

Títol del treball: Marques epigenètiques del desenvolupament prenatal

Estudiant: Anna Roca Molas

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1928601@campus.udg.edu

Tutor: José-Luís García-Marín

Cotutor: Sílvia Xargay-Torrent

Empresa/institució: IdibGi – Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta

Vistiplau tutor(i cotutor):

Nom tutor: José-Luís García-Marín

Nom del cotutor: Sílvia Xargay-Torrent

Empresa/institució: IdibGi – Institut d'Investigació
Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta

Correu (s) electrònic (s):

jose-luis.garcia@udg.edu

sxargay@idibgi.org

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 20 de juliol de 2017

RESUM

L'epigenètica ha estat implicada en la relació entre la sobrenutrició materna i el desenvolupament fetal. La placenta és un teixit transitori que regula la funció endocrinometabòlica i el desenvolupament del fetus. En la funció de la placenta i el creixement fetal hi tenen un paper clau els gens d'impressió genètica, regulats a través de metilació de l'ADN. Entre els gens impresos en placenta, s'hi troben els clústers gènics *DLK1-DIO3* i *C19MC*. En aquest context, els objectius del treball han estat: (I) estudiar la metilació de l'ADN de *DLK1-DIO3* i *C19MC* en placenta; i (II) estudiar l'associació de la metilació d'aquests gens amb paràmetres antropomètrics i endocrinometabòlics de les gestants i dels respectius nadons.

Per tal d'assolir els objectius, es va estudiar una cohort de 60 parelles embarassada-nadó de la regió de l'Alt Empordà amb dades clíniques disponibles. A partir de la placenta es va extreure l'ADN, es va bisulfitar i es va amplificar la regió d'interès amb encebadors específics per a ADN bisulfitat. El producte resultant es va pirosequenciar per quantificar el percentatge de metilació de cada CpG. Els resultats es van analitzar estadísticament amb el software SPSS i es va establir un nivell de significació de $p=0.05$.

No es van trobar diferències significatives del perfil de metilació de les regions estudiades de *DLK1-DIO3* i *C19MC* en els 4 grups d'estudi (grup (1) control comparat amb (2) obesitat pregestacional amb obesitat gestacional, (3) obesitat pregestacional i (4) obesitat gestacional). No obstant això, el percentatge de metilació de *DLK1-DIO3* va correlacionar positivament amb la tensió arterial i l'hemoglobina glicosilada (HbA1C) de la mare, mentre que la metilació de *C19MC* es va associar als nivells materns d'insulina, triglicèrids i colesterol total. Pel que fa als respectius nadons, no es van trobar relacions significatives. Després de corregir per comparacions múltiples, el colesterol total es va mantenir associat amb el grau de metilació en *C19MC* ($r=0.624$; $p=0.004$). En una anàlisi multivariant de regressió lineal, el colesterol total matern correlacionava de forma independent amb el percentatge de metilació de *C19MC*, explicant un 43% de la variància ($\beta=0.682$; $p=0.001$).

En conclusió, el colesterol total matern i el grau de metilació de *C19MC* en placenta es troben relacionats, i com a conseqüència podrien afectar el desenvolupament endocrinometabòlic fetal.

RESUMEN

La epigenética ha sido implicada en la relación entre la sobrenutrición materna y el desarrollo fetal. La placenta es un tejido transitorio que regula la función endocrinometabólica y el desarrollo del feto. En la función de la placenta y el crecimiento fetal, tienen una función clave los genes impronta, regulados a través de la metilación del ADN. Dentro de los genes imprintados en placenta, se encuentran los clústeres génicos *DLK1-DIO3* y *C19MC*. En este contexto, los objetivos del trabajo han sido: (I) estudiar la metilación del ADN de *DLK1-DIO3* y *C19MC* en placenta; y (II) estudiar la asociación de la metilación de estos genes con parámetros antropométricos y endocrinometabólicos de las gestantes y de sus respectivos hijos.

Para alcanzar los objetivos, se estudió una cohorte de 60 parejas de embarazada-hijo de la región del Alt Empordà con datos clínicos disponibles. A partir de la placenta se extrajo el ADN, se bisulfató y amplificó la región de interés con cebadores específicos para ADN bisulfitado. El producto resultante se pirosecuenció, donde se determinó el porcentaje de metilación de cada CpG. Los resultados se analizaron estadísticamente con el software SPSS y se estableció un nivel de significación de $p=0.05$.

No se encontraron diferencias significativas en el perfil de metilación de las regiones estudiadas de *DLK1-DIO3* y *C19MC* en los 4 grupos de estudio (grupo (1) control comparado con (2) obesidad pregestacional con gestacional, (3) obesidad pregestacional y (4) obesidad gestacional). Sin embargo, el porcentaje de metilación de *DLK1-DIO3* se correlacionó positivamente con la tensión arterial y la hemoglobina glicosilada (HbA1C) de la madre, mientras que la metilación de *C19MC* se asoció a los niveles maternos de insulina, triglicéridos y colesterol total. En lo que hace referencia a los respectivos hijos, no se encontraron relaciones significativas. Después de corregir por comparaciones múltiples, el colesterol total se mantuvo asociado con el grado de metilación en *C19MC* ($r=0.624$; $p=0.004$). En un análisis multivariante de regresión lineal, el colesterol total materno correlacionaba de forma independiente con el porcentaje de metilación de *C19MC*, explicando un 43% de la varianza ($\beta=0.682$; $p=0.001$).

En conclusión, el colesterol total materno y el grado de metilación de *C19MC* en placenta se encuentran relacionados, y como consecuencia podrían afectar el desarrollo endocrinometabólico fetal.

ABSTRACT

Epigenetics has been involved in the relationship between maternal overnutrition and fetal development. The placenta is a transitory tissue that regulates the endocrinometabolic functions and development of the fetus. Imprinted genes have an important role in the function of the placenta and fetal growth, and are regulated through DNA methylation. Among the imprinted genes in placenta there are the gene clusters *DLK1-DIO3* and *C19MC*. In this context, the objectives of the study were: (I) to study the DNA methylation of *DLK1-DIO3* and *C19MC* in placenta; and (II) to study the association between the methylation of these genes and the anthropometric and endocrinometabolic parameters of pregnant women and their respective children.

In order to achieve the objectives, a cohort of 60 pairs of pregnant woman-child from the region of Alt Empordà was studied with available clinical data. DNA was extracted from the placenta, bisulfited and the region of interest was amplified with specific primers for bisulfited DNA. The obtained product was pyrosequenced to quantify the percentage of methylation of each CpG. The results were statistically analyzed with SPSS software and significance level was set at $p=0.05$.

No significant differences were found regarding the methylation profile of the studied regions of *DLK1-DIO3* and *C19MC* when comparing the 4 study groups (control (1) group compared with (2) pregestational with gestational obesity, (3) pregestational obesity and (4) gestational obesity). However, the percentage of methylation of *DLK1-DIO3* positively correlated with maternal blood pressure and glycated hemoglobin (HbA1C), whereas the methylation in *C19MC* was associated with maternal insulin, triglycerides and total cholesterol. Regarding their respective children, no significant relationships were found. After correcting for multiple testing, total maternal cholesterol was still associated with the methylation level of *C19MC* ($r=0.624$; $p=0.004$). In a multivariate linear regression test, maternal total cholesterol correlated independently with the *C19MC* methylation percentage, explaining a 43% of the variance ($\beta=0.682$; $p=0.001$).

In conclusion, maternal total cholesterol and the methylation level of *C19MC* in placenta are related, and as a consequence they could affect fetal endocrinometabolic development.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1. NUTRICIÓ PRENATAL I PROGRAMACIÓ METABÒLICA.....	6
1.2. L'EPIGENÈTICA I LA NUTRICIÓ PRENATAL	7
1.3. METILACIÓ EN PLACENTA COM A PROGRAMADOR METABÒLIC.....	8
1.3.1. <i>DLK1 – DIO3</i>	10
1.3.2. <i>C19MC</i> , CLÚSTER DE MICROARNS DEL CROMOSOMA 19	11
1.4. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI.....	12
2. OBJECTIUS.....	12
3. METODOLOGIA.....	12
3.1. POBLACIÓ D'ESTUDI	12
3.2. VARIABLES CLÍNiques I ANALÍTiques	13
3.3. IMPLICACIONS ÈTIQUES I DE SOSTENIBILITAT.....	14
3.4. ESTUDI DE METILACIÓ DE L'ADN.....	14
3.4.1. EXTRACCIÓ D'ADN EN PLACENTA.....	15
3.4.2. BISULFITACIÓ DE L'ADN.....	15
3.4.3. PCR D'ADN BISULFITAT (BS-PCR).....	16
3.4.4. PIROSEQÜENCIACIÓ	18
3.5. ANÀLISI DE LES DADES.....	20
4. RESULTATS.....	21
4.1. VARIABLES ENDOCRINOMETABÒLIQUES I ANTROPOMÈTRIQUES EN ELS GRUPS D'ESTUDI.....	21
4.2. NIVELLS DE METILACIÓ D'ADN DE <i>DLK1-DIO3</i> I <i>C19MC</i> EN ELS GRUPS D'ESTUDI	23
4.3. ASSOCIACIONS ENTRE ELS NIVELLS DE METILACIÓ DE L'ADN I LES VARIABLES ENDOCRINOMETABÒLIQUES I ANTROPOMÈTRIQUES	23
5. DISCUSSIÓ.....	25
6. CONCLUSIONS	27
BIBLIOGRAFIA	28

1. INTRODUCCIÓ

1.1. NUTRICIÓ PRENATAL I PROGRAMACIÓ METABÒLICA

La nutrició inadequada durant l'embaràs té conseqüències a llarg termini per la descendència, predisposant o "programant" el fetus per al desenvolupament de malalties metabòliques, tals com l'obesitat i diabetis tipus 2, en edat adulta (Desai *et al.* 2015). Aquest procés es coneix amb el nom de programació metabòlica.

El període de fam que va tenir lloc a Alemanya en el 1944-1945 va oferir l'oportunitat de determinar els efectes de la malnutrició perinatal. Els nadons de les mares exposades a la fam durant els dos primers trimestres d'embaràs tenien menor pes al naixement i paradoxalment una major incidència d'obesitat que la població general. En particular, els infants que tenen un pes al naixement baix i un creixement recuperador amb un increment de pes excessivament ràpid en els primers anys de vida, conegut com a "catch-up", tenen un elevat risc de patir obesitat i síndrome metabòlica en edat adulta (Desai *et al.* 2015). La síndrome metabòlica és diagnosticada quan almenys tres dels següents trastorns són presents en un individu: hipertensió arterial, elevats nivells de glucosa en sang, acumulació de greix abdominal, inflamacions sistèmiques, elevats nivells de triglicèrids i una disminució de lipoproteïnes d'alta densitat conegudes popularment com a colesterol del "bo" (Amihăesei & Chelaru 2014).

Per altra banda, la sobrenutrició materna i/o el guany de pes durant l'embaràs estan associats a un elevat pes al naixement, i un increment de patir obesitat i diabetis en edat adulta (Desai *et al.* 2015). El guany total de pes durant l'embaràs depèn considerablement de cada dona i es troba relacionat amb el nombre de fetus, l'ètnia, l'edat materna o la paritat. Així, s'estableixen les categories d'obesitat pregestacional o d'obesitat gestacional, quan l'índex de massa corporal (IMC) de la mare previ a l'embaràs és superior a 24,9 Kg/m², o quan el guany de pes durant l'embaràs és superior al rang normal, respectivament (Rasmussen & Yaktine 2009). Diversos estudis han trobat associacions positives entre el guany de pes gestacional i l'adipositat de la descendència en la infància, en l'adolescència i en edat adulta demostrant els efectes en la programació metabòlica de la sobrenutrició materna durant la gestació (Lawlor *et al.* 2012).

Així, s'observa una clara relació entre la nutrició prenatal, el pes al naixement i els problemes metabòlics en l'edat adulta (Desai *et al.* 2015; *Figura 1*).

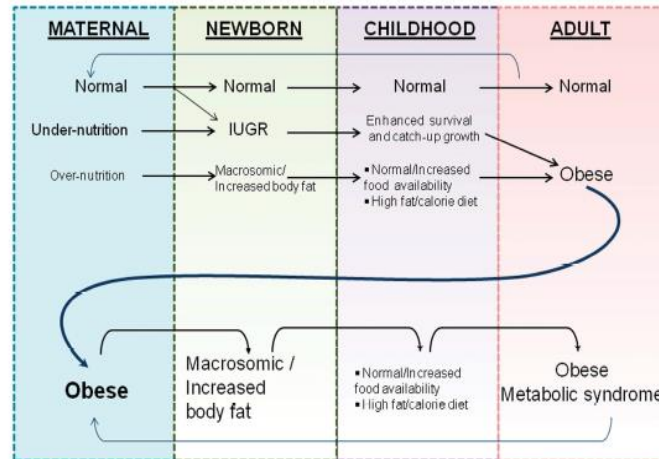


Figura 1: El paper de la programació metabòlica en la població respecte a la nutrició gestacional. Les mares que acostumen a tenir un pes normal tenen un infant amb un perfil de pes normal. L'augment de prematurs i la restricció de creixement intrauterí (IGUR *en la figura*) com a conseqüència de la desnutrició conjuntament amb una elevada supervivència neonatal i una posterior exposició de la dieta occidental, ha resultat un augment de la incidència de l'obesitat. Les mares amb fenotip obès tenen descendents amb elevat índex de greix corporal i major risc d'obesitat i síndrome metabòlica. **Font:** Desai *et al.* 2015

1.2. L'EPIGENÈTICA I LA NUTRICIÓ PRENATAL

Tot i que el genoma d'un individu és estable, l'epigenoma té el potencial de ser modificat de manera reversible per l'exposició de factors ambientals i nutricionals (Waterland 2014). El fenomen de l'epigenètica és una característica essencial en el desenvolupament dels mamífers que provoca canvis persistents i heretables en l'expressió dels gens sense alterar la seqüència de l'ADN. Això, pot tenir lloc per diferents mecanismes: (1) l'addició de grups metil en la seqüència de l'ADN conegut com a metilació, (2) la modificació post-transcripcional d'histones o (3) la regulació transcripcional i post-transcripcional per ARN no codificant (ARNnc). Les marques epigenètiques poden alterar l'accessibilitat de la maquinària transcripcional en un promotor gènic - com és el cas de la metilació de l'ADN o les modificacions d'histones - o degradar l'ARN missatger (ARNm) i impedir la seva traducció, com els ARNnc. D'aquesta manera, poden activar o inactivar determinants gens d'una cèl·lula en un determinant moment (Desai *et al.* 2015).

La metilació de l'ADN és el mecanisme més ben conegut que té lloc a les citosines adjacents de guanines, que sovint es troben en alta freqüència en regions conegudes com a illes CpG. Aquest mecanisme consisteix l'addició de grups metil en una citosina, anell de pirimidina de cinc carbonis, i com a resultat s'obté la formació de 5'-metil-citosina en l'ADN (Figura 2). Aquest grup metil prové del donador universal de grups metil conegut com a S-adenosilmetionina (SAM). En humans, la font principal de grups metil prové de la dieta (Chango & Pogribny 2015). Les ADN metiltransferases són tres enzims molt conservats (DNMT1, DNMT3A i DNMT3B) responsables d'afegir i mantenir els grups metil en una molècula. La metilació d'un o més dinucleòtids CpG en els promotors gènics pot permetre la modificació de la unió o el bloqueig dels factors de transcripció de determinats gens (Medvedeva *et al.* 2014).

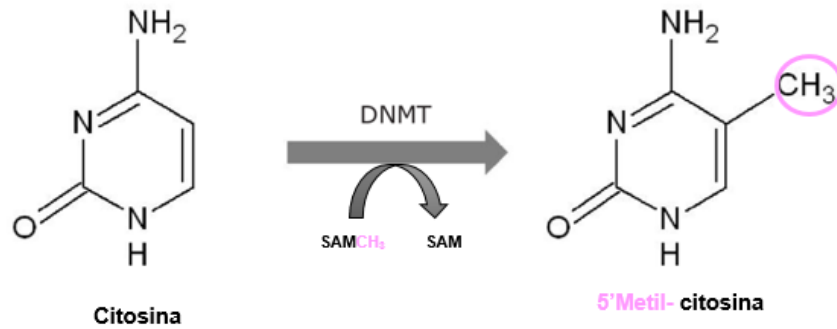


Figura 2: Representació esquemàtica de la conversió de la citosina a 5'metil-citosina per acció de les metiltransferases d'ADN (DNMT). SAM: S-adenosilmetionina.

La nutriepigenòmica és un camp emergent de recerca que es basa en la interacció entre la nutrició i l'epigenoma (Burdge & Lillycrop 2014). Les condicions nutricionals poden interferir en l'epigenoma, per exemple, en la disponibilitat de grups metils per la formació de SAM-CH₃. Hi ha evidències que factors nutricionals i ambientals poden interactuar amb el genotip modulant les marques epigenètiques amb un gran impacte en el fenotip (Desai *et al.* 2015). La deficiència de grups metil a causa d'una dieta inadequada i altres factors en l'estil de vida com podria ser alcohol, tabac o estrès, poden provocar canvis globals o específics en la metilació de l'ADN (Chango & Pogribny 2015). Wolf *et al.* 1998 va publicar que les femelles de ratolí amb pelatge negre alimentades amb dietes suplementades amb grups metil (àcid fòlic, vitamina B12, betaïna i colina) canvien la regulació epigenètica de l'expressió del gen agoutí en la descendència. Aquest estudi mostra que la dieta materna és important per l'epigenoma de la descendència. Altres estudis han confirmat aquesta hipòtesi i han trobat que modificant la dieta materna, per exemple amb una dieta deficient en proteïnes o amb alt contingut lipídic, s'indueixen canvis en el perfil de metilació de l'ADN de la descendència (Altobelli *et al.* 2013; Yu *et al.* 2015).

1.3. METILACIÓ EN PLACENTA COM A PROGRAMADOR METABÒLIC

La placenta té funcions molt importants en el desenvolupament del fetus, entre d'altres: proporcionar una interferència immunològica entre la mare i el fetus, servir de transport de nutrients i de productes de desfeita entre la mare i el fetus, i ser una font de pèptids i hormones esteroides que tenen influència sobre el metabolisme i desenvolupament fetal, placentar i maternal. De manera que, el desenvolupament fetal ve determinat per les funcions de la placenta (Fernandez-Twinn & Ozanne 2010). Unes condicions intrauterines adverses poden alterar l'expressió gènica de la placenta i subseqüentment funcions que resulten en una alteració del creixement de l'infant, i un augment de la incidència de patir malalties metabòliques i/o cardiovasculars (Seki *et al.* 2012).

Els canvis en l'expressió gènica de la placenta produïts per les condicions intrauterines ambientals poden ser atribuïts a alteracions epigenètiques. Utilitzant models animals s'ha suggerit que alteracions en el patró de metilació poden conduir a una morfologia adversa de la placenta i problemàtiques en el naixement (Serman *et al.* 2007). Diversos estudis han relacionat la restricció del creixement intrauterí amb les alteracions epigenètiques de la placenta, incloent-hi canvis en la metilació de l'ADN de gens implicats en la regulació del creixement i del desenvolupament (Banister *et al.* 2011; Diplas *et al.* 2009). En humans, per exemple, una alteració en el perfil de metilació en les regions de control de l'expressió del clúster de gens *H19/IGF2* en la placenta, ha estat relacionat amb restricció del creixement intrauterí (Bourque *et al.* 2010).

El clúster gènic *H19/IGF2* forma part d'una sèrie de gens relacionats amb el creixement i desenvolupament prenatals que es troben regulats epigenèticament en placenta, coneguts com els gens d'impressió genètica. La impressió genètica és un fenomen epigenètic complex. Els gens d'impressió són gens expressats monoal·lèlicament i la seva expressió depèn de l'origen parental (Monk 2015). L'estat de transcripció dels al·lells d'impressió és estrictament determinat pel gènere de la línia parental del qual és heretat. Per exemple, per un locus en concret l'al·lel paternal és transcripcionalment actiu alhora que l'al·lel matern es troba silenciada de forma epigenètica.

Molts dels loci d'aquests gens d'impressió genètica comparteixen característiques comunes en temes d'organització genòmica, funcions fisiològiques i regulacions epigenètiques, la qual cosa facilita la seva identificació (Edwards & Ferguson-Smith 2007). En primer lloc, els gens d'impressió genètica tendeixen a trobar-se en grans dominis cromosòmics. En segon lloc, els gens d'impressió genètica tenen un paper important en el creixement prenatal de l'embrió i/o la placenta, la regulació de rutes metabòliques i funcions en el cervell. En tercer lloc, l'activació o el silenciament d'aquests al·lells impresos dins d'un clúster gènic és coordinat des de regions allunyades conegudes com a elements de control d'impressió (ICR; *imprinting control regions*) mitjançant modificacions epigenètiques. Aquestes regions tenen una metilació específica segons el gènere de la línia germinal. La metilació de l'ADN en els elements de control d'impressió regula la seva expressió. Finalment, els gens d'impressió genètica freqüentment presenten una regió secundària diferencialment metilada, coneguda com a DMRs (*Differentially methylated region*), establerta després de la fertilització (Edwards & Ferguson-Smith 2007). Entre els gens d'impressió genètica s'hi troben el domini de gens *DLK1-DIO3* i el clúster de microARNs del cromosoma 19.

1.3.1. *DLK1 – DIO3*

El domini *DLK1-DIO3* es localitza en el cromosoma 14 i la seva expressió és principalment regulada per una regió ICR control d'impressió coneguda com a IG-DMR (Lin *et al.* 2003; *Figura 3*). El domini *DLK1-DIO3* en els mamífers placentals conté els gens que codifiquen per *Delta-like homologue 1 (DLK1)*, *retrotransposon-like gene 1 (RTL1/ MART1)*, *deiodinase type 3 (DIO3)* i varis microARNs (Da Rocha *et al.* 2008). El gen *DKL1* codifica per una glicoproteïna transmembrana i participa en la diferenciació cel·lular. *In vivo*, s'ha descrit com a inhibidor de l'adipogènesi. *RTL1*, ha perdut l'habilitat de ser autònomament retrotransposat i s'expressa principalment durant els estadis embrionaris en alguns teixits i en la placenta. El gen *DIO3* codifica per la iodotirosina desiodinasa 3 (D3), un enzim que catalitza la desiodació de les hormones tiroidees, T3 i T4, que donarà lloc als metabòlits inactius T2 i T3 respectivament. Aquest enzim permet desenvolupar protecció a l'organisme contra un excés d'hormones tiroidees (Da Rocha *et al.* 2008).

En models de ratolí s'han descrit disfuncions metabòliques relacionades amb el domini *DLK1-DIO3*. Per exemple, el gen *DLK1* afecta l'acumulació de teixit adipós i el metabolisme de la glucosa en adults (Lee *et al.* 2003). A més a més, s'ha vist que el ratolí *DKL1 null* (amb el gen *DLK1* no funcional), desenvolupa una obesitat moderada en una dieta normal però, comparat amb el salvatge, té un 30% d'augment en l'acumulació del teixit adipós blanc en una dieta rica en greix. Aquest ratolí, a més, desenvolupa hipotiroïdisme en edat adulta (Moon *et al.* 2002).



Figura 3: Representació esquemàtica del domini *DLK1-DIO3*.

En humans, la regió IG-DMR és metilada diferencialment i s'han identificat deleccions i mutacions epigenètiques en el domini *DLK1-DIO3* indicant que aquest element actua com a una regió control d'impressió genètica (Edwards *et al.* 2008). La regió reguladora IG-DMR és metilada durant l'espermatogènesi, en canvi, es manté no metilada en la línia germinal materna. Per tant, l'expressió d'aquest domini és determinada per l'al·lel matern (Edwards *et al.* 2008).

1.3.2. C19MC, CLÚSTER DE MICROARNS DEL CROMOSOMA 19

Els microARNs pertanyen a la família dels ARNs petits no codificants (ARNnc) que regulen l'expressió gènica a nivell post-transcripcional degradant l'ARNm o bloquejant-ne la seva transcripció. Aquestes molècules són crítiques en el desenvolupament, proliferació, comunicació i mort cel·lular, així com en la diferenciació i en el manteniment de la identitat tissular (Huang *et al.* 2011). S'han descrit alteracions en els microARNs en una varietat de malalties humanes, com per exemple, malalties cardiovasculars o càncers (Thum *et al.* 2008; Liz & Esteller 2016). Alguns estudis també suggereixen que els microARNs poden tenir un paper diagnòstic en patologies associades a l'embaràs (Pineles *et al.* 2007; Kotlabova *et al.* 2011).

El clúster de microARNs *C19MC* es troba en el cromosoma 19 a la regió q13.41 (Figura 4). Aquest clúster només s'expressa en placenta, on és expressat l'al·lel heretat del pare. El promotor d'aquest clúster es troba en una regió rica en CpG i està metilat en l'al·lel matern (Noguer-Dance *et al.* 2010). Noguer-Dance *et al.* 2010 van demostrar amb tècniques de marcatge fluorescent que cèl·lules mare diploides derivades de la placenta exhibien un únic senyal per nucli indicant que *C19MC* és expressat monoal·lèlicament, i que per tant aquest clúster es troba sotmès al mecanisme d'impressió genètica. Kotlabova *et al.* 2011 van identificar un conjunt de microARNs del clúster *C19MC*, concretament miR-516, miR-517, miR-518b, miR-520a, miR-520h, miR-525 i miR-526a, expressats en el plasma matern de dones embarassades però no en dones no embarassades. A banda d'aquests resultats, també van demostrar la presència de majors nivells extracel·lulars de microARNs de *C19MC*, concretament miR-516, miR-517, miR-518b, miR-520a, miR-520h, miR-525 i miR-526a en embarassos amb un progrés normal.

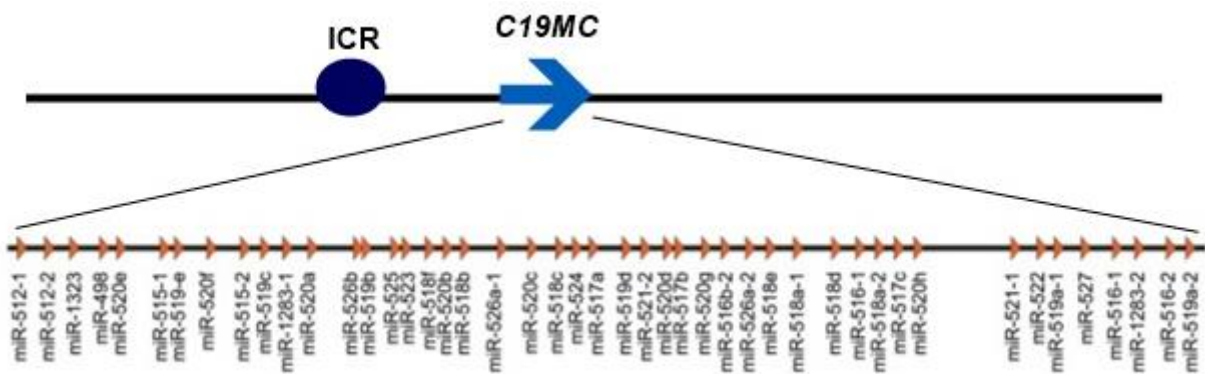


Figura 4: Representació esquemàtica del clúster microARNs *C19MC*.

La funció biològica del clúster *C19MC* és encara força desconeguda. S'ha vist que normalment és sobreexpressat en certs tumors cerebrals agressius, suggerint un paper important en la proliferació cel·lular (Li *et al.* 2009). Els microARNs d'aquest clúster també es troben involucrats en la senyalització del

desenvolupament i la morfologia de la placenta, i s'expressen de manera diferent durant la diferenciació de les cèl·lules embrionàries humanes (Laurent *et al.* 2008).

1.4. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

L'obesitat gestacional i/o pregestacional s'ha relacionat amb el fenomen de programació metabòlica de la descendència, no obstant això, els mecanismes d'aquesta programació no estan ben definits. Es suggereix que un ambient prenatal inadequat, per exemple, de sobrenutrició materna durant l'embaràs pot induir aquests canvis en el fetus en desenvolupament a través de la metilació de l'ADN. Els gens d'impressió genètica són gens regulats per metilació de l'ADN i en placenta tenen un paper crucial en el desenvolupament fetal. La nostra hipòtesi és que l'obesitat gestacional i/o pregestacional modificarà els nivells de metilació de l'ADN dels gens *DLK1-DIO3* i *C19MC* en placenta. Aquests nivells de metilació de l'ADN es correlacionaran amb paràmetres antropomètrics i/o endocrinometabòlics de la gestant i paràmetres de creixement postnatal dels respectius nadons.

2. OBJECTIUS

The following aims were studied in a cohort of mother-child pairs:

- To study the degree of methylation of *DLK1-DIO3* and *C19MC* in placentas from control pregnancies and pregnancies with pregestational/gestational obesity.
- To study the association of the methylation of these genes with anthropometric and endocrinometabolic parameters from women and their respective children.

3. METODOLOGIA

3.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

La cohort d'estudi va consistir en 60 dones embarassades caucàsiques i els seus respectius nadons nascuts a l'hospital de Figueres (Alt Empordà). Es van excloure dones amb complicacions mèdiques, incloent-hi embarassos múltiples, diabetis gestacional, preeclàmpsia (estat d'hipertensió arterial durant l'embaràs amb riscos materno-fetals) o prematurs. També es van excloure embarassos amb tecnologia de reproducció assistida. Al part, es va recollir una mostra de placenta de la regió de les vellositats coriòniques, es va rentar amb PBS (*Phosphate Buffered Saline*) i es va guardar a -80°C per a estudis posteriors.

Per tal d'assolir els objectius es van establir 4 grups de parelles embarassada-nadó segons els paràmetres IMC pregestacional i increment de pes durant l'embaràs (*Taula 1*). El grup control correspon a totes les parelles embarassada-nadó on les mares presentaven pes normal pregestacional i guany de pes normal durant l'embaràs. El grup d'obesitat pregestacional i gestacional on les mares tenien sobrepès/obesitat pre-

gestacional i guany de pes per sobre el rang normal durant l'embaràs. El grup d'*obesitat pregestacional* en el que les mares complien un perfil de sobrepès/obesitat pregestacional i un guany de pes dins del rang normal durant l'embaràs. I finalment, el grup d'*obesitat gestacional* on l'IMC pregestacional de les mares era normal però el guany de pes durant l'embaràs va ser superior al normal.

Taula 1: Grups d'estudi amb els respectius paràmetres utilitzats per classificar-los. IMC: índex de massa corporal (pes/alçada²).

GRUPS D'ESTUDI		IMC PREGESTACIONAL (Kg/m ²)	GUANY DE PES DURANT L'EMBARÀS (Kg)
CONTROL		18.5-24.9	11.5-16.0
OBESITAT PREGESTACIONAL AMB OBESITAT GESTACIONAL	Sobrepès	25.0 -29.9	> 11.5
	Obesitat	>30.0	>9.0
OBESITAT PREGESTACIONAL	Sobrepès	25.0-29.9	7.0-11.5
	Obesitat	>30.0	5.0-9.0
OBESITAT GESTACIONAL		18.5-24.9	> 16.0

3.2. VARIABLES CLÍNiques I ANALÍTiques

Les dades de les variables clíniques i analítiques durant l'embaràs i el part van ser extretes d'informes mèdics oficials. En totes les dones es va realitzar un seguiment prenatal que consistia en exàmens mèdics rutinaris [pes i tensió arterial (TA) mesurada amb un esfigmomanòmetre] i analítiques de sang [Hemoglobina glicosilada (HbA1C), glucosa, insulina, colesterol, triglicèrids mesurats amb ELISAs i proves bioquímiques]. L'IMC va ser calculat com el pes dividit per l'alçada al quadrat (Kg/m²). Les analítiques de sang es van realitzar a totes les dones el segon trimestre d'embaràs, entre la setmana 24 i 28 de gestació. L'HbA1C consisteix en la glicosilació de l'hemoglobina i és un indicador de les fluctuacions dels nivells de glucosa en sang durant els últims mesos. Els nivells elevats de glucosa i insulina ens permeten identificar un perfil de probable diabetis gestacional. El colesterol i els triglicèrids són marcadors del perfil lipídic de l'individu i nivells elevats indiquen un pitjor perfil metabòlic. La TA sistòlica (TAS) i diastòlica (TAD) són coneguts com a marcadors de risc cardiovascular.

Al naixement, es va registrar el pes i la talla dels nadons utilitzant una balança calibrada pel pes i una taula de mesures per la longitud. Als 12 mesos després del naixement es va realitzar un seguiment del pes i l'alçada del nen, utilitzant la mateixa metodologia que al naixement.

3.3. IMPLICACIONS ÈTIQUES I DE SOSTENIBILITAT

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica de l'hospital Dr. Josep Trueta i es va obtenir el consentiment informat escrit de totes les dones. En tot moment, es va mantenir la confidencialitat de les dades personals i es va treballar amb un fitxer protegit on es van codificar amb números els subjectes d'estudi. Per dur a terme aquest projecte es va estar informat i es van seguir els protocols de bioseguretat i tractament de residus corresponents.

3.4. ESTUDI DE METILACIÓ DE L'ADN

L'estudi de metilació de l'ADN es va realitzar en les mostres placenta, un teixit fàcilment accessible i regulador del desenvolupament fetal. Els gens escollits per aquest estudi van ser *DLK1-DIO3* i *C19MC*. La metodologia utilitzada va incloure l'extracció d'ADN de la placenta, la bisulfitejació de l'ADN, l'amplificació de l'ADN bisulfitejat per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i la piroseqüenciació.

La reacció de bisulfitejació es basa en un primer pas de desnaturalització de l'ADN seguit pel tractament amb bisulfite sòdic, el qual desencadena la desaminació dels residus de citosina, i finalment la dessulfonació convertint els anteriors residus en uracils. Les citosines metilades, no obstant, són resistents al tractament i queden intactes sense canviar (Figura 5). Així, els canvis en la seqüència de l'ADN depenen directament de l'estat de metilació dels residus de citosina, transformant la informació sobre la metilació de l'ADN a una seqüència de nucleòtids. L'ADN bisulfitejat és amplificat amb encebadors específics per a ADN bisulfitejat i complementaris a regions sense dinucleòtids CpG. Finalment, amb la piroseqüenciació es coneix la seqüència de nucleòtids de les regions d'interès per a poder-la comparar amb la corresponent seqüència consens.

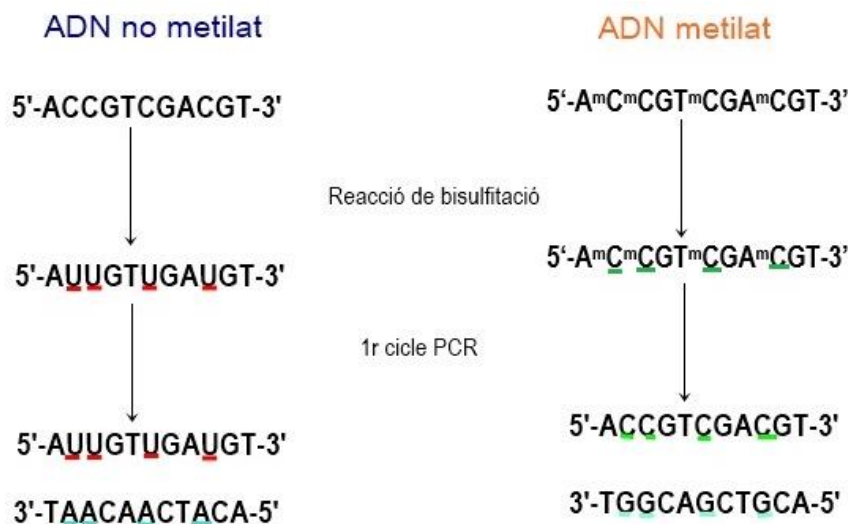


Figura 5: Tractament per bisulfitejació de l'ADN.

3.4.1. EXTRACCIÓ D'ADN EN PLACENTA

La qualitat de l'ADN (ADN no fragmentat) és un factor molt important que pot afectar l'eficiència de la conversió de bisulfatació. Per l'extracció de l'ADN genòmic es va utilitzar el *Gentra Pure Gene tissue Kit* (Qiagen). En el primer pas, es van posar 15 mg de teixit de placenta en un microtub d'1.5 ml. Posteriorment, a 4°C, s'hi va afegir 300 µl de tampó de lisi cel·lular, que lisa les cèl·lules, i 2 µl de proteïnasa K (estoc 20mg/ml). La proteïnasa K digereix les proteïnes, incloent-hi les histones associades a l'ADN [la presència de cromatina dificultaria la dissociació de les dues cadenes d'ADN (Cheishvili *et al.* 2017)] i les nucleases que podrien degradar l'ADN. La barreja es va invertir 25 vegades i es va incubar tota la nit (16 hores) a 55°C. L'endemà, es va afegir 1.5 µl de ARNasa A (estoc 20 mg/ml), barrejant i invertint 25 vegades per tal d'eliminar l'ARN. Un cop invertit, es va incubar a 37°C durant 20 minuts. Posteriorment, es va deixar refredar 1 minut a 4°C, s'hi va afegir 100 µl de la solució de precipitació de proteïnes i es va agitar durant 20 segons. Les proteïnes es van precipitar amb una centrifugació a 16000 g durant 10 minuts i es va deixar reposar en gel. En aquest pas, es va separar el sobrenedant, que conté l'ADN, en un tub net, i s'hi va afegir 300 µl d'isopropanol invertint 50 vegades i es va centrifugar a 16000 g durant 1 minut per tal de precipitar-lo. Es va descartar el sobrenedant amb molta cura i es va eliminar l'excés d'isopropanol del *pellet* amb el tub invertit. Després, s'hi va afegir 300 µl d'etanol al 70% per rentar el *pellet* i es va centrifugar 16000 g durant 1 minut. Es va descartar el sobrenedant i es va assecar el tub invertit durant 20 minuts per eliminar restes d'etanol que podrien influir en la PCR. S'hi va afegir 25 µl de la solució d'hidratació de l'ADN i es va resuspendre l'ADN a 65°C durant 1 hora. Finalment, es va deixar en agitació a 200 rpm, a temperatura ambient durant tota la nit.

La quantificació de l'ADN es va realitzar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop N1000 (NanoDrop Technologies) a partir d'una mesura d'absorbància directa de la mostra a 260 nm de longitud d'ona. Per tal de determinar la puresa de la mostra es van utilitzar dues ràtios d'absorbància, 260/280 i 260/230, que van ser proporcionades directament pel Nanodrop. Es van donar per vàlides les mostres amb la ràtio 260/280 (que indica la contaminació de la mostra per proteïnes) d'entre 1.8 i 2; i la ràtio 260/230 (que mesura la contaminació de la mostra per sals i solvents) major d'1.5.

3.4.2. BISULFITACIÓ DE L'ADN

La bisulfatació de l'ADN es va realitzar mitjançant el *EZ DNA Methylation-Gold™ kit* (Zymo Research). Per començar, es van preparar 500 ng d'ADN en un volum final de 20 µl totals (enrasat amb aigua Milli Q estèril) en una placa de 96 pous apte per a termociclador. Es va preparar el *CT-conversion reagent*, dissolent-lo amb 900 µl d'aigua, 300 µl *M-dilution buffer* i 50 µl *M-dissolving buffer*. La barreja es va agitar de forma freqüent

durant 10 minuts. Aquest reactiu és molt sensible a la llum, i cal mantenir-lo tapat de la llum. A cada mostra es van afegir 130 µl de *CT-conversion reagent* i es van desaminar al termociclador amb el programa següent:

98°C	5 minuts	} -16 cicles
95°C	30 segons	
50°C	60minuts	
4°C	∞	

L'endemà, es van preparar les columnes afegint-hi 600 µl de *M-Binding buffer*. Un cop afegit el *M-Binding buffer* s'hi va afegir els 150 µl de la mostra, es va tancar i es va invertir diverses vegades. Després, es va centrifugar a 16000 g durant 30 segons i es va descartar el líquid. Es va rentar amb 100 µl de *M-wash buffer* (que s'havia preparat prèviament afegint 4 parts d'etanol 100% a 1 part de *M-wash buffer concentrate*). Es va centrifugar a 16000 g a 30 segons i es va descartar el líquid. Subsegüentment, es va dessulfonar incubant amb 200 µl de *M-desulphonation buffer* durant 15-20 minuts tapat de llum a temperatura ambient. Passat el temps, es va centrifugar a 16000 g durant 30 segons. La columna es va rentar dues vegades amb 200 µl de *M-wash buffer* a 16000 g durant 30 segons i es va descartar el líquid. Finalment, es va centrifugar 16000 g durant 30 segons per assecat. Per tal d'eluir l'ADN, es va transferir la columna a un microtub d'1.5 ml, s'hi va afegir 15 µl *M-elution buffer* i es va centrifugar a 16000 g durant 30 segons.

L'ADN bisulfitat de cadena simple es va quantificar al nanodrop. Finalment, es va diluir amb aigua milliQ estèril a una concentració de treball de 20ng/µl.

3.4.3. PCR D'ADN BISULFITAT (BS-PCR)

Les regions estudiades en aquest treball van ser els ICR de *DLK1-DIO3* (chr14:100804509-100804791, regió 1 i chr14:100811542-100811731, regió 2; referència GRCh37) i *C19MC* (chr19:53648001-53648160; referència GRCh37). Pel gen *DLK1-DIO3* es van dissenyar dos parells d'encebadors, atès que la regió és molt gran. El primer parell d'encebadors va amplificar la regió 1 (R1) i el segon parell va amplificar la regió 2 (R2) (*Taula 2*).

Taula 2: Seqüències dels encebadors utilitzades pels gens estudiats en la BS-PCR i per la piroseqüenciació posterior.

	BS-PCR	Seqüenciació
DLK1-DIO3 regió 1 (R1)	Fw 5'-AGGGATATGAAGTTGAGTGG-3' Rv Biotina-5'-TTCCCCAAAACCACAACCTCAATC-3'	5'-AAAGAGTAGAGTTGGG-3'
DLK1-DIO3 regió 2 (R2)	Fw 5'-GATTGGGGGTTTTATTATTGAGGA -3' Rv Biotina-5'-ATCTCATAACCATAAAACTACTCCAAACA-3'	5'-AGTTTTATTTTTATTTAATATATAAGAG-3'
C19MC	Fw 5'-TGTTTGGAAAGGGGTTGTTTATGTA -3' Rv Biotina-5'-CCCTCAAAAAAAAAACCAAAATATTAATTC -3'	5'- GTTTGGATAGAGTTTTTAGAG-3'

Els encebadors van ser dissenyats i optimitzats al laboratori, específics per ADN bisulfitat. Un dels encebadors de cada parell, es va etiquetar a l'extrem 5' amb biotina per tal de permetre la piroseqüenciació

posterior. Es va comprovar que els encebadors amplificaven ADN bisulfitat però no hibridaven amb ADN normal i es va determinar la temperatura d'*annealing* òptima (es va realitzar un gradient de temperatures i es va escollir aquella temperatura que donava major quantitat de producte sense bandes inespecífiques; *Figura 6*). Tal com es mostra en el gel, els encebadors van amplificar les mostres d'ADN bisulfitat. Per tant, es va considerar que els encebadors funcionaven correctament i es van establir les condicions òptimes de la PCR (*Taules 3 i 4*).

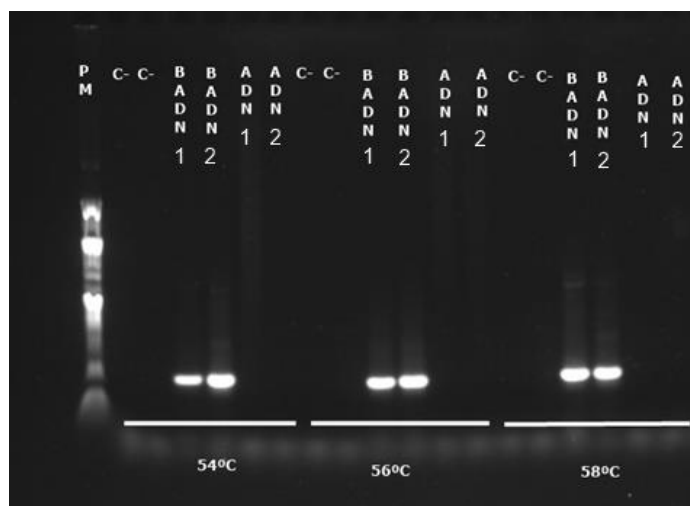


Figura 6: Gel d'agarosa representatiu de la PCR d'optimització de C19MC. Les 3 temperatures d'*annealing* testades van ser 54°C, 56°C i 58°C. PM: marcador de pes molecular. C-: control negatiu (aigua miliQ). BADN: ADN bisulfitat. ADN: ADN sense bisulfitar.

Taula 3: Programa del termociclador de les PCRs d'ADN bisulfitat de *DLK1-DIO3* i *C19MC*.

<i>DLK1-DIO3</i>	<i>C19MC</i>
REGIÓ 1 (R1)	
94° 15 minuts	94° 15 minuts
94° 20 segons	94° 20 segons
61° 30 segons	58° 30 segons
72° 60 segons	72° 60 segons
72° 10 minuts	72° 10 minuts
4 ° ∞	4 ° ∞
40 cicles	
REGIÓ 2 (R2)	
94° 15 minuts	
94° 20 segons	
54° 30 segons	
72° 60 segons	
72° 10 minuts	
4 ° ∞	
40 cicles	

Taula 4: Concentracions i volums del reactius utilitzats per dur a terme la PCR d'ADN bisulfitat de *DLK1-DIO3* i *C19MC* en les condicions òptimes.

	DLK1-DIO3	C19MC
ADN bisulfitat (10 ng/ul)	2 µl	2 µl
Aigua	23.6 µl	23.6 µl
10x NH₄ tampó	3.5 µl	3.5 µl
dNTP (6mM)	1.4 µl	1.4 µl
MgCl₂ (25 mM)	2.1 µl	2.1 µl
Encebador <i>forward</i> (10 µM)	1.1 µl	1.1 µl
Encebador <i>reverse</i> (10 µM)	1.1 µl	1.1 µl
Polimerasa AmpliTaq Gold (5 U/ul)	0.2 µl	0.2 µl
	35 µl	35 µl

Un cop finalitzada la PCR d'ADN bisulfitat, els productes es van analitzar en un gel d'agarosa 1% (1.5g agarosa + 150 ml TBE + 15 µl Gel Red 10.000x), per tal comprovar l'obtenció del producte i de descartar contaminacions, ja que podrien ser problemàtiques per a la piroseqüenciació posterior. Es van carregar 10 µl del producte de PCR + 2 µl de tampó de càrrega (6x), junt amb 10 µl del marcador de pes molecular (*DNA ladder*). Es va fer córrer el gel 120 V durant 45 minuts. Un cop comprovat, el producte de PCR restant es va enviar a piroseqüenciar al servei de seqüenciació de l'Idibell (Barcelona).

3.4.4. PIROSEQÜENCIACIÓ

La piroseqüenciació és un mètode de seqüenciació àmpliament utilitzat per diverses aplicacions de diagnòstic com per exemple la detecció de mutacions. A més a més, és utilitzada per l'anàlisi de la metilació en l'ADN. Amb aquest mètode, es poden seqüenciar centenars o milers de molècules diferents d'ADN i permet l'avaluació de la metilació de milers de còpies d'ADN (Chieshvil *et al.* 2017).

La piroseqüenciació consisteix en la mesura de la luminescència durant la incorporació de nucleòtids a una cadena complementària a la cadena motlle. Un pirofosfat (PPi) és alliberat durant la incorporació d'un nucleòtid mitjançant el fragment de Klenow (ADN polimerasa I) i és utilitzat per l'ATP sulfurilasa per produir ATP a partir de l'adenosina fosfosulfat (*Figura 7*). Aquest ATP proporciona l'energia necessària a la luciferasa

per oxidar la D-luciferina. El producte oxidat generat està en un estat excitat. El pas de l'estat excitat a un estat basal provoca l'emissió d'un fotó que pot ser detectat per una càmera. A diferència del mètode de Sanger on s'utilitza una barreja dels quatre nucleòtids fluorescents, en la piroseqüenciació només un dels quatre nucleòtids és dispensat a cada reacció. Els nucleòtids que no s'han incorporat i l'excés d'ATP són degradats abans de l'addició del nou nucleòtid. La intensitat de la luminescència és directament proporcional a la quantitat de nucleòtids incorporats. La incorporació de dos nucleòtids idèntics consecutius correspondrà a un pic amb una alçada doble en comparació amb la incorporació d'un únic nucleòtid (Dejeux *et al.* 2009).

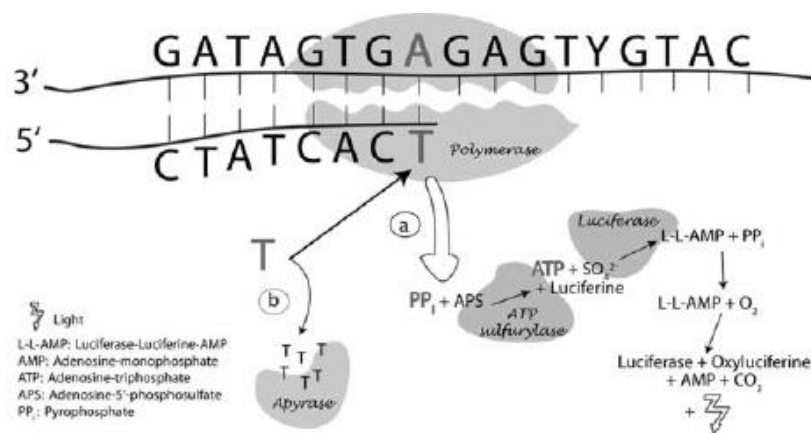


Figura 7: Esquema de la tecnologia de piroseqüenciació. Un nucleòtid timina complementari a l'adenosina de la cadena motlle és incorporat per l'ADN polimerasa I. El pirofosfat alliberat a partir de la incorporació del nucleòtid és convertit en un senyal lluminós a través d'una cascada de reaccions enzimàtiques que són descrites en el text. Els nucleòtids no incorporats són eliminats de la reacció per l'enzim *apyrase*. **Font:** Dejeux *et al.* 2009.

En l'anàlisi de metilació de l'ADN, l'ADN és bisulfitat per "congelar" l'estat de metilació de les citosines i traduir les modificacions epigenètiques en una seqüència. La regió d'interès és amplificada per PCR amb un dels encebadors biotinitat. La cadena biotinitada del producte de PCR és aïllada durant la reacció de piroseqüenciació, d'aquesta manera només hi haurà una única cadena motlle. La reacció té lloc amb un encebador de seqüenciació que és complementari a la cadena biotinitada (*Taula 2*). La piroseqüenciació permet una anàlisi simultània i la quantificació de diverses posicions CpG que es troben pròximes (*Figura 8*).

El resultat de la piroseqüenciació dels productes obtinguts va donar el percentatge de metilació de cadascuna de les CpG presents a la regió analitzada, i amb aquestes dades també es va calcular la mitjana aritmètica de metilació global de tota la regió.

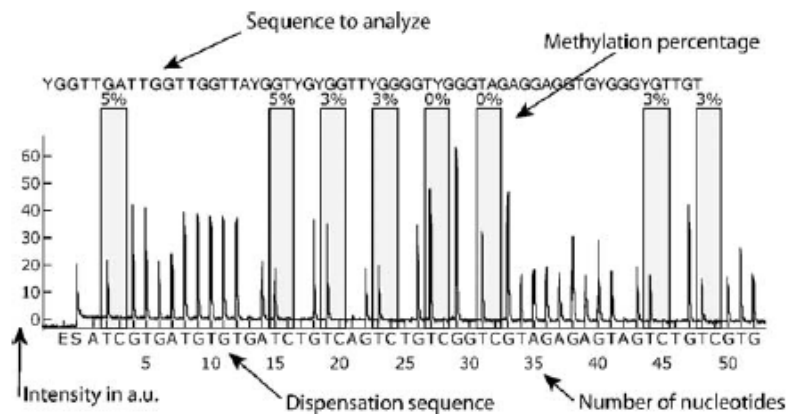


Figura 8: Exemple del resultat de la reacció piroseqüenciació (pirograma). La intensitat dels senyals són proporcionats amb unitats arbitràries (a.u.). En aquest resultat s'observen 8 CpG amb el corresponent percentatge de metilació. Font: Dejeux *et al.* 2009.

3.5. ANÀLISI DE LES DADES

Es van analitzar estadísticament els resultats obtinguts per tal de: (1) comparar el percentatge de metilació de l'ADN dels gens esmentats en els 4 grups d'estudi, i (2) buscar associacions entre el percentatge de metilació i les variables maternes i/o dels respectius nadons. Es va decidir realitzar estadística no paramètrica, atès que la majoria de variables no complien els supòsits de l'estadística paramètrica i la n d'estudi no era prou elevada.

Pel que fa al punt (1), de les variables analitzades, es va calcular la mitjana \pm la desviació estàndard (SD) de cada un dels 4 grups d'estudi i es van comparar mitjanes amb el test de U-Mann Whitney per comprovar l'existència de diferències significatives ($p < 0.05$) en comparació amb el control. Amb aquest procediment es va elaborar una taula descriptiva de les variables maternes i dels nadons segons el grup d'estudi. També es va procedir d'aquesta manera per tal de detectar diferències en el percentatge de metilació dels gens estudiats entre els grups d'estudi.

Finalment en el punt (2), es van estudiar associacions entre les variables endocrinometabòliques i antropomètriques de les parelles embarassada-nadó i els percentatges de metilació dels gens esmentats. Es va utilitzar el test de correlació d'Spearman. Per tal de corregir per comparacions múltiples (que augmenten la probabilitat de trobar resultats significatius), es va establir un nivell de significació de p inferior a 0,01 per *DLK1* i inferior a 0,005 per a *C19MC*; resultant de dividir el nivell de significació estàndard pel nombre de variables testades. En aquest cas, el p -valor estàndard ($p = 0.05$) per *DLK1* es va dividir entre 5 i per *C19MC* entre 10. Amb aquelles variables que continuaven presentant correlació significativa després de la correcció per comparacions múltiples, es va procedir a realitzar una anàlisi multivariant de regressió lineal per tal de corregir les correlacions per variables de confusió. Aquesta anàlisi permet determinar la presència o absència de variables que poden influir en la correlació significativa.

L'anàlisi de dades es va dur a terme mitjançant el programa informàtic SPSS Statistics (IBM).

4. RESULTATS

4.1. VARIABLES ENDOCRINOMETABÒLIQUES I ANTROPOMÈTRIQUES EN ELS GRUPS D'ESTUDI

Pel que fa al gen *DLK1-DIO3* es van utilitzar les 60 parelles embarassada-nadó. Les mares dels grups (3) d'obesitat presgestacional i del grup (4) d'obesitat gestacional presentaven una major TAS ($p=0.031$) i TAD ($p=0.038$), respectivament, en comparació amb el grup control. En el que fa referència als de nivells de glucosa en sang, l'HbA1C es mostrava augmentada en el grup (3) d'obesitat pregestacional comparat amb el grup control ($p=0.040$), i l'insulina mostrava un augment en el grup (2) d'obesitat pregestacional/gestacional respecte al grup control ($p=0.008$). Finalment, el colesterol total presentava una disminució en el grup (4) d'obesitat gestacional respecte al grup control ($p=0.010$; Taula 5). En relació amb les variables del nen estudiades, s'observava un major pes al naixement en els grups (2) d'obesitat pregestacional/gestacional ($p=0.017$) i (4) obesitat gestacional ($p=0.015$) comparats amb el grup control (Taula 5).

Taula 5: Variables endocrinometabòliques i antropomètriques mare-nen en els 4 grups d'estudi i el total de la mostra pel gen *DLK1-DIO3*. En la taula es mostra la mitjana \pm SD de cada una de les variables. Les diferències significatives són dels grups (2), (3) i (4) respecte al grup (1) control a partir d'un test estadístic U-Mann Whitney. Els nivells de significació són considerats els següents: * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01 i *** p-valor < 0.001. IMC: índex de massa corporal. TAS: tensió arterial sistòlica. TAD: tensió arterial diastòlica. HbA1C: hemoglobina glicosilada.

DLK1-DIO3	TOTAL	CONTROL	OBESITAT PREGESTACIONAL + GESTACIONAL	OBESITAT PREGESTACIONAL	OBESITAT GESTACIONAL
		(1)	(2)	(3)	(4)
N	60	24	14	14	8
Sexe nen (% femení)	45%	38.5%	60%	50%	44.4%
Mare					
IMC (Kg/m ²)	26.53 \pm 5.33	22.53 \pm 1.53	32.83 \pm 2.83***	29.76 \pm 4.12**	22.17 \pm 1.92
Increment pes (Kg)	12.91 \pm 4.45	12.63 \pm 3.06	13.50 \pm 3.95	9.02 \pm 3.69**	19.41 \pm 2.42***
TAS prepart (mmHg)	125.13 \pm 10.49	121.05 \pm 8.78	127.23 \pm 13.08	128.10 \pm 6.30*	127.43 \pm 10.33
TAD prepart (mmHg)	77.49 \pm 9.11	73.90 \pm 7.65	79.77 \pm 11.40	78.60 \pm 6.95	81.57 \pm 8.34*
HbA1C (%)	5.00 \pm 0.38	4.87 \pm 0.33	5.12 \pm 0.50	5.16 \pm 0.39*	4.99 \pm 0.20
Glucosa (mg/dl)	80.78 \pm 7.96	78.46 \pm 4.97	84.20 \pm 9.68	84.00 \pm 10.34	78.57 \pm 6.16
Insulina (mcUI/ml)	7.62 \pm 7.64	6.05 \pm 7.24	10.60 \pm 5.12**	8.43 \pm 10.05	6.64 \pm 6.62
Colesterol total (mg/dl)	257.02 \pm 39.91	273.46 \pm 47.25	252.40 \pm 18.49	252.55 \pm 41.58	227.29 \pm 21.15**
Triglicèrids (mg/dl)	164.50 \pm 74.71	151.75 \pm 51.30	166.60 \pm 50.02	168.09 \pm 46.93	180.14 \pm 163.64
Nen					
Pes naixement (g)	3387.08 \pm 310.33	3274.42 \pm 212.94	3492.67 \pm 325.39 *	3365.71 \pm 406.16	3532.22 \pm 246.57 *
Alçada naixement (cm)	49.63 \pm 1.68	49.12 \pm 1.34	50.00 \pm 1.65	49.79 \pm 2.19	50.00 \pm 1.32
Pes 12 mesos (g)	9859.80 \pm 1070.53	9632.73 \pm 993.13	10164.17 \pm 1592.27	9621.67 \pm 591.16	10071.43 \pm 984.45
Alçada 12 mesos (cm)	75.54 \pm 2.83	75.34 \pm 2.82	76.46 \pm 3.77	74.54 \pm 1.54	75.43 \pm 3.15

Pel que fa al gen *C19MC* es van estudiar 55 parelles embarassada-nadó. Les mares del grup (4) d'obesitat gestacional presentaven una major TAD respecte al grup control ($p=0.030$). Pel que fa als nivells de glucosa en sang, l'HbA1C es trobava en majors nivells en el grup (3) d'obesitat pregestacional comparat amb el grup control ($p=0.030$), i la insulina mostrava un augment en el grup (2) d'obesitat pregestacional/gestacional respecte al grup control ($p=0.040$). Finalment, la variable colesterol total es trobava disminuïda en el grup (4) d'obesitat gestacional respecte al grup control ($p=0.027$; Taula 6). Referent a les variables del nen estudiades, s'observava un major pes al naixement en els grups (2) d'obesitat pregestacional/gestacional ($p=0.039$) i (4) obesitat gestacional ($p<0.001$) respecte al control (Taula 6).

Taula 6: Variables endocrinometabòliques i antropomètriques mare-nen en els 4 grups d'estudi i el total de la mostra pel gen *C19MC*. En la taula es mostra la mitjana \pm SD de cada una de les variables. Les diferències significatives són dels grups (2), (3) i (4) respecte al (1) control a partir d'un test estadístic U-Mann Whitney. Els nivells de significació són considerats els següents: * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01 i *** p-valor < 0.001. IMC: índex de massa corporal. TAS: tensió arterial sistòlica. TAD: tensió arterial diastòlica. HbA1C: hemoglobina glicosilada.

<i>C19MC</i>	TOTAL	CONTROL (1)	OBESITAT PREGESTACIONAL + GESTACIONAL (2)	OBESITAT PREGESTACIONAL (3)	OBESITAT GESTACIONAL (4)
N	55	23	13	12	7
Sexe nen (% femení)	47.3%	39.1%	57.1%	45.5%	57.1%
Mare					
IMC (Kg/m ²)	26.33 \pm 5.10	22.54 \pm 1.62	32.46 \pm 2.54***	29.22 \pm 3.94***	21.96 \pm 1.98
Increment pes (Kg)	13.19 \pm 4.47	12.52 \pm 3.23	13.43 \pm 4.09	9.63 \pm 3.53	20.00 \pm 2.54***
TAS prepart (mmHg)	123.82 \pm 9.62	119.89 \pm 7.41	126.00 \pm 12.86	126.86 \pm 5.70	128.33 \pm 9.42
TAD prepart (mmHg)	77.34 \pm 9.28	73.89 \pm 7.87	79.25 \pm 11.75	78.57 \pm 7.12	83.00 \pm 7.64*
HbA1C (%)	4.99 \pm 0.41	4.86 \pm 0.33	5.11 \pm 0.53	5.21 \pm 0.44*	4.98 \pm 0.24
Glucosa (mg/dl)	80.11 \pm 7.94	77.91 \pm 4.90	82.67 \pm 8.89	85.00 \pm 12.18	77.40 \pm 5.98
Insulina (mcUI/ml)	6.24 \pm 5.36	4.91 \pm 5.05	10.64 \pm 5.43*	6.22 \pm 5.44	4.23 \pm 2.37
Colesterol total (mg/dl)	257.89 \pm 41.79	268.36 \pm 47.30	255.11 \pm 17.37	255.75 \pm 45.20	220.20 \pm 20.95*
Triglicèrids (mg/dl)	152.55 \pm 51.55	149.73 \pm 53.73	167.22 \pm 53.01	169.25 \pm 47.27	111.80 \pm 26.86
Nen					
Pes naixement (g)	3369.27 \pm 318.36	3239.13 \pm 183.30	3491.43 \pm 337.64*	3342.73 \pm 458.39	3594.29 \pm 177.94***
Alçada naixement (cm)	49.60 \pm 1.70	49.17 \pm 1.40	49.86 \pm 1.61	49.82 \pm 2.44	50.14 \pm 1.35
Pes 12 mesos (g)	9853.78 \pm 1162.42	9652.63 \pm 1070.23	10342.73 \pm 1538.83	9613.33 \pm 634.67	9955.00 \pm 1261.27
Alçada 12 mesos (cm)	75.33 \pm 3.07	75.03 \pm 2.95	76.86 \pm 3.67	74.89 \pm 1.60	74.17 \pm 3.60

4.2. NIVELLS DE METILACIÓ D'ADN DE *DLK1-DIO3* I *C19MC* EN ELS GRUPS D'ESTUDI

El percentatge de metilació de cadascuna de les CpG presents a les regions analitzades dels gens *DLK1-DIO3* i *C19MC* s'ha representat a la Taula 7. El percentatge de metilació de l'ADN en les CpG del domini *DLK1-DIO3* i el clúster *C19MC* no mostrava diferències significatives en els grups d'estudi d'obesitat comparats amb el grup control (Taula 7).

Taula 7: Percentatge de metilació de cada una les CpG i de la mitjana de totes les CpG dels dos gens analitzats (*DLK1-DIO3* i *C19MC*) en els 4 grups d'estudi. Els valors representen la mitjana \pm SD. Es va realitzar un test U-Mann Whitney de cada un dels grups (2), (3) i (4) respecte al grup (1) control. En l'última columna es mostra el resultat del test. ns: no significatiu.

	CONTROL (1)	OBESITAT PREGESTACIONAL + GESTACIONAL (2)	OBESITAT PREGESTACIONAL (3)	OBESITAT GESTACIONAL (4)	p-valor
<i>DLK1-DIO3</i>					
Regió 1 (R1)					
CpG 1	38.3 \pm 11.4	37.9 \pm 8.5	40.7 \pm 12.2	45.1 \pm 15.7	ns
CpG2	40.8 \pm 9.5	40.9 \pm 7.7	42.9 \pm 16.6	42.6 \pm 15.3	ns
CpG 3	49.2 \pm 9.8	52.2 \pm 8.4	45.9 \pm 13.6	50.9 \pm 11.6	ns
CpG 4	35.5 \pm 9.9	35.1 \pm 9.8	35.1 \pm 10.8	36.3 \pm 7.6	ns
CpG 5	39.7 \pm 10.8	46.8 \pm 10.7	41.5 \pm 14.5	41.2 \pm 8.3	ns
Mitjana	40.3 \pm 8.2	43.2 \pm 5.5	41.2 \pm 11.9	41.5 \pm 9.7	ns
Regió 2 (R2)					
CpG 1	75.4 \pm 9.7	78.4 \pm 6.7	72.7 \pm 9.1	75.5 \pm 7.2	ns
CpG 2	74.3 \pm 9.8	76.9 \pm 6.6	67.0 \pm 12.2	79.3 \pm 9.4	ns
CpG 3	57.6 \pm 13.7	55.4 \pm 19.8	56.7 \pm 14.2	64.9 \pm 13.2	ns
CpG 4	58.3 \pm 7.9	56.5 \pm 9.5	57.4 \pm 7.4	62.1 \pm 16.0	ns
CpG 5	54.5 \pm 10.3	52.8 \pm 10.8	51.8 \pm 9.4	54.5 \pm 6.3	ns
Mitjana	63.5 \pm 6.5	63.4 \pm 8.1	61.9 \pm 8.1	67.9 \pm 2.9	ns
Mitjana R1_R2	51.6 \pm 6.5	52.3 \pm 7.4	51.4 \pm 9.0	54.7 \pm 5.4	ns
<i>C19MC</i>					
CpG 1	36.4 \pm 5.9	38.3 \pm 5.6	35.0 \pm 2.3	31.9 \pm 6.4	ns
CpG2	36.5 \pm 6.0	37.9 \pm 5.1	36.1 \pm 3.8	33.1 \pm 8.4	ns
CpG 3	38.0 \pm 6.4	39.4 \pm 6.8	34.7 \pm 8.9	34.1 \pm 4.7	ns
CpG 4	37.5 \pm 7.0	38.3 \pm 6.0	35.5 \pm 3.5	32.7 \pm 7.3	ns
CpG 5	38.3 \pm 9.0	37.2 \pm 10.1	33.2 \pm 10.8	34.2 \pm 6.9	ns
CpG 6	35.4 \pm 6.1	34.3 \pm 8.9	30.4 \pm 7.3	30.2 \pm 8.2	ns
CpG 7	36.0 \pm 7.0	37.1 \pm 3.9	34.0 \pm 2.9	34.3 \pm 5.5	ns
CpG 8	35.1 \pm 5.7	34.5 \pm 4.1	34.00 \pm 2.2	33.0 \pm 3.6	ns
CpG 9	32.9 \pm 12.6	37.4 \pm 4.9	33.8 \pm 3.0	32.7 \pm 4.5	ns
CpG 10	26.9 \pm 7.5	30.4 \pm 2.8	29.3 \pm 1.2	27.7 \pm 2.1	ns
Mitjana	36.3 \pm 7.0	36.4 \pm 4.0	33.5 \pm 0.8	34.0 \pm 5.2	ns

4.3. ASSOCIACIONS ENTRE ELS NIVELLS DE METILACIÓ DE L'ADN I LES VARIABLES ENDOCRINOMETABÒLIQUES I ANTROPOMÈTRIQUES

El percentatge de metilació de *DLK1-DIO3* va correlacionar positivament amb la TAS i TAD de l'embarassada ($p < 0.05$) específicament la CpG 5 de la regió 1, i les CpG 3 i 5 de la regió 2, així com les mitjanes de metilació de cada regió (Taula 8). El grau de metilació en la CpG 3 de la regió 1 de *DLK1-DIO3* també es va associar amb els nivells d'HbA1C de l'embarassada ($p < 0.05$). No obstant això, no es van trobar associacions significatives entre els nivells de metilació de les CpG de *DLK1-DIO3* estudiades i els paràmetres de creixement postnatal dels infants (Taula 8).

Taula 8: Coeficient de correlació de Spearman de cada una de les regions del gen *DLK1-DIO3* amb les variables d'estudi. Els nivells de significació són considerats els següents: * p-valor < 0.05 i ** p-valor < 0.01. IMC: índex de massa corporal. TAS: tensió arterial sistòlica. TAD: tensió arterial diastòlica. HbA1C: hemoglobina glicosilada.

<i>DLK1-DIO3</i>	REGIÓ 1						REGIÓ 2						Mitjana R1_R2
	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	Mitjana	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	Mitjana	
N	60	59	56	48	47	47	60	60	60	58	48	48	42
MARE													
IMC (Kg/m ²)	-0.048	0.036	0.004	-0.006	0.162	0.128	0.040	-0.057	-0.099	-0.025	-0.084	-0.092	-0.004
Increment pes (Kg)	-0.089	-0.170	-0.023	-0.200	-0.171	-0.206	0.016	0.240	0.126	-0.200	-0.141	0.039	-0.128
TAS prepart (mmHg)	0.088	0.231	0.236	0.234	0.377*	0.344*	0.174	0.127	0.305*	0.179	0.342*	0.371*	0.328
TAD prepart (mmHg)	0.120	0.088	0.249	0.217	0.332*	0.297	0.124	0.113	0.343*	0.200	0.293	0.336*	0.346
HbA1C (%)	-0.012	0.114	0.317*	0.084	0.028	0.133	0.051	-0.126	0.020	0.029	-0.144	-0.027	0.039
Glucosa (mg/dl)	0.027	0.013	0.194	0.112	0.200	0.193	0.094	0.177	0.194	0.183	0.027	0.131	0.126
Insulina (mcUI/ml)	-0.045	-0.013	0.078	-0.013	0.197	0.071	0.025	0.121	0.012	-0.072	-0.164	-0.114	-0.076
Colesterol total (mg/dl)	-0.058	0.184	0.170	0.072	0.153	0.083	-0.091	0.026	0.260	-0.043	0.006	0.027	0.067
Triglicèrids (mg/dl)	-0.092	-0.017	0.103	-0.020	-0.009	-0.037	-0.137	-0.102	-0.049	-0.160	-0.225	-0.206	-0.172
NEN													
Pes naixement (g)	0.060	0.033	-0.034	-0.224	-0.172	-0.084	-0.021	0.198	-0.070	-0.055	0.055	0.049	-0.066
Alçada naixement (cm)	0.107	0.199	0.237	-0.028	0.008	0.106	-0.043	0.130	0.164	0.063	-0.016	0.118	0.054
Pes 12 mesos (g)	-0.034	-0.021	0.218	0.095	-0.101	-0.039	0.047	0.085	-0.017	-0.264	-0.271	-0.052	0.000
Alçada 12 mesos(cm)	0.021	0.106	0.277	0.203	0.050	0.125	0.062	0.154	0.167	-0.085	-0.055	0.065	0.125

Taula 9: Coeficient de correlació de Spearman de cada una de les regions del gen *C19MC* amb les variables d'estudi. Els nivells de significació són considerats els següents: * p-valor < 0.05 i ** p-valor < 0.01. IMC: índex de massa corporal. TAS: tensió arterial sistòlica. TAD: tensió arterial diastòlica. HbA1C: hemoglobina glicosilada.

<i>C19MC</i>	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	Mitjana
N	55	55	54	41	33	31	26	26	26	24	23
MARE											
IMC (Kg/m ²)	0.202	0.135	0.172	0.173	0.094	0.170	0.224	0.109	0.306	0.300	0.157
Increment pes (Kg)	-0.157	-0.058	-0.142	-0.167	-0.028	0.034	0.094	0.125	0.060	-0.063	0.065
TAS prepart (mmHg)	0.073	0.097	0.017	0.011	0.127	0.129	0.332	0.183	0.390	0.154	0.270
TAD prepart (mmHg)	0.042	-0.032	-0.049	-0.082	0.075	0.052	0.165	-0.074	-0.164	0.137	0.014
HbA1C (%)	0.112	0.257	0.078	0.056	0.158	0.132	0.307	0.241	0.242	-0.212	0.216
Glucosa (mg/dl)	0.088	0.222	0.046	0.059	0.014	0.074	0.307	0.214	0.380	-0.193	0.250
Insulina (mcUI/ml)	0.304*	-0.008	0.107	0.174	0.070	0.197	0.317	0.101	0.276	-0.358	0.179
Colesterol total (mg/dl)	0.243	0.086	0.176	0.317	0.472*	0.518*	0.565**	0.502*	0.624**	0.235	0.541*
Triglicèrids (mg/dl)	0.307*	0.171	0.193	0.340	0.323	0.459*	0.411	0.346	0.513*	-0.193	0.437
NEN											
Pes naixement (g)	0.024	0.071	0.010	-0.027	0.025	-0.052	0.183	0.145	0.243	0.076	0.302
Alçada naixement (cm)	0.017	0.104	0.104	0.040	0.154	-0.002	0.183	0.096	0.062	0.123	0.212
Pes 12 mesos (g)	-0.136	-0.218	-0.140	-0.201	-0.244	-0.093	-0.116	-0.094	-0.041	0.209	-0.151
Alçada 12 mesos (cm)	0.075	0.070	0.080	-0.029	-0.005	0.118	0.134	0.082	0.069	0.371	0.085

Pel que fa a la metilació en *C19MC*, el percentatge de metilació en la CpG 1 es va associar positivament amb els nivells d'insulina i de triglicèrids de la mare ($p < 0.05$; *Taula 9*). Els nivells de triglicèrids també van correlacionar amb el percentatge de metilació de les CpG 1, 6 i 9 ($p < 0.05$). Finalment, un major grau de metilació a les CpG 5, 6, 7, 8 i 9, així com la mitjana del percentatge de metilació de tota la regió estudiada, s'associaven a nivells més elevats de colesterol total en l'embarassada (*Taula 9*).

No obstant això, l'única associació que es va mantenir després de realitzar les correccions per comparacions múltiples, va ser el percentatge de metilació de la CpG 9 de *C19MC* amb el colesterol total amb un p-valor de 0.004.

Aquesta associació es va corregir per variables de confusió mitjançant un test multivariant de regressió lineal. Aquest test va confirmar que el percentatge de metilació del *C19MC* a la CpG 9 i colesterol total, correlacionaven de forma independent. Les variables de confusió introduïdes al model van ser l'increment de pes de la mare, IMC de la mare, el sexe del nen i l'edat de la mare. En la taula 10 s'observa que el colesterol total matern explica un 43% de la variància del percentatge de metilació en placenta de la CpG 9 de *C19MC*, amb un nivell de significació del 0.001.

Taula 10: Resultat del test multivariant de regressió lineal de la variable dependent percentatge de metilació del gen *C19MC* de la CpG9. Les variables independents introduïdes al model van ser: colesterol total matern, increment de pes de la mare durant l'embaràs, IMC de la mare previ a l'embaràs, sexe del nen i edat de la mare.

Metilació CpG 9 (<i>C19MC</i>)	β	p-valor	R^2
Colesterol total	0.682	0.001	0.434
Variables no explicatives	<ul style="list-style-type: none"> • Increment de pes de la mare • IMC mare • Sexe del nen • Edat de la mare 		

5. DISCUSSIÓ

En els últims anys, la prevalença de l'obesitat condicionada per la malnutrició materna ha augmentat considerablement en els països desenvolupats (Aviram *et al.* 2011). Aquesta malaltia es troba associada a comorbiditats - dues o més patologies que presenta el mateix pacient - com la diabetis tipus 2, malalties cardiovasculars i certs tipus de càncers (Pi-Sunyer 2009). D'aquesta manera, l'epidèmia d'obesitat amenaça en reduir la durada i la qualitat de vida en les generacions actuals i futures, i és una preocupació important en temes de salut global. Per tant, hi ha una elevada necessitat per entendre els factors que contribueixen en el desenvolupament d'aquesta malaltia i de descobrir estratègies efectives per la seva prevenció i tractament. En aquest treball, s'ha estudiat la relació entre el grau de metilació de l'ADN en la placenta i l'obesitat materna pregestacional i gestacional, relacionant-lo també amb els paràmetres

endocrinometabòlics de la mare i la seva descendència per tal d'aprofundir en els mecanismes de programació metabòlica.

L'obesitat en l'embaràs es troba associada amb un elevat risc de patir complicacions maternals i prenatales i el risc de la descendència de presentar obesitat a llarg termini (Lawlor *et al.* 2012). Hi ha estudis que demostren que l'augment de l'adipositat materna durant la gestació es troba associat amb canvis ultraestructurals de la placenta, l'acumulació de macròfags, un augment del pes de la placenta i l'expressió de citocines inflamatòries (Wallace *et al.* 2012). Estudis epidemiològics en humans i animals han demostrat que la programació nutricional en períodes primerencs de vida és un fenomen que afecta funcions metabòliques i fisiològiques al llarg de tota la vida (Reynolds *et al.* 2015). Els mecanismes epigenètics han estat proposats com a mediadors de la relació entre el desenvolupament fetal i la sobrenutrició gestacional, i responsables de la programació metabòlica (Lawlor *et al.* 2012). De fet, la metilació de l'ADN és altament dinàmica durant l'embriogènesi. Abans de la implantació del blastocist l'ADN és hipometilat i després de la implantació hi ha un augment progressiu de la metilació que condueix a la diferenciació i a l'organogènesi (Desai *et al.* 2015). Durant el desenvolupament postnatal i en l'edat adulta, la metilació de l'ADN és susceptible a patir modificacions i amb l'edat hi ha una pèrdua global de la metilació (Horvath 2013). En aquest estudi, els resultats preliminars obtinguts no han permès demostrar els efectes de l'obesitat pregestacional i gestacional sobre la metilació de gens d'impressió genètica *DLK1-DIO3* i *C19MC* en placenta. Aquests resultats són obtinguts a partir d'una cohort d'estudi relativament petita, esdevenint una limitació d'aquest treball, seria interessant augmentar la mostra estudiada per tal de demostrar si aquesta relació segueix sent absent.

Els resultats obtinguts suggereixen que el nivell de metilació de l'ADN en la regió IG-DMR del domini *DLK1-DIO3* es podria associar amb la tensió arterial (TAS i TAD) i l'HbA1C de l'embarassada. Així, un metabolisme matern alterat podria conduir a alteracions dels nivells de metilació placentaris i, en conseqüència, modificar el desenvolupament fetal. Stelzer *et al.* 2016 van observar que canvis en la metilació d'IG-DMR poden alterar el desenvolupament de les cèl·lules mare embrionàries en models de ratolí. En el ratolí, s'ha vist que els nivells d'expressió *DLK1*, *DIO3* i *RTL1* són importants per al desenvolupament de la placenta i influencien el desenvolupament fetal (Moon *et al.* 2002; Sektia *et al.* 2008). En aquesta línia, en humans, uns nivells baixos de *DLK1* es relacionen amb restricció del creixement intrauterí (Cleaton *et al.* 2016). En estudis posteriors, seria de gran interès comprovar els nivells d'expressió d'aquests gens en placenta i estudiar la seva relació amb els grups poblacionals estudiats.

Pel que fa al clúster gènic *C19MC*, els resultats obtinguts van mostrar que les variables maternes insulina, colesterol total i triglicèrids es podien correlacionar positivament amb el nivell de metilació de la regió ICR d'aquest clúster, suggerint així que el clúster *C19MC* està correlacionat amb la lipidèmia. D'acord amb els resultats obtinguts, es podria establir la hipòtesi de que els lípids maternos influeixen en l'estat de metilació de *C19MC*. Hormadnikova *et al.* van demostrar que complicacions gestacionals, com per exemple, preeclàmpsia, hipertensió gestacional o restricció del creixement intrauterí es troben associats amb alteracions en l'expressió dels microRNA del clúster *C19MC*. Aquests investigadors van observar que la major expressió de miR-517-5p, miR-518b i miR-520h en el primer trimestre d'embaràs estava associada amb un elevat risc de desenvolupar preeclàmpsia. Noguier-Dance *et al.* 2010 van descobrir que el promotor de la Polimerasa-II estava situat en una illa CpG a uns 17 Kb *upstream* del primer microARN del clúster *C19MC* i que aquesta regió és l'encarregada de regular la seva expressió (regió ICR). Per tal d'estudiar els efectes funcionals dels resultats obtinguts, es podria estudiar l'expressió gènica dels microARN codificats per aquest clúster en placenta. A més es podria determinar la relació entre els nivells de metilació de l'ADN d'aquest clúster i el nivells de colesterol de la descendència durant la infantesa, adolescència i edat adulta per tal d'establir possibles relacions de causalitat.

En conjunt, aquests resultats preliminars indiquen que el metabolisme matern i el grau de metilació en les regions reguladores dels gens d'impressió genètica *DLK1-DIO3* i *C19MC* es troben relacionats en placenta, i com a conseqüència podrien afectar el desenvolupament endocrinometabòlic fetal.

6. CONCLUSIONS

To conclude:

- No significant differences were found in the methylation percentage of *DLK1-DIO3* and *C19MC* in placentas from control pregnancies and pregnancies with pregestational/gestational obesity.
- The methylation of the *DLK1-DIO3* correlates positively with maternal blood pressure (TAS and TAD, in Catalan) and the glyated hemoglobin of the mother. Methylation of the *C19MC* gene cluster correlates positively with insulin, total cholesterol and triglycerides of the mother.
- After correcting for multiple testing, only the maternal total cholesterol is associated with the methylation percentage in *C19MC*, explaining 43% of the variance.

BIBLIOGRAFIA

- Altobelli, G., Bogdarina, I. G., Stupka, E., Clark, A. J. L., & Langley-Evans, S. (2013). Genome-wide methylation and gene expression changes in newborn rats following maternal protein restriction and reversal by folic acid. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082989>
- Amihăesei, I. C., & Chelaru, L. (2014). Metabolic syndrome a widespread threatening condition; risk factors, diagnostic criteria, therapeutic options, prevention and controversies: an overview. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici Și Naturaliști Din Iași*, *118*(4), 896–900. Recuperat de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581945>
- Aviram, A., Hod, M., & Yogev, Y. (2011). Maternal obesity: Implications for pregnancy outcome and long-term risks-A link to maternal nutrition. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *115*(1). [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(11\)60004-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(11)60004-0)
- Banister, C. E., Koestler, D. C., Maccani, M. A., Padbury, J. F., Houseman, E.A., & Marsit, C. J. (2011). Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics*, *6*(7), 920–927. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16079>
- Bourque, D. K., Avila, L., Peñaherrera, M., von Dadelszen, P., & Robinson, W. P. (2010). Decreased Placental Methylation at the H19/IGF2 Imprinting Control Region is Associated with Normotensive Intrauterine Growth Restriction but not Preeclampsia. *Placenta*, *31*(3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.003>
- Burdge, G. C., & Lillycrop, K. A. (2014). Fatty acids and epigenetics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *17*(2), 156–161. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000023>
- Chango, A., & Pogribny, I. P. (2015). Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients*, *7*(4), 2748–2770. <https://doi.org/10.3390/nu7042748>
- Cheishvili, D., Petropoulos, S., Christiansen, S., & Szyf, M. (2017). Targeted DNA Methylation Analysis Methods. Barbara Stefanska & David J. MacEwan (ed), *Epigenetics and Gene Expression in Cancer, Inflammatory and Immune Diseases*, (p. 33–50). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6743-8>
- Cleaton, M. A. M., Dent, C. L., Howard, M., Corish, J. A., Gutteridge, I., Sovio, U., Gaccioli, F., Takahashi, N., Bauer, S.R., Charnock-Jones, D.S., Powell, T.L., Smith, G.C.S., Ferguson-Smith, A.C., & Charalambous, M. (2016). Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nature Genetics*, *48*(October), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ng.3699>
- Da Rocha, S. T. , Edwards, C. A., Ito, M., Ogata, T., & Ferguson-Smith, A. C. (2008). Genomic imprinting at the mammalian *Dlk1-Dio3* domain. *Trends in Genetics*, *24*(6), 306–316 . <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.011>
- Dejeux, E., El abdalaoui, H., Gut, I. G., & Tost, J. (2009). Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. *Methods in Molecular Biology*, *507*, 189–205. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-522-0_15
- Desai, M., Jellyman, J. K., & Ross, M. G. (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *International Journal of Obesity*, *39*(4), 633–641. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.13>
- Diplas, A. I., Lambertini, L., Lee, M. J., Sperling, R., Lee, Y. L., Wetmur, J., & Chen, J. (2009). Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics*, *4*(4), 235–240. [https://doi.org/9019 \[pii\]](https://doi.org/9019)
- Edwards, C. A., & Ferguson-Smith, A. C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(3), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.013>
- Edwards, C. A., Mungall, A. J., Matthews, L., Ryder, E., Gray, D. J., Pask, A. J., Shaw, G., Graves, J.A.M., Rogers, J., Dunham, I., Renfree, M.B., Ferguson-Smith, A.C., Bateman, A., Chen, C.K., Collins, J., Gilbert, J. Huckle, E., Griffith-Jones, S., Harrow, J., Jones, M., Larbaoui, M., Oliver, K., Scott, C., Sims S., Steward, C., Yang, J., Smits, G., Andrews, S., Beury, D., Krueger, C., Ivanova, E., McKendrick, I., Smith, P., Kelsey, G., & Reik, W. (2008). The evolution of the *DLK1-DIO3* imprinted domain in mammals. *PLoS Biology*, *6*(6), 1292–1305. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060135>
- Fernandez-Twinn, D. S., & Ozanne, S. E. (2010). Early life nutrition and metabolic programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1212*, 78–96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05798.x>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, *14*(10), R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., & Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: A review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *67*(1), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6>
- Kotlabova, K., Doucha, J., & Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation - identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of Reproductive Immunology*, *89*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.02.006>
- Laurent, L. C., Chen, J., Ulitsky, I., Mueller, F.-J., Lu, C., Shamir, R., Fan, J.-B., & Loring, J. F. (2008). Comprehensive microRNA

- profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence. *Stem Cells*, 26(6), 1506–16. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1081>
- Lawlor, D. A., Relton, C., Sattar, N., & Nelson, S. M. (2012). Maternal adiposity—a determinant of perinatal and offspring outcomes? *Nature Reviews Endocrinology*, 8(11), 679–688. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.176>
- Lee, K., Villena, J. A., Moon, Y. S., Kim, K. H., Lee, S., Kang, C., & Sul, H. S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *Journal of Clinical Investigation*, 111(4), 453–461. <https://doi.org/10.1172/JCI200315924>
- Li, M., Lee, K. F., Lu, Y., Clarke, I., Shih, D., Eberhart, C., Collins, V.P., Van Meter, T., Picard, D., Zhou, L., Boutros, P.C., Modena, P., Liang, M.L., Scherer, S.W., Bouffet, E., Rutka, J.T., Pomeroy, S.L., Lau, C.C., Taylor, M.D., Gajjar, A., Dirks, P.B., Hawkins, C.E., & Huang, A. (2009). Frequent Amplification of a chr19q13.41 MicroRNA Polycistron in Aggressive Primitive Neuroectodermal Brain Tumors. *Cancer Cell*, 16(6), 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.025>
- Lin, S.P., Youngson, N., Takada, S., Seitz, H., Reik, W., Paulsen, M., Cavaille, J., & Ferguson-Smith, A. C. (2003). Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nature Genetics*, 35(1), 97–102. <https://doi.org/10.1038/ng1233>
- Liz, J., & Esteller, M. (2016). lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.06.015>
- Medvedeva, Y. A., Khamis, A. M., Kulakovskiy, I. V., Ba-Alawi, W., Bhuyan, M. S. I., Kawaji, H., Lassmann, T., Harbers, M., Forrest, A.R.R., & Bajic, V. B. (2014). Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics*, 15(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-119>
- Monk, D. (2015). Genomic imprinting in the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4), S152–S162. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.032>
- Moon, Y. S., Smas, C. M., Lee, K., Villena, J. A., Kim, K., Yun, E. J., & Sul, H. S. (2002). Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1 / Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5585–5592. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.15.5585>
- Noguer-Dance, M., Abu-Amero, S., Al-Khtib, M., Lefèvre, A., Coullin, P., Moore, G. E., & Cavallé, J. (2010). The primate-specific microRNA gene cluster (*C19MC*) is imprinted in the placenta. *Human Molecular Genetics*, 19(18), 3566–3582. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq272>
- Pineles, B. L., Romero, R., Montenegro, D., Tarca, A. L., Han, Y. M., Kim, Y. M., Draghici, S., Espinoza, J., Kusanovic, J.P., Mittal, P., Hassan, S.S., & Kim, C. J. (2007). Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(3), 261.e1–261.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.01.008>
- Pi-Sunyer, X. (2009). The medical risks of obesity. *Postgraduate Medicine*, 121(6), 21–33. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.11.2074>
- Rasmussen, K. M. & Yaktine, A.L. (2009). *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Reynolds, C. M., Gray, C., Li, M., Segovia, S. A., & Vickers, M. H. (2015). Early life nutrition and energy balance disorders in offspring in later life. *Nutrients*, 7(9), 8090–8111. <https://doi.org/10.3390/nu7095384>
- Seki, Y., Williams, L., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2012). Minireview: Epigenetic programming of diabetes and obesity: Animal models. *Endocrinology*, 153(3), 1031–1038. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1805>
- Sekita, Y., Wagatsuma, H., Nakamura, K., Ono, R., Kagami, M., Wakisaka, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Ogura, A., Ogata, T., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (2008). Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nature Genetics*, 40(2), 243–248. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.51>
- Serman, L., Vlahović, M., Sijan, M., Bulić-Jakus, F., Serman, A., Sincić, N., Matijević, R., Jurić-Lekić, G., & Katusić, A. (2007). The Impact of 5-Azacytidine on Placental Weight, Glycoprotein Pattern and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Rat Placenta. *Placenta*, 28(8–9), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.04.001>
- Stelzer, Y., Wu, H., Song, Y., Shivalila, C. S., Markoulaki, S., & Jaenisch, R. (2016). Parent-of-Origin DNA Methylation Dynamics during Mouse Development. *Cell Reports*, 16(12), 3167–3180. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.066>
- Thum, T., Catalucci, D., & Bauersachs, J. (2008). MicroRNAs: Novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular Research*, 79(4), 562–570. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn137>
- Wallace, J. M., Horgan, G. W., & Bhattacharya, S. (2012). Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. *Placenta*, 33(8), 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.006>
- Waterland, R. A. (2014). Epigenetic Mechanisms Affecting Regulation of Energy Balance: Many Questions, Few Answers.

Annual Review of Nutrition, 34(1), 337–355.
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105315>

Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R., & Cooney, C. A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice. *The FASEB Journal*, 12(11), 949-957.

Yu, H.L., Dong, S., Gao, L.F., Li, L., Xi, Y.D., Ma, W.W., Yuan, L.H., & Xiao, R. (2015). Global DNA methylation was changed by a maternal high-lipid, high-energy diet during gestation and lactation in male adult mice liver. *British Journal of Nutrition*, 113(7), 1032–1039.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515000252>