES METILADES - EpiTYPER

Un cop realitzada la PCR, la cadena d'ADN s'ha de portar a un laboratori extern per seqüenciar. En aquest cas, les mostres es van portar a CEGEN (Centro Nacional de Genotipado).

L'epiTYPER consisteix a obtenir un percentatge de metilació de cada CpG. S'efectua en tres parts: pasar l'ADN a ARN, fraccionar-lo pels punts on hi ha els uracils i mesurar la massa molecular d'aquests fragments.

1. Transcripció²¹ T7: Les mostres d'ADN de la PCR, són transcrites a ARN d'una sola cadena. Durant aquest procés les timines que a la cadena extreta d'ADN eren citosines no metilades es transformen en adenines i les citosines metilades es converteixen en guanines.

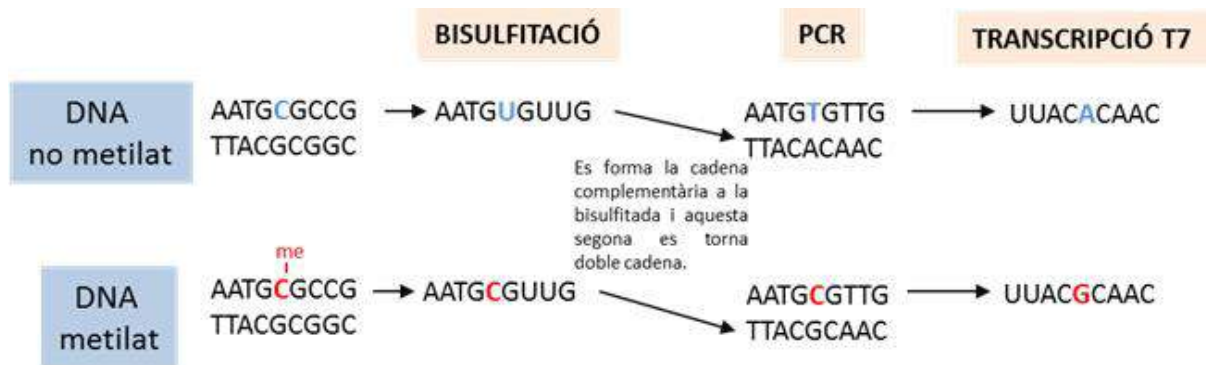


Figura 18. Procés de l'ADN des de l'extracció fins a la transcripció T7. (Font: Xargay, S.)

S'anomena “Transcripció T7” perquè el “primer” i l'enzim que porten a terme la transcripció s'anomenen T7.

2. “Base-specific RNA cleavage”: L'ARN transcrit anteriorment es talla als punts on hi ha uracil a partir d'ARNsa A. Això es fa perquè d'aquesta manera es pot estudiar la metilació de cada CpG. Si aquest pas no es portés a terme, s'obtidria el percentatge de metilació total de totes les CpGs.

3. Espectrometria de masses: Un aparell mesura la massa dels fragments. A partir de la massa i de la quantitat de fragments, es pot calcular el percentatge de fragments metilats.

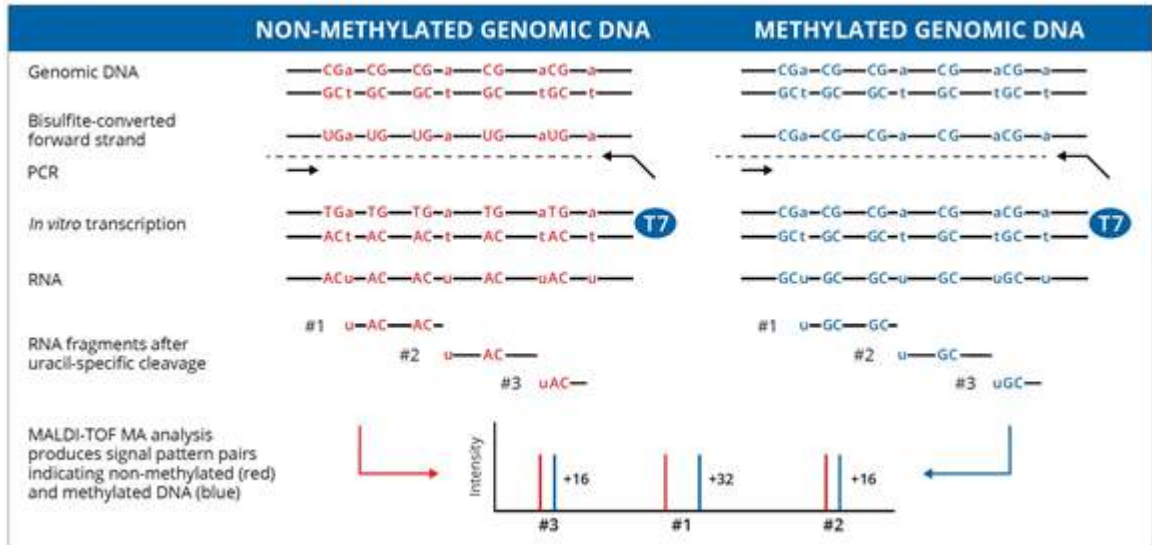


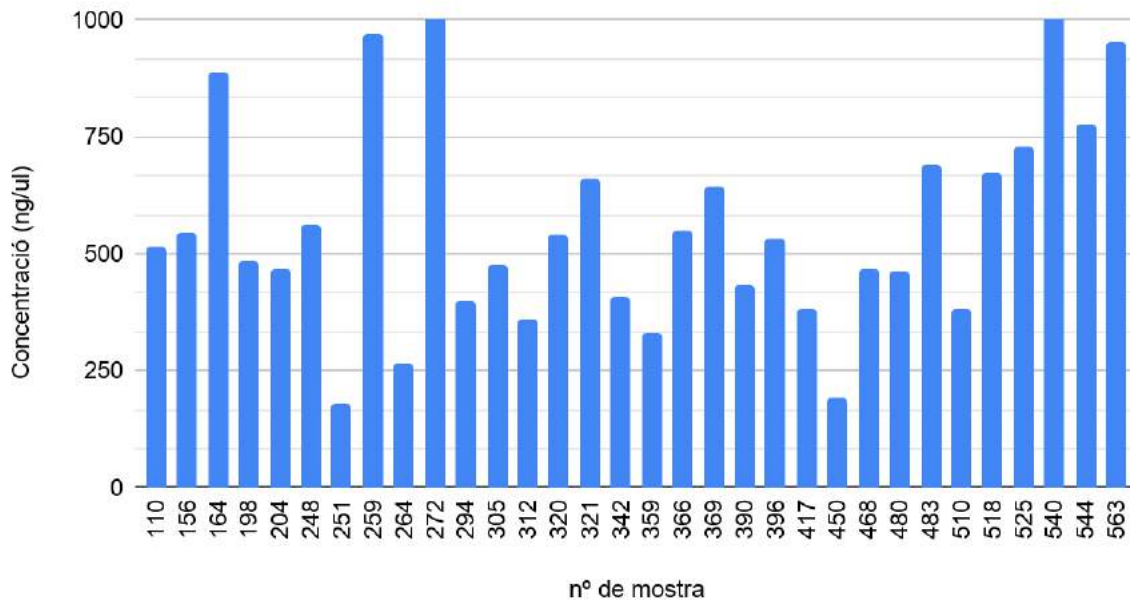
Figura 19. Procés de l'ADN des de l'extracció fins a l'espectrometria de masses. "Overview of EpiTYPER Assay".

4. RESULTATS

4.1. OBTENCIÓ D’ADN DE TEIXIT PLACENTARI MATERN - EXTRACCIÓ D’ADN

Els resultats de l’extracció d’ADN són les concentracions mesurades en ng/μl obtinguts a partir de la quantificació (vegeu taula 12 a annexos).

Concentració de DNA



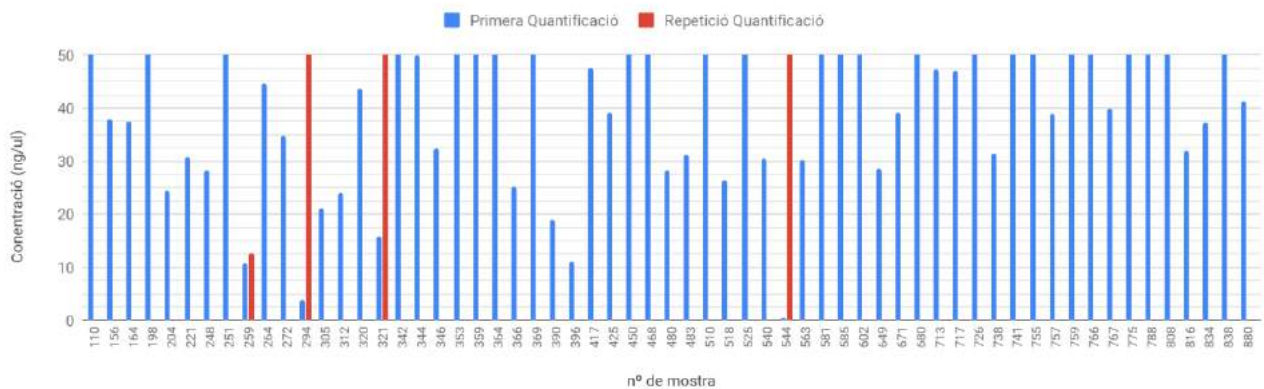
Gràfic 1. Concentracions de mostres d’extraccions d’ADN. (Font: creació pròpia)

La concentració de les mostres es troba entre els 160 ng/μl i per sobre dels 1000 ng/μl. Les dues mostres amb concentració més alta són la 272 la 540 amb concentracions superiors a 1000 ng/μl. Les dues mostres amb concentració més baixa són la 251 i la 450, amb uns valors lleugerament superiors als 160 ng/μl (vegeu gràfic 1).

4.2. DIFERÈNCIA ENTRE CITOSINES METILADES I NO METILADES - BISULFITACIÓ

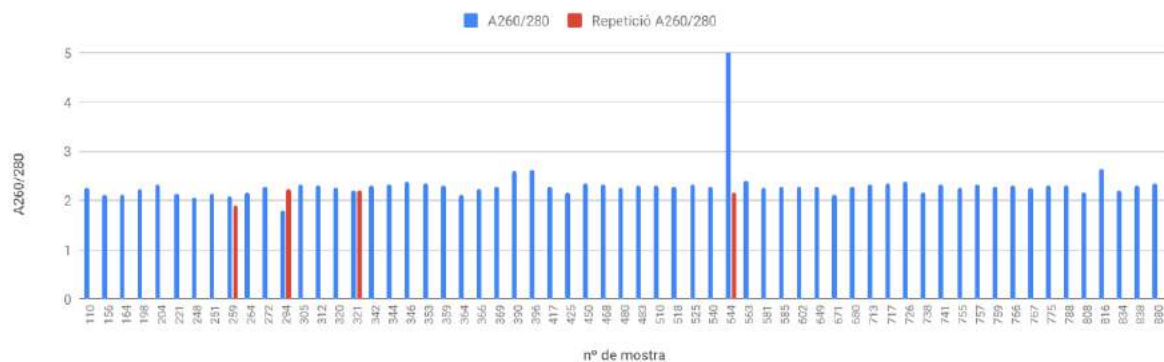
Els resultats de la bisulfitejació són obtinguts amb el mateix procediment que a l'extracció d'ADN, la quantificació (vegeu taula 13 a annexos). En aquest cas, però, hi ha un número més elevat de mostres perquè ja hi havia algunes extraccions prèviament fetes. Els resultats són tres: la concentració mesurada en ng/μl i la puresa que es mesura amb la ràtio A260/280 i l'A260/230.

Concentració BS ADN



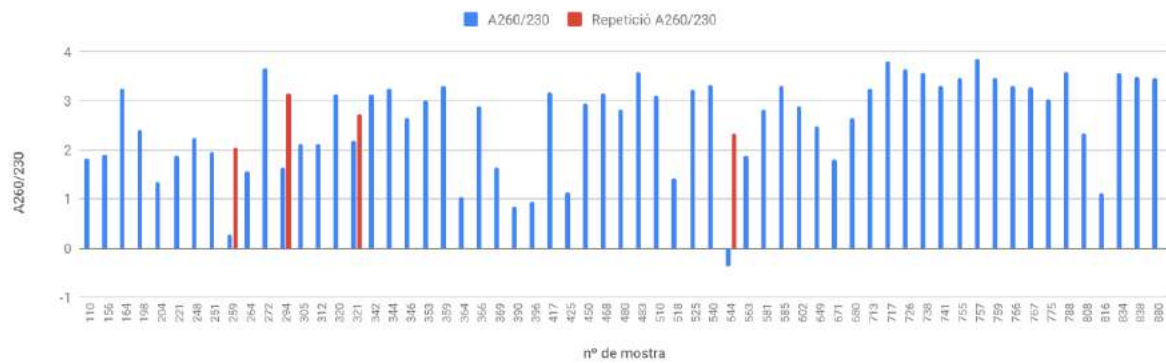
Gràfic 2. Concentracions de mostres d'ADN bisulfitejat (barres blaves) i concentracions de bisulfitejacions repetides (barres vermelles). (Font: creació pròpia)

Ràtio A260/280 i Repetició



Gràfic 3. Puresa de ràtio A260/280 de mostres d'ADN bisulfitejat (barres blaves) i puresa de bisulfitejacions repetides (barres vermelles). (Font: creació pròpia)

Ràtio A260/230 i Repetició



Gràfic 4. Puresa de ràtio A260/230 de mostres d’ADN bisulfitat (barres blaves) i puresa de bisulfitacions repetides (barres vermelles). (Font: creació pròpia)

En aquests gràfics es pot observar la concentració mesurada amb ng/µl i les pureses de les diferents mostres i les repeticions de la quantificació d’algunes d’aquestes (de color vermell).

En el gràfic 2 es poden observar les concentracions del BS ADN, on destaquen les mostres 294 i 544 per tenir valors inferiors a 4 ng/µl en la primera bisulfitació. La resta de mostres tenen concentracions entre 10 ng/µl i fins a més de 50 ng/µl.

En el gràfic 3 s’observa la puresa de ràtio A260/280, on es destaca la mostra 544 per tenir un valor superior a 5. Totes les altres mostres tenen valors lleugerament superiors a 2. En el gràfic 3 es pot veure la ràtio d’A260/230, on destaquen la mostra 259 per tenir un valor inferior a 0,5 i la 544 per tenir un valor negatiu. Les altres mostres tenen valors entre 1 i 3,5.

4.3. CONEIXEMENT DE LA TEMERATURA IDÒNIA PERQUÈ LA PCR DONI LLOC - OPTIMITZACIÓ DE "PRIMERS"

Els resultats de l’optimització dels "primers", obtinguts a partir d’electroforesi en gel i analitzats amb la màquina de raigs UV són els següents:

En la imatge 20 es pot observar, a l’inici de cada fila, el marcador de pes molecular. Després de cada marcador hi ha dos grups que han estat sotmesos a temperatures diferents al

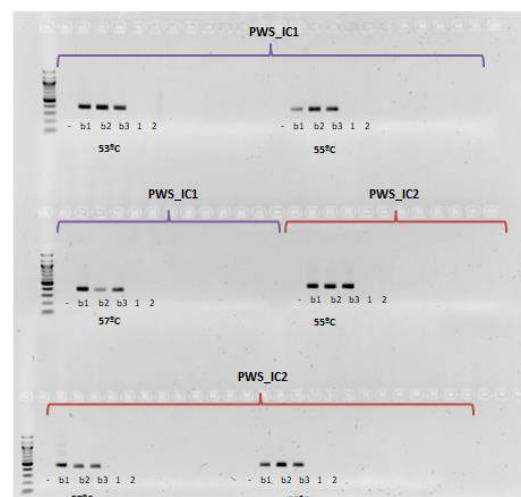


Figura 20. Resultats de l’optimització de "primers". 52 (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

termociclador, formats per tres mostres de BS ADN, que donen positiu i surt la banda negra, i dues d'ADN no bisulfitat, que donen negatiu i no tenen cap banda. A la primera fila i a la meitat de la segona hi trobem l'amplificació de la zona IC1 a 53°C, 55°C i 57°C respectivament. A la meitat de la segona fila i a la tercera hi ha l'amplificació de la IC2 a 55°C, 57°C i 59°C respectivament.

4.4. OBTENCIÓ DE CÒPIES DE L'ADN BISULFITAT - REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

Els resultats obtinguts de la PCR són amb el mateix procediment que en l'optimització, amb la diferència que, en aquest cas, només s'ha fet amplificació de la zona IC2 amb la temperatura que s'ha determinat com a òptima a l'optimització.

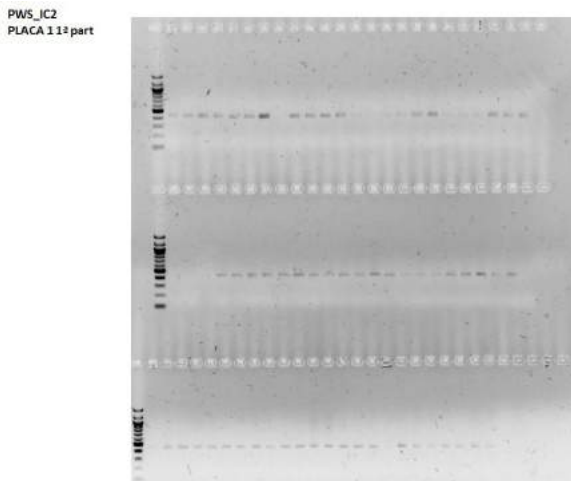


Figura 21. Resultats de la primera part de la placa 1 de la PCR per electroforesi en gel. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)

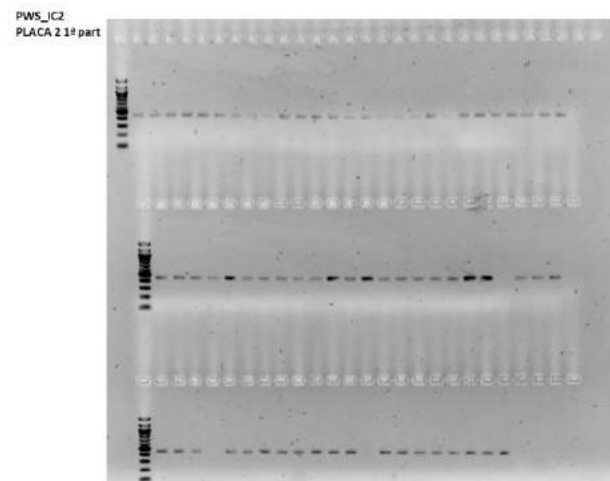


Figura 22. Resultats de la primera part de la placa 2 de la PCR per electroforesi en gel. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)

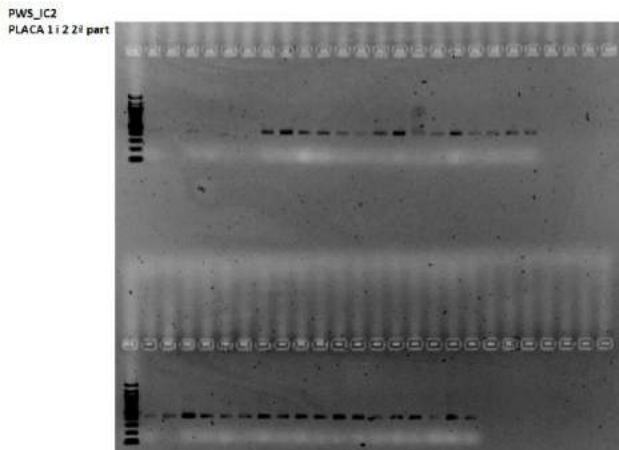


Figura 23. Resultats de la segona part de les plaques 1 i 2 de la PCR per electroforesi en gel. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)

En aquestes imatges es pot observar que a la primera columna de cada fila hi ha el marcador de pes molecular, a la imatge 21 es poden veure les amplificacions de la primera part de la placa 1 (vegeu taula 10 a annexos), a la imatge 22 es veuen les amplificacions de la placa 2 (vegeu taula 11 a annexos) i a la imatge 23 s'hi veuen les amplificacions que no cabien als primers gels de les plaques 1 i 2.

La majoria de mostres tenen una banda negra o grisa però algunes mostres no en tenen.

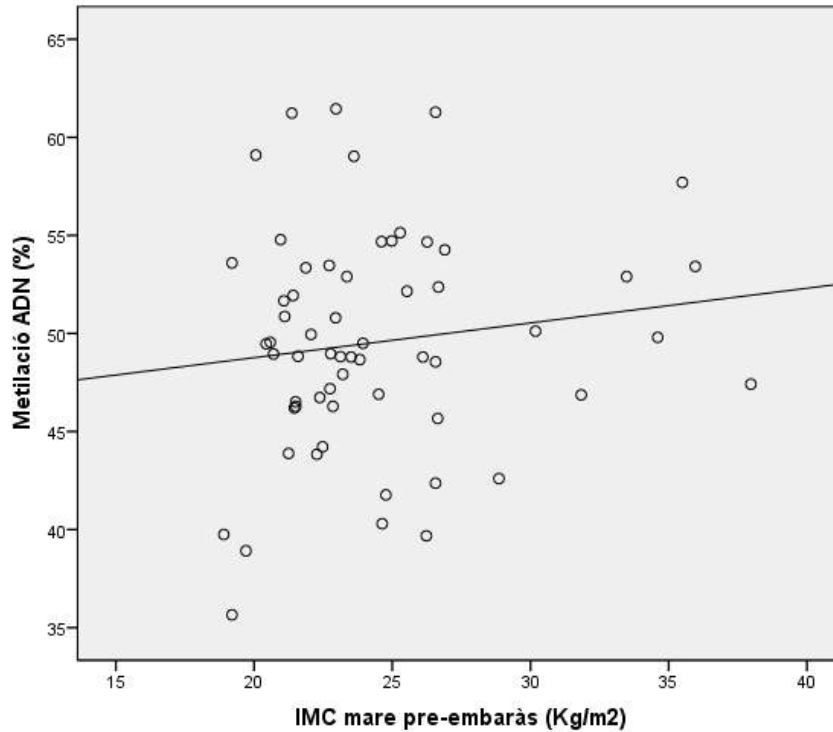
4.5. ESTUDI DE LES CITOSINES NO METILADES – EpiTYPER

Els resultats de l'epiTYPER són els gràfics 5, 6, 7, 8, 9 i 10. Aquests gràfics són de correlacions, que serveixen per demostrar la relació que tenen dues variables. Tots els gràfics tenen en comú que una de les variables sempre és el percentatge de metilació mitjana de totes les CpGs dels gens relacionats amb PWS dels nens estudiats (fills de les mares estudiades).

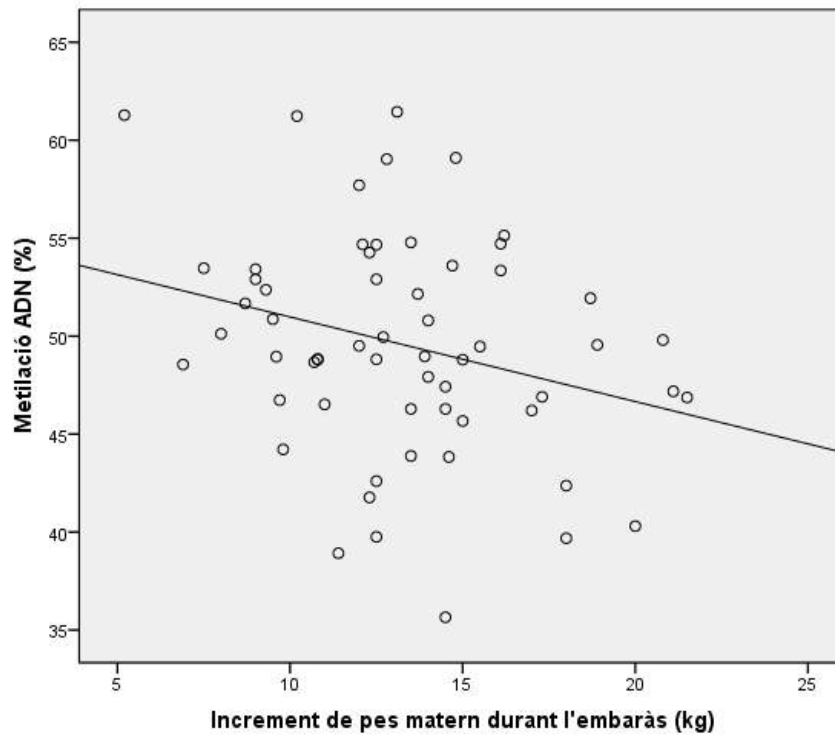
Al gràfic 5, la correlació és amb l'índex de massa corporal matern pregestacional. Cal saber que l'índex de massa corporal (IMC) mesura la corpulència d'una persona en relació amb la seva alçada. Un IMC inferior a 25 Kg/m^2 és considerat “normal”, entre 25 i 30 Kg/m^2 es considera sobrepès i per sobre de 30 Kg/m^2 és obesitat. Es pot veure que totes les mostres estan bastant disperses tot i la línia negra (línia de tendència) puja lleugerament cap a la dreta.

Al gràfic 6, la correlació és amb l'augment de pes de la mare durant la gestació. En aquest gràfic, podem veure que tant els punts com la línia de tendència tendeixen a baixar cap a la dreta.

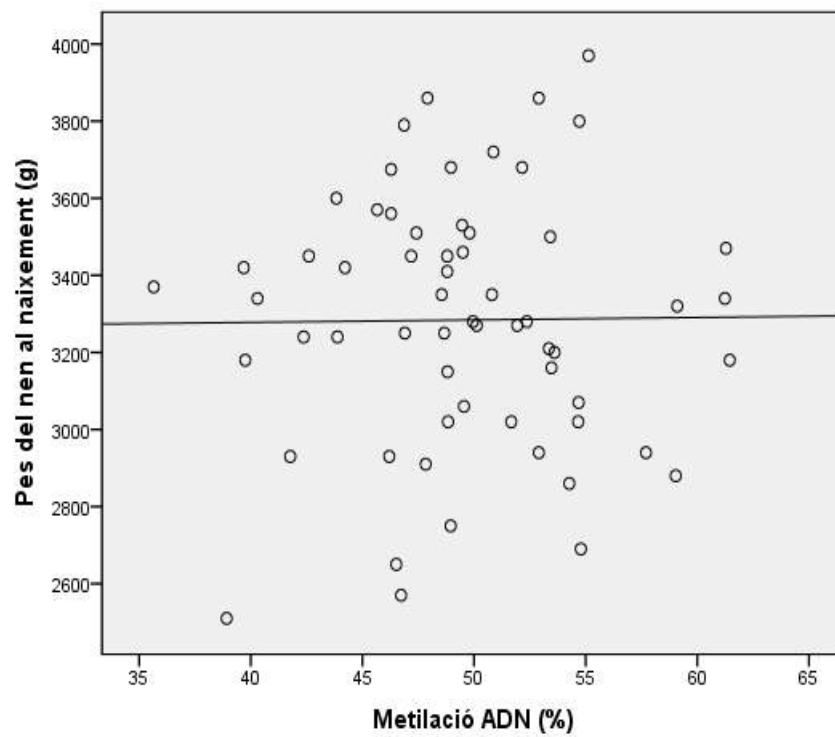
Al gràfic 7, la correlació és amb el pes del nen al néixer, al gràfic 8 és amb el pes del nadó a l’any de vida, al gràfic 9 és amb el pes del nen als 6 anys i per últim, la correlació del gràfic 10 és amb l’IMC del nen als 6 anys. Com es veuen als gràfics, totes les rodones estan molt disperses i les línies de tendència són completament planes.



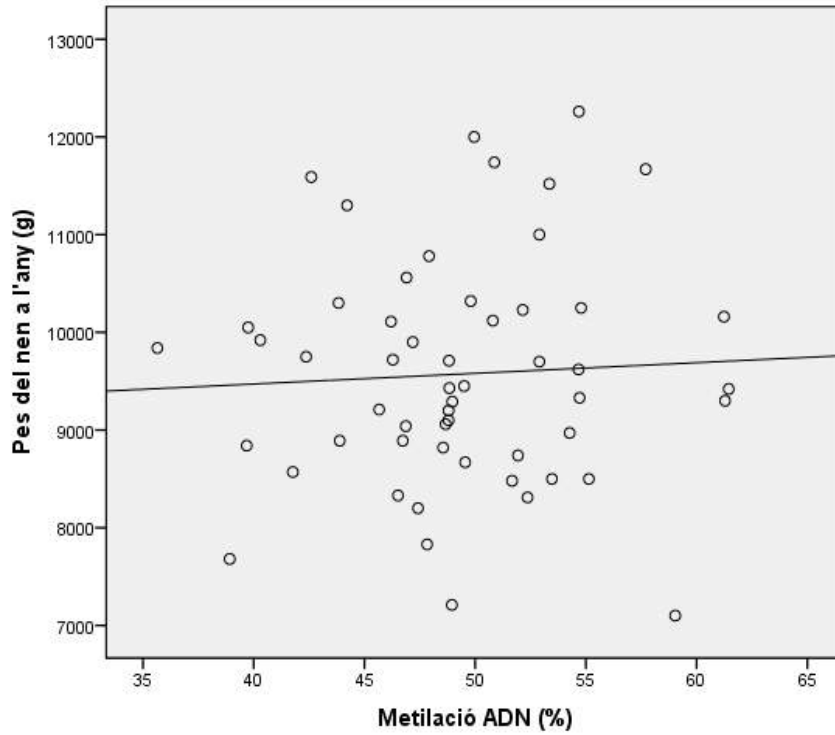
Gràfic5. Correlació entre l'índex de massa corporal matern i el percentatge de matilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)



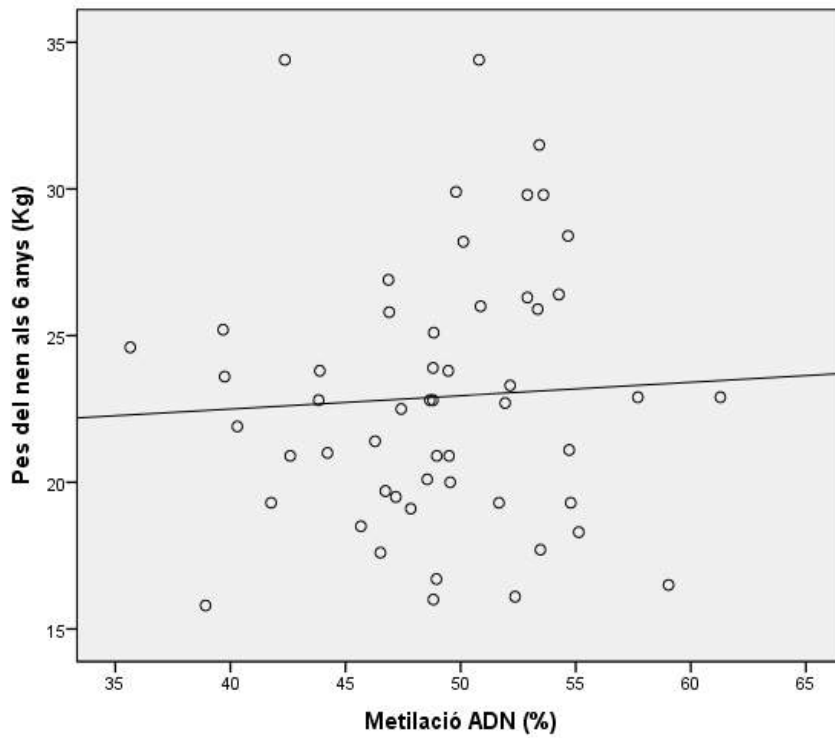
Gràfic 6. Correlació entre l'increment de pes gestacional de la mare i percentatge de metilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)



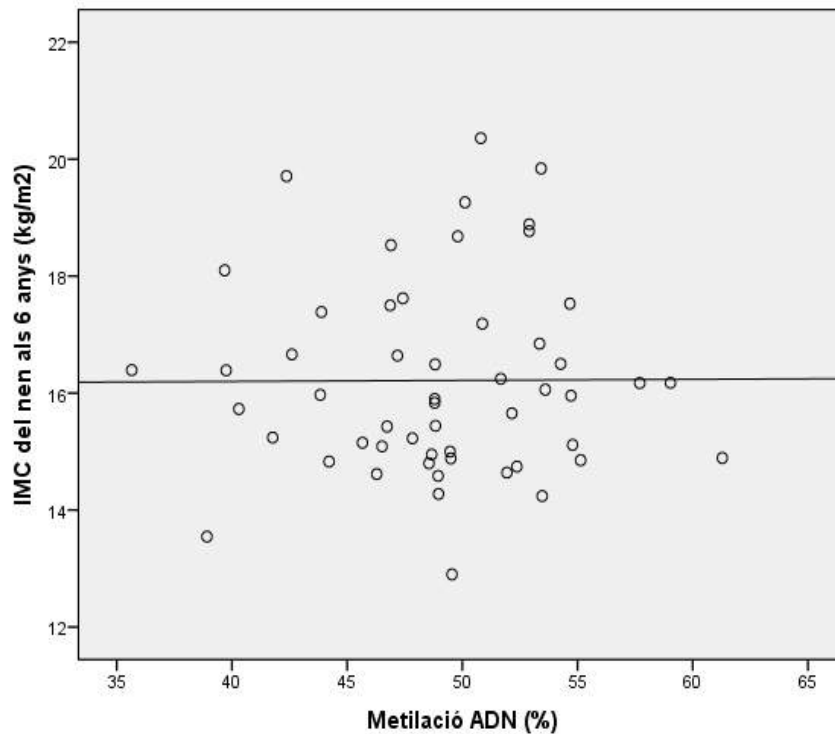
Gràfic 7. Correlació entre el pes del nen al naixement i percentatge de metilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)



Gràfic 8. Correlació entre el pes del nen a l'any de vida i el percentatge de metilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)



Gràfic 9. Correlació entre el pes del nen als 6 anys de vida i el percentatge de metilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)



Gràfic 10. Correlació entre l'índex de massa corporal del nen als 6 anys de vida i el percentatge de metilació de totes les CpGs dels seus gens PWS. (Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)

5. DISCUSSIÓ

5.1. OBTENCIÓ D'ADN DE TEIXIT PLACENTARI MATERN - EXTRACCIÓ D'ADN

A partir dels resultats de l'extracció d'ADN es pot determinar si cada mostra d'ADN té una concentració suficient com per després fer la bisulfitejació. La concentració mínima d'ADN que ha de tenir cada mostra és de 50 ng/μl.

Com es pot veure al gràfic 1, totes les mostres superen els 50 ng/μl i, fins i tot dels 150 ng/μl. En aquest cas no s'ha de repetir cap extracció, però si alguna concentració fos inferior als 50 ng/μl, s'hauria de repetir.

5.2. DIFERÈNCIA ENTRE CITOSINES METILADES I NO METILADES - BISULFITACIÓ

A partir dels resultats de la bisulfitació es pot determinar per un costat si l'ADN bisulfitat està lliure d'impureses i se'n pot fer la PCR i, per l'altre, la concentració de BS ADN que té per poder determinar la quantitat de BS ADN que s'ha de posar de cada mostra per a tenir la concentració necessària per portar a terme la PCR.

El valor de la concentració de l'ADN no pot ser inferior a 5 ng/μl. La ràtio A260/280 ha d'estar entre 1,6 i 2,8. Si una mostra surt inferior a 1,6, pot ser que estigui contaminada de compostos aromàtics com, per exemple proteïnes o alcohol i si surt superior a 2,8, pot ser que estigui contaminada d'ARN. La ràtio A260/230 ha d'estar entre 0,8 i 3,8. En el cas que un valor sigui inferior a 0,8 o superior a 3,8, la mostra corre el risc d'estar contaminada. Malgrat això, en la ràtio A260/230, els valors poden variar segons la concentració o de la composició del medi en què es troba el BS ADN, per tant, la ràtio d'A260/280 és més fiable.

En cas que la concentració siguin molt baixos o que els valors de puresa no estiguin dins dels intervals marcats, s'haurà de tornar a bisulfitar aquella mostra.

Com es pot observar en els gràfics 2, 3 i 4, les mostres repetides són la 259, 294, 321 i 544. La mostra 259 es va haver de repetir perquè tenia una ràtio A260/230 molt baixa (vegeu gràfic 4) a més d'una concentració no massa elevada (vegeu gràfic 2). La mostra 294 es va repetir perquè tenia una concentració molt baixa (vegeu gràfic 2). La mostra 321 es va repetir perquè, tot i tenir una concentració una mica més alta que 5 ng/μl (vegeu gràfic 2), el seu volum no era suficient per a omplir 20 μl. La mostra 544 es va repetir perquè no complia cap dels requisits: tenia una concentració inferior a 5 ng/μl (vegeu gràfic 2), una ràtio d'A260/280 superior a 3 (vegeu gràfic 3) i una ràtio d'A260/230 negativa (vegeu gràfic 4).

5.3. CONEIXEMENT DE LA TEMPERATURA IDÒNIA PERQUÈ LA PCR DONI LLOC - OPTIMITZACIÓ DE "PRIMERS"

Els resultats de l'optimització de "primers" són qualitatiu, és a dir, no són un número sinó que es mesura amb la intensitat d'una banda. Aquests resultats determinaran quina temperatura s'utilitza a la PCR.

Per un costat, es pot veure a la imatge 20, tots els ADNs bisulfitats han donat positiu i els ADNs no bisulfitats, que són els control, donen negatiu. Això significa que l'experiment ha

sortit com s’esperava, ja que només els BS ADNs són els que s’havien d’amplificar. En el cas que s’hagués amplificat alguna mostra d’ADN no bisulfitat, s’hauria de repetir l’experiment perquè voldria dir que hi ha hagut contaminacions.

Per l’altre costat també es pot veure que, de la zona IC1, la tanda de bandes de BS ADNs sotmeses a una temperatura de 53°C són les més intenses i que de la zona IC2 les més intenses són les sotmeses a 55°C. Això indica que la temperatura que s’utilitzarà a la PCR per la IC1 serà de 53°C i la de la IC2 serà 55°C (vegeu imatge 21).

5.4. OBTENCIÓ DE CÒPIES DE L’ADN BISULFITAT - REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

En el cas de la PCR, com en l’optimització de "primers", els resultats són qualitius. Només interessen per veure si l’ampliació de la zona IC2 s’ha portat a terme en totes les mostres.

Com es pot veure a la imatge, la majoria de mostres donen una banda grisa i, per tant, s’han amplificat correctament. Tot i això, hi ha algunes mostres que no en donen cap i, per tant, no ha augmentat el volum del BS ADN (vegeu imatges 21, 22 i 23). Això pot ser perquè la mostra s’hagi contaminat d’alguna altra substància o perquè els pouets de la placa no estaven ben tancats durant el termociclador i s’hagin evaporat les mostres.

5.5. ESTUDI DE LES CITOSINES METILADES – EpiTYPER

En tots els gràfics, les rodones petites representen cada mostra analitzada i la línia de tendència indica la tendència de la relació. Si el pendent de la recta és positiu (puja cap a la dreta) la relació és positiva entre les variables, si la recta no té pendent significatiu, vol dir que tampoc hi ha relació significativa entre les variables i, si el pendent és negatiu (la recta baixa cap a la dreta), la relació entre les variables és negativa.

A partir de la línia de tendència dels gràfics, es pot veure per una banda, que l’única correlació que té un pendent significatiu és entre l’increment de pes matern gestacional i el percentatge de la metilació mitjana de totes les CpGs dels gens relacionats amb la PWS (vegeu gràfica 6). La relació entre aquestes dues variables és negativa, ja que el pendent de la línia de tendències és negatiu. Això significa que com més pes guanyen les mares durant l’embaràs, menys metilats tenen els gens PWS i, per tant més expressió tenen aquests.

Per l'altra banda, es pot veure que, tot i que el gràfic de correlació de l'IMC (vegeu gràfic 5) té pendent, aquest no és significatiu i podria ser per atzar o que altres factors intervinguessin. Per tant, no es pot dir que hi hagi relació entre aquestes variables. Les línies de tendència dels gràfics de correlació amb el pes del nen al naixement, a l'any, als 6 anys de vida i l'IMC del nen als 6 anys, tenen un pendent pràcticament pla. Per tant, no es pot dir que hi hagi correlació amb aquestes variables.

CONCLUSIONS

L'objectiu global era estudiar la metilació dels gens implicats en la PWS en placenta d'embarassos normals. Com a objectius específics hi havia: conèixer els gens implicats en la PWS, extreure gens implicats en la PWS d'ADN de placenta d'embarassos normals, identificar la metilació dels gens per epiTYPER i determinar la correlació entre la metilació dels gens implicats en la PWS i problemes metabòlics materns i fetals.

Objectiu global: Estudiar la metilació dels gens implicats en la PWS en placenta d'embarassos normals.

- S'ha estudiat la metilació dels gens implicats en la PWS en placenta d'embarassos normals. S'ha vist que la correlació entre l'IMC de la mare (vegeu gràfic 5), el pes del nounat (vegeu gràfic 7), el pes del nadó a l'any (vegeu gràfic 8), el pes del nen als 6 anys de vida (vegeu gràfic 9), l'IMC del nen als 6 anys (vegeu gràfic 10) i la metilació dels gens PWS no és significativa i, per tant, podem concloure que l'obesitat pregestacional no influeix en la metilació dels gens PWS i que la metilació dels gens no té cap efecte en el pes del nen des del naixement fins als 6 anys de vida ni l'IMC als 6 anys.

Es pot dir que l'obesitat gestacional materna té relació amb la metilació dels gens PWS dels seus fills, ja que s'ha observat una correlació negativa (vegeu gràfic 6). Com més pes assoleixen les mares durant l'embaràs, menys metilats es troben els gens dels seus fills. D'aquesta manera l'expressió dels seus gens relacionats amb PWS tenen una expressió major i, per tant, aquests nens són més propensos a patir obesitat.

Objectiu específic 1: Conèixer els gens implicats en la PWS.

- S'han conegut els gens implicats en la PWS: són uns gens anomenats “imprinting” que es troben a la regió 15q11-q13 del cromosoma 15 regulats per l'IC (vegeu figura 3). Normalment, només són els gens provinents de la mare que es troben metilats i conseqüentment no s'expressen. La persona que pateix la malaltia té els dos gens dels dos progenitors metilats i, per tant tampoc té expressió genètica paterna d'aquesta regió.

Objectiu específic 2: Extreure ADN de placenta d'embarassos normals.

- S'han extret els gens implicats en la PWS a través d'un llarg procés que consisteix en obtenir ADN de mostres de placenta (extracció d'ADN), passar la cadena doble a una sola cadena on les citosines de les CpGs metilades es converteixen en uracils (bisulfitació) i, per últim, fer diverses còpies de la regió de PWS de la cadena i passant els uracils a timines.

Objectiu específic 3: Identificar la metilació de l'ADN dels gens implicats en la PWS mitjançant epiTYPER.

- Els gens implicats en la PWS s'han identificat per epiTYPER, un mètode que es porta a terme al CEGEN (Centro Nacional de Genotipado) que consisteix en una transcripció de l'ADN obtingut de la PCR, fragmentar aquest ARN pels punts on hi ha uracils i mesurar la massa molecular dels trossos per així obtenir un percentatge de metilació de cada CpG.

Per tant, la hipòtesi plantejada: “Diferències en els nivells de metilació placentària materna dels gens implicats en la PWS poden condicionar l'aparició d'obesitat infantil i trastorns de creixement en població normal.” no es pot rebutjar.

BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

Alemanya, C. i Carcolé, E. (s.d.). *Cosmolinux. Àcids nucleics 1er Batxillerat*. Recuperat de http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO1erBAT/Les_molecules_de_la_vida/Acids_nucleics/Acids_nucleics_2_DNA.pdf

Asociación Española del Síndrome de Prader Willi (AESPW). (2015). Recuperat de <http://www.aespw.org/sindrome-prader-willi/>

Associació Syndrom. (2003). *Síndrome de Prader Willi*. Recuperat de http://www.syndrom.org/sindromes/prader_willi.htm

Balaguer, F. i Moreira, L. (2010). *Nuevos métodos de diagnóstico molecular*, 9 (4), 165-171. Recuperat de <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2012/04/v9n4a619pdf001.pdf>

Bassols, J. (2017). *Epigenètica del desenvolupament*. Power point de Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Girona.

Caixàs, A., Corripio, R., Couto, Y., Gabau, E., Garcia, M., Giménez, O., Gullarte, M., Guitart, M., Larramona, H., Pérez, J., Esteba, S., Novell, R. i Brun, C. (s.d.). *Síndrome de Prader Willi*. Recuperat de <http://www.aespw.org/export/sites/aespw/.content/Documentos/25-PREGUNTAS-SPW.pdf>

Carrasco, P. (2016) *Síndrome de Prader Willi y Síndrome de Angelman. Caso Clínico: Neonato con hipotonía y criptorquidia*. Manuscrit inèdit, Centro de Genética Molecular Genetaq, Málaga.

CD Genomics. (2019). *EpiTYPER DNA Methylation Analysis*. Recuperat de <https://www.cd-genomics.com/EpiTYPER-ADN-Methylation-Analysis.html>

Chromosome 15. (2019, setembre 23). *Wikipedia*. Recuperat el 28 de setembre de 2019 de https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome_15

Cold Spring Harbor Laboratory Press. [Fotografia]. (2015). <https://www.cshl.edu>

Epigenètica. (2019, agost 22). *Wikipedia*. Recuperat el 12 de setembre de 2019 de https://es.wikipedia.org/wiki/Epigen%C3%A9tica#Modificaci%C3%B3n_de_histonas

- Geli, Júlia (2018). *Somriures malalts*. (Treball de Recerca). Institut Josep Brugulat.
- Granada, M. (2014). *¿Qué es hipotonía? Síntomas, cómo se diagnostica y cómo se trata*. Recuperat de <http://misaquitomagico.es/hipotonia-sintomas-diagnostico-tratamiento/>
- Hipogonadisme. (2015, novembre 8). En *Viquipèdia*. Recuperat el 10 de juliol de 2019 de <https://ca.wikipedia.org/wiki/Hipogonadisme>
- Horsthemke, B. i Buiting, K. (2006). *Imprinting defects on human chromosome 15*. Manuscrit inèdit, Department of Human genetics, Universitätsklinikum Essen, Essen (Alemanya).
- IdIBGi. (2005). *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona*. Recuperat de <http://www.idibgi.org/ca/content/presentaci%C3%B3>
- Impronta genètica. (2019, juliol 10). En *Wikipedia*. Recuperat el 12 de juliol de https://es.wikipedia.org/wiki/Impronta_gen%C3%A9tica
- Irizarry, K. A., Miller, M., Freemark, M. i Haqq, A. M. (2016). *Prader Willi Syndrome. Genetics, Metabolomics, Hormonal Function, and New Approaches to Therapy*. Manuscrit inèdit, Division of Pediatric Endocrinology and Duke University Medical Center, Durham (USA); Division of Pediatric Endocrinology, University of Alberta and Walter C. Mackenzie Health Science Center, Alberta (Canadà).
- Italo, B., Alberto, R., Aníbal, D., Luis, B., Karin, P., Pedro P. i María I. (Abril 2003). Surgical treatment of morbid obesity associated to Prader-Willi syndrome. Report of one case. *Revista médica de Chile*. 427-431. Recuperat de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872003000400011&script=sci_arttext
- Jimeno, A., Ugedo, L. i Rodríguez, S. (2016). *Biología 1r de Batxillerat: Sèrie Observa*. Barcelona: Santillana.
- Khan Academy. (2017a). *Mecanismos moleculares de la replicación del ADN*. Recuperat de <https://es.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-replication/a/molecular-mechanism-of-dna-replication>

Khan Academy. (2017). *Métodos de análisis de l'ADN. Electroforesis en gel*. Recuperat de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

Khan Academy. (2017b). *Métodos de análisis de l'ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Recuperat de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

Khan, M. J., Gerasimidis, K., Edwards, C. A. i Shaikh, M. G. (2018). *Mechanisms of obesity in Prader–Willi syndrome*. Manuscrit inèdit, Institute of Basic Medical Sciences, Khyber; Medical University, Peshawar (Pakistan); Human Nutrition, School of Medicine, College of Medical Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow (UK); Department of Endocrinology, Royal Hospital for Children, Glasgow (UK).

Linea y salud. (2009). *Estrabismo infantil u ojo vago en niños*. Recuperat de <https://www.lineaysalud.com/salud/bebes-y-ninos/estrabismo-ambliopia>

Metilació. (2019, juny 9). En *Wikipedia*. Recuperat el 12 de 2019 de https://es.wikipedia.org/wiki/Metilaci%C3%B3n_del_ADN

Overview of EpiTYPER Assay. [Imatge]. (2012). Recuperat de <http://agenabio.com/>

Peñuelas, N. (2015). *Epigenètica: Más que genética, un altre factor que ens determina*. (Treball de recerca). Recuperat de https://www.edubcn.cat/rcs_gene/treballs_recerca/2011-2012-07-2-TR.pdf

Placenta. (2019, setembre 18). En *Wikipedia*. Recuperat el 20 de setembre de 2019 de <https://en.wikipedia.org/wiki/Placenta>

Prader-Willi Syndrome. [Imatge]. (2017). Recuperat de <https://unabiologaenlacocina.wordpress.com/2017/07/19/sindrome-de-prader-willi-cuando-la-gula-es-un-sintoma-y-no-un-pecado/>

Suken, A. (2017). *Escoliosis*. Recuperat de <https://kidshealth.org/es/teens/scoliosis-esp.html>

Suzanne, B., Schwartz, S., Miller, J. i Driscoll, D. (2012). *Prader-Willi syndrome*. Manuscrit inèdit, American College of Medical Genetics, New York.

Tian, C. (2019). *Anterior Placenta during Pregnancy*. Recuperat de <https://parenting.firstcry.com/articles/anterior-placenta-during-pregnancy-all-you-need-to-know/>

Xargay, S. Procés de l'ADN des de l'extracció fins a la transcripció T7. [Imatge]. (s.d.).

ANNEXOS



1.GLOSSARI

1. Locus: Lloc on es troba un determinat gen.
2. Cromosomes somàtics: Tots aquells cromosomes de cèl·lules no sexuals (gàmetes).
3. Al·lel: Cada una de les formes representatives que pot tenir un gen.
4. Cèl·lula eucariota: Cèl·lula que té l'ADN delimitat dins un nucli.
5. Cèl·lula procariota: Cèl·lula que té l'ADN dispers pel citoplasma.
6. Cromatina: Filament d'ADN associat a histones per a ser més condensat i formar cromosomes.
7. Histones: Proteïnes sobre les quals s'enrotlla l'ADN formant la cromatina.
8. Traducció: Procés on es passa una cadena d'ARN a un pèptid. Prèviament hi ha hagut una transcripció on es passa l'ADN a ARN.
9. Polipèptid: Cadena d'aminoàcids. Diverses cadenes de polipèptids formen una proteïna.
10. Grup fosfat: Ió constituït de fòsfor i oxigen. La seva fórmula és PO_4^{3-} .
11. Enzim: Substrat format per proteïnes, el qual catalitza (accelera) reaccions químiques.
12. Desaminar: Separar un grup amino ($-NH_2$) d'un substrat.
13. Secreció: Procés d'elaboració i alliberament d'una substància.
14. Neuropeptid: Molècules petites semblants a les proteïnes que utilitzen les neurones per comunicar-se entre elles.
15. Homeòstasi energètica: Procés biològic el qual consisteix a controlar la ingesta de nutrients (entrada d'energia) i la despesa d'energia.
16. Insulina: Hormona encarregada de fer arribar als teixits la glucosa de la sang com a font d'energia.
17. Diabetis tipus II: Malaltia que es caracteritza per tenir alts nivells de sucre en sang (glucèmia) a causa de la incapacitat del cos de produir o utilitzar la insulina correctament. Es dona en adults.
18. Hipotàlem: Part del cervell que té un gran nombre de nuclis, cada un amb una funció diferent.
19. Glàndula pituïtària: Glàndula que es troba a la base del crani i connecta amb l'hipotàlem.
20. Deleció: Mutació genètica que consisteix en la manca d'una seqüència de nucleòtids d'un cromosoma.
21. Transcripció: Procés pel qual es passa d'una cadena d'ADN a una d'ARN.




2.PROTOCOLS DE LABORATORI

EXTRACCIÓ D'ADN

***Posar bany a 55°C abans de començar.**

- 1) Posar **15 mg de teixit** en un eppendorf 1.5ml.
- 2) Afegir 300µl de **Cell LysisSolution** a 4°C.
- 3) Afegir 2 µl de **Proteinase K** (stock 20mg/ml), barrejar invertint 25 vegades. El teixit s'ha de desenganxar bé del fons del tub, fer un cop sec si cal.
- 4) Incubar O/N a 55°C.

***Posar bany a 37°C abans de començar.**

- 5) Afegir 1.5µl de **RNase A** guardada en la nevera (stock 20mg/ml -el del kit Puregeneseria 4mg/ml-), barrejar **invertint 25 vegades.**
- 6) Incubar 20min a 37°C.
- 7) Refredar 1min a 4°C.
- 8) Afegir 100µl de **ProteinPrecipitationSolution** i **vòrtex 20sec** (vortejar cada 2-3 mostres).
- 9)  16000g, 10min. Reposar en gel per solidificar lípids.
- 10) En un tub net afegir el SBNT.
- 11) Posar-hi 300µl d'**Isopropanol** i invertir uns 50 cops cada tub just posat l'isopropanol.
- 12)  16000g, 1min.
- 13) Descartar el SBNT amb molta cura i assecar el pellet amb el tub invertit. *Compte que el pellet quedi al tub!
- 14) Afegir 300µl EtOH 70% i invertir per netejar el pellet.
- 15)  16000g, 1min.
- 16) Descartar el SBNT, assecar el tub invertit durant 15min. Aproximadament. Si no queda sec del tot treure les gotes restants amb la pipeta.
- 17) Afegir 25µl de la **DNA HydrationSolution**. Si el *pellet* és molt dens afegir una mica més de 25 µl.
- 18) Resuspendre'l 65°C durant 1h.
- 19) En agitació a 200rpm, RT O/N.
- 20) Mesurar absorbància al nanodrop.


BISULFITACIÓ

- 21) Preparar 1µg de DNA en 20µl totals (en aigua MilliQ RNase free a -20°C) en tubs de 0.2 ml de tap pla o placa 96p.
- 22) Preparar el *CT-conversionreagent*: **(*ÉS SENSIBLE A LA LLUM, utilitzar immediatament!!)**. Un cop restituït dura 1 mes aproximadament a -20°C.
- 1) Afegir al tub de *CT conversionreagent*(cada tub 10 mostres):
- 900µl d'aigua (Mili-Q RNase free)
 - 300µl M-dilution buffer
 - 50µl M-dissolving buffer
- 2) Barrejar i vòrtex freqüent durant 10min.
- 23) Preparar *M-Wash buffer*:
- 1) Afegir 96ml etanol 100% als 24 ml de *wash buffer concentrate*.
- 24) Posar 130µl de *CT-conversionreagent* a la mostra de DNA.
- 25) Desaminar a 50°C O/N (triga 16,5 h) al termociclador PCR System 2700 (user: ju, programa: bisulf)

!Mantenir les mostres tapades amb paper de plata fins nas 32

98°C	5min	}	16
95°C	30sec		
50°C	60min		
4°C	∞		

- 26) Reposar en gel 10 min, retolar les columnes i els tubs.
- 27) Posar 600µl de *M-Binding buffer* a la columna.
- 28) Afegir els 150µl de mostra a la columna, tancar i invertir varies vegades.
- 29) 16000g, 30sec i descartar el líquid.
- 30) Afegir 100µl *M-wash buffer*.
- 31) 16000g, 30sec i descartar el líquid.
- 32) Desulfonatar afegint 200µl *M-desulphonation buffer*.
- 33) Reposar 15-20min a RT tapat de la llum.
- 34) 16000g, 30sec.
- 35) Afegir 200µl *M-wash buffer*.
- 36) 16000g, 30sec. Descartar el líquid.
- 37) Afegir 200µl *M-wash buffer*.
- 38) 16000g, 30sec. Descartar el líquid.
- 39) 16000g, 30sec per assecar.
- 40) Eluir el DNA:
- a. Transferir la columna a un eppi d'1.5ml.

- b. Afegir 15µl d'**M-elution buffer**.
- c.  16000g, 30sec. Guardar a 4°C (menys de 2 dies) o a -80°C per llarga durada (i aliquotar).

41) Quantificar com a RNA al Nanodrop.

REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1) Preparar la PCR mix.

	Volum per mostra
DNA bisulfitat (5ng/ul)	4µL
MiliQ water	2.84µL
10x Hot Star Buffer	1µL
dNTP (25mM)	0.08µL
Fw primer (2µM)	1µL
Rv primer (2µM)	1µL
Hot star Polymerase	0.08µL

¡! Afegir per últim la polimerasa, fer vòrtex i spin.

- 2) Repartir 6µl de mix per mostra + 4 µl de DNA bisulfitat.
- 3) Afegir un blanc amb aigua enlloc de DNA bisulfitat.
- 4) Córrer PCR al termociclador(Aprox 2h):

PCR program:

PEDI_optimBS-PCR	
95º	15 min
95º	20 s
65º	30 s
72º	60 s
4 cycles	
95º	20 s
58º	30 s
72º	60 s
4 cycles	
95º	20 s
aTºC	30 s
72º	60 s
38 cycles	
72º	3 min
15 º	∞

Annealing T
PW_IC1
53ºC
PW_IC2

5) Córrer gel agarosa 1.5%:

- 2.25g agarosa + 150 ml TBE + 6µl Midori Green (afegir un cop dissolta l’agarosa i refredada sota l’aixeta)
- Carregar 0.5µl producte PCR + 4.5 µl d’aigua miliQ + 1 µl loading buffer (6x)
- Carregar 10µl marcador DNA ladder.
- Córrer 120V durant 45 min

3.DISSENY DE PLAQUES

BISULFITACIÓ

Taula 5. Placa mare de la bisulfitació.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	110	259	342	390	510	602	741	808				
B	156	264	344	396	518	649	755	834				
C	164	272	346	417	525	671	757	838				
D	198	294	353	425	540	680	759	880				
E	204	305	359	450	544	713	766	816				
F	221	312	364	468	563	717	767					
G	248	320	366	480	581	726	775					
H	251	321	369	483	585	738	788					

Nota: Taula que mostra el número de cada mostra d'ADN amb un volum de 20 µl i a una concentració de 50 ng/µl. (Font: cedit pels investigadors de l'IdIBGi)

Taula 6. Volums d'ADN i d'aigua perquè cada mostra de la placa mare de la PCR tingui un volum de 20 ul i una concentració de 50 ng/ul.

Núm estudi	[DNA]ng/ul	1ug DNA	Volum fins 20uL
110	516,7	1,9	18,1
156	542,7	1,8	18,2
164	888,79	1,1	18,9
198	483,51	2,1	17,9
204	468,4	2,1	17,9
221	393,57	2,5	17,5
248	559,8	1,8	18,2
251	178,2	5,6	14,4
259	968,42	1,0	19,0
264	238,81	4,2	15,8
272	1624,58	0,6	19,4
294	397	2,5	17,5
305	477,9	2,1	17,9
312	359,9	2,8	17,2
320	538,6	1,9	18,1
321	660,1	1,5	18,5
342	409,3	2,4	17,6
344	1041,28	1,0	19,0
346	619,45	1,6	18,4
353	443,71	2,3	17,7
359	332	3,0	17,0
364	234,98	4,3	15,7
366	549,4	1,8	18,2
369	643,2	1,6	18,4
390	432,3	2,3	17,7
396	531,2	1,9	18,1
417	206,93	4,8	15,2
425	1457,29	0,7	19,3

450	192,9	5,2	14,8
468	466,34	2,1	17,9
480	462,6	2,2	17,8
483	691,8	1,4	18,6
510	381,6	2,6	17,4
518	673,2	1,5	18,5
525	728,2	1,4	18,6
540	1244,17	0,8	19,2
544	777,3	1,3	18,7
563	953,87	1,0	19,0
581	856	1,2	18,8
585	715,6	1,4	18,6
602	478,14	2,1	17,9
649	752,4	1,3	18,7
671	739,56	1,4	18,6
680	397,12	2,5	17,5
713	305,6	3,3	16,7
717	751,44	1,3	18,7
726	507,15	2,0	18,0
738	329,7	3,0	17,0
741	342,79	2,9	17,1
755	468,75	2,1	17,9
757	477,1	2,1	17,9
759	626,59	1,6	18,4
766	547,6	1,8	18,2
767	1177,4	0,8	19,2
775	310,1	3,2	16,8
788	247,79	4,0	16,0
808	780,68	1,3	18,7
834	402	2,5	17,5
838	1038,84	1,0	19,0
880	922,37	1,1	18,9
816	1036,93	1,0	19,0

(Font: cedida pels investigadors de l'IdIBGi)

OPTIMITZACIÓ DE “PRIMERS”

Taula 7. Placa de l’optimització de “primers”.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont	Neg cont
B	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1
C	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2
D	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
G												
H												
	53	53	55	55	55	55	57	57	57	57	59	59

Nota: Taula que mostra la temperatura a la qual es sotmet cada columna de l’optimització de la zona IC1 (vermell) i IC2 (groc). (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

Taula 8. Placa mare de la PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	110	259	342	390	510	602	741	808				
B	156	264	344	396	518	649	755	834				
C	164	272	346	417	525	671	757	838				
D	198	294	353	425	540	680	759	880				
E	204	305	359	450	544	713	766	816				
F	221	312	364	468	563	717	767					
G	248	320	366	480	581	726	775					
H	251	321	369	483	585	738	788					

Nota: Placa base amb 20 ul de DNA bisulfitat a 5 ng/ul. (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

Taula 9. Volums de BS ADN i d'aigua perquè cada mostra de la placa mare de la PCR tingui un volum de 20 ul i una concentració de 5 ng/ul.

Núm estudi	Concentració [bDNA]	Volum per a 5ng bDNA	Volum Aigua
110	107,71	0,9	19,1
156	38,04	2,6	17,4
164	37,48	2,7	17,3
198	77,95	1,3	18,7
204	24,55	4,1	15,9
221	30,72	3,3	16,7
248	28,25	3,5	16,5
251	126,86	0,8	19,2
259	12,75	7,8	12,2
264	44,58	2,2	17,8
272	34,81	2,9	17,1
294	52,09	1,9	18,1
305	21,09	4,7	15,3
312	23,97	4,2	15,8
320	43,67	2,3	17,7
321	70,16	1,4	18,6
342	93,22	1,1	18,9
344	50	2,0	18,0
346	32,32	3,1	16,9
353	63,9	1,6	18,4
359	174,88	0,6	19,4
364	59,26	1,7	18,3
366	25,18	4,0	16,0
369	78,29	1,3	18,7
390	18,92	5,3	14,7
396	10,96	9,1	10,9
417	47,6	2,1	17,9
425	39,21	2,6	17,4
450	734,27	0,1	19,9
468	61,3	1,6	18,4
480	28,24	3,5	16,5
483	31,23	3,2	16,8
510	167,32	0,6	19,4
518	26,45	3,8	16,2
525	117,36	0,9	19,1
540	30,53	3,3	16,7
544	59,57	1,7	18,3
563	30,17	3,3	16,7
581	63,26	1,6	18,4
585	103,23	1,0	19,0
602	54,66	1,8	18,2
649	28,48	3,5	16,5
671	39,09	2,6	17,4
680	77,31	1,3	18,7
713	47,22	2,1	17,9
717	47,09	2,1	17,9

726	60,55	1,7	18,3
738	31,42	3,2	16,8
741	119,74	0,8	19,2
755	56,03	1,8	18,2
757	38,79	2,6	17,4
759	67,77	1,5	18,5
766	215,55	0,5	19,5
767	39,97	2,5	17,5
775	166,94	0,6	19,4
788	65,48	1,5	18,5
808	59,09	1,7	18,3
834	37,32	2,7	17,3
838	67,38	1,5	18,5
880	41,41	2,4	17,6
816	31,87	3,1	16,9

(Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

Taula 10. Placa filla 1 PCR.

	PLACA 1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	110	110	110	259	259	259	342	342	342	390	390	390
B	156	156	156	264	264	264	344	344	344	396	396	396
C	164	164	164	272	272	272	346	346	346	417	417	417
D	198	198	198	294	294	294	353	353	353	425	425	425
E	204	204	204	305	305	305	359	359	359	450	450	450
F	221	221	221	312	312	312	364	364	364	468	468	468
G	248	248	248	320	320	320	366	366	366	480	480	480
H	251	251	251	321	321	321	369	369	369			Aigua

Nota: Placa amb tres repeticions de cada mostra bisulfitada de la placa mare. (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

Taula 11. Placa filla 2 PCR.

	PLACA 2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	483	483	483	585	585	585	738	738	738	788	788	788
B	510	510	510	602	602	602	741	741	741	808	808	808
C	518	518	518	649	649	649	755	755	755	834	834	834
D	525	525	525	671	671	671	757	757	757	838	838	838
E	540	540	540	680	680	680	759	759	759	880	880	880
F	544	544	544	713	713	713	766	766	766	816	816	816
G	563	563	563	717	717	717	767	767	767			
H	581	581	581	726	726	726	775	775	775			Aigua

Nota: Placa amb tres repeticions de cada mostra bisulfitada de la placa mare. (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

4.TAULES DE RESULTATS

EXTRACCIÓ D’ADN

Taula 12. Resultats de la quantificació d’ADN.

Núm estudi	[DNA]ng/ul
110	516,7
156	542,7
164	888,79
198	483,51
204	468,4
248	559,8
251	178,2
259	968,42
264	264,3
272	1624,58
294	397
305	477,9
312	359,9
320	538,6
321	660,1
342	409,3

359	332
366	549,4
369	643,2
390	432,3
396	531,2
417	381,2
450	192,9
468	466,34
480	462,6
483	691,8
510	381,6
518	673,2
525	728,2
540	1244,17
544	777,3
563	953,87

Nota: Concentració en ng/ul de cada mostra. (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)

BISULFITACIÓ

Taula 13. Resultats de la quantificació les primeres i segones bisulfitacions.

Número d'estudi	Primera Quantificació	A260/280	A260/230	Repetició Quantificació	Repetició A260/280	Repetició A260/230
110	107,71	2,25	1,84			
156	38,04	2,11	1,9			
164	37,48	2,12	3,26			
198	77,95	2,24	2,42			
204	24,55	2,34	1,35			
221	30,72	2,13	1,89			
248	28,25	2,06	2,24			
251	126,86	2,13	1,95			
259	10,7	2,1	0,26	12,75	1,89	2,05
264	44,58	2,17	1,58			

272	34,81	2,29	3,67			
294	3,9	1,81	1,63	52,09	2,24	3,15
305	21,09	2,34	2,11			
312	23,97	2,3	2,12			
320	43,67	2,26	3,13			
321	15,86	2,2	2,2	70,16	2,21	2,72
342	93,22	2,31	3,13			
344	50	2,33	3,25			
346	32,32	2,38	2,65			
353	63,9	2,35	3,01			
359	174,88	2,31	3,3			
364	59,26	2,11	1,05			
366	25,18	2,23	2,89			
369	78,29	2,29	1,63			
390	18,92	2,6	0,86			
396	10,96	2,62	0,94			
417	47,6	2,28	3,17			
425	39,21	2,17	1,14			
450	734,27	2,36	2,94			
468	61,3	2,32	3,16			
480	28,24	2,26	2,81			
483	31,23	2,31	3,58			
510	167,32	2,31	3,1			
518	26,45	2,29	1,43			
525	117,36	2,32	3,22			
540	30,53	2,28	3,32			
544	0,55	10,58	-0,37	59,57	2,17	2,33
563	30,17	2,4	1,89			
581	63,26	2,26	2,82			
585	103,23	2,28	3,3			
602	54,66	2,29	2,88			

649	28,48	2,28	2,48			
671	39,09	2,11	1,8			
680	77,31	2,27	2,65			
713	47,22	2,33	3,24			
717	47,09	2,36	3,81			
726	60,55	2,37	3,64			
738	31,42	2,16	3,57			
741	119,74	2,34	3,3			
755	56,03	2,25	3,46			
757	38,79	2,34	3,84			
759	67,77	2,27	3,46			
766	215,55	2,31	3,3			
767	39,97	2,26	3,28			
775	166,94	2,3	3,03			
788	65,48	2,3	3,59			
808	59,09	2,17	2,33			
816	31,87	2,65	1,12			
834	37,32	2,21	3,56			
838	67,38	2,3	3,48			
880	41,41	2,36	3,47			

Nota: Concentració, puresa A269/280 i A260/230. Els nombres vermells volen dir que s’ha repetit la bisulfitejació d’aquella mostra. (Font: cedida pels investigadors de l’IdIBGi)