



**CERCA DE BIOMARCADORS MICROBIANS CAPIL·LARS PER LA
CASPA I LA DERMATITIS SEBORREICA**

Helena Clavero Mestres

TREBALL FINAL DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

**Tutora acadèmica: Dra. M. Carmen Portillo, Dept. Bioquímica i Biotecnologia,
carmen.portillo@urv.cat**

En cooperació amb: Centre for Omic Sciences, Eurecat

Supervisora: Helena Torrell, Centre for Omic Sciences, helena.torrell@eurecat.org

Tarragona, Juny 2022

Jo, Helena Clavero Mestres, amb DNI 77791588-E, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 1 de juny de 2022

A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes and a few loops at the bottom.

ÍNDEX

1. Dades del centre.....	5
2. Resum i paraules clau.....	6
3. Introducció.....	7
3.1. Malalties del cuir cabellut.....	7
3.1.1. Dermatitis seborreica.....	7
3.1.2. Caspa.....	7
3.2. Estudis anteriors.....	7
3.3. Microbioma.....	8
3.4. Patologia.....	9
3.5. Tractaments.....	10
3.6. Metagenòmica i seqüenciació massiva.....	10
3.7. Regions ITS i gen 16S rRNA.....	12
4. Hipòtesis de treball i objectiu/s.....	13
5. Metodologia.....	14
5.1. Reclutament de pacients i presa i emmagatzematge de mostres.....	14
5.2. Extracció de DNA.....	15
5.3. Creació de llibreries.....	15
5.4. Seqüenciació massiva.....	18
5.5. Generació i anàlisi de dades.....	18
5.6. Prova amb mostres de fol·licles capil·lars.....	20
6. Resultats, discussió i relació amb els objectius plantejats.....	22
6.1. Extracció del DNA de les mostres de cuir cabellut.....	22
6.2. Creació de llibreries.....	23
6.3. Seqüenciació massiva.....	25

6.4. Comparació estadística entre els grups d'anàlisi.....	27
6.4.1. Bacteris.....	27
6.4.2. Fongs.....	31
6.5. Resultats de la prova amb fol·licles capil·lars d'un pacient sa.....	36
6.5.1. Extracció del DNA de les mostres de fol·licles capil·lars.....	36
6.5.2. Creació de llibreries.....	37
6.5.3. Seqüenciació massiva.....	38
6.5.4. Comparació taxonòmica entre mostres.....	38
7. Conclusions.....	41
8. Bibliografia.....	42
9. Autoavaluació.....	49
10. Annexes.....	50

1. Dades del Centre

Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, és el principal soci tecnològic de les empreses que treballen a Catalunya. Està format per representants d'empreses i institucions de referència en diferents sectors estratègics de l'economia catalana. Abarca una gran varietat de sectors de recerca i àmbits de coneixement. En l'àrea de la biotecnologia trobem les ciències òmiques i la nutrició i salut. La unitat de ciències òmiques es troba al COS (Centre de Ciències Òmiques) a la seu corporativa de Reus.

El COS és una instal·lació científica creada per la Universitat Rovira i Virgili l'any 2012, amb una infraestructura totalment equipada amb eines d'última generació per la genòmica, transcriptòmica, proteòmica i metabolòmica. Tot i pertànyer a la URV, des del 2017, la seva activitat la dirigeix una unitat mixta formada per investigadors d'Eurecat i la URV. Ofereix una gran diversitat de serveis de recerca de biomarcadors als camps de la salut, l'alimentació i el medi ambient, des d'assistència en el disseny de projectes fins a anàlisi de dades, integració de tecnologia i una varietat d'òmiques.

Un dels projectes de cerca de biomarcadors és el relacionat amb les malalties dermatitis seborreica i caspa, dirigit per la Dra. Helena Torrell, qui ha sigut responsable directe de la supervisió de les meves pràctiques de TFG al centre COS-Eurecat.

2. Resum i paraules claus

La dermatitis seborreica i la caspa són problemes dermatològics comuns que pateix la meitat de la població adulta i afecten les zones seborreiques del cos. S'han descrit com a malalties multi-patogèniques, relacionades sobretot amb la disbiosi de fongs i bacteris presents al cuir cabellut. Malgrat l'alta incidència, l'etiologia i patologia encara no es troben ben caracteritzades i cal més informació sobre la microbiota capil·lar, sobretot a nivell del bacterioma, per trobar nous marcadors microbians que serveixin com a dianes terapèutiques pel tractament d'aquestes malalties. La hipòtesi d'aquest treball és que es poden diferenciar pacients sans i pacients malalts amb caspa o dermatitis seborreica mitjançant biomarcadors microbians. Per verificar aquesta hipòtesi, s'amplificaran les regions V3 i V4 del gen 16S rRNA bacterià i les regions ITS pròpies del gen 18S rRNA eucariòtic de mostres de cuir cabellut de pacients sans, amb dermatitis seborreica i amb caspa, que posteriorment seran seqüenciades amb la plataforma Ion Torrent i es procedirà a un anàlisi estadístic per comparar els diferents grups d'estudi. Finalment, no s'han obtingut nous marcadors microbians i no hi ha cap diferència significativa en la diversitat beta entre els tres grups, però hi ha una disminució de la riquesa poblacional fúngica en els grups malalts.

Paraules clau: dermatitis seborreica, caspa, microbiota del cuir cabellut, *Malassezia*, seqüenciació massiva, Ion Torrent, metagenòmica, rRNA 16S i ITS.

3. Introducció

3.1. Malalties del cuir cabellut

3.1.1. Dermatitis seborreica

La dermatitis seborreica és un trastorn crònic inflamatori comú que afecta a les àrees seborreiques del cos, com poden ser el cuir cabellut, la zona retroauricular, aixelles i la part superior del pit i esquena, i dona símptomes com descamació, cabell greixós, inflamació, eritema, picor i, fins i tot, problemes psicològics (*Borda and Wikramanayake, 2015*). Addicionalment, és més freqüent en homes que en dones i afecta sobretot durant els tres primers mesos de vida, durant la pubertat i en l'edat adulta, majoritàriament entre els 40 i 60 anys. S'estima que té una prevalença de l'1% al 3% a la població general, del 3% al 5% en adults joves i del 40% al 80% en persones seropositives (*Mameri et al., 2017*). Tot i això, no s'ha vist cap relació amb cap grup ètnic en concret (*Sampaio et al., 2011*). S'han descrit causes molt diverses, com colonització fúngica, resposta immunitària, factors neurogènics o alteracions sistèmiques del pacient com pèrdua d'aigua epidèrmica, producció sebàcia i canvis en el pH, que poden alterar la microbiota i la seva composició (*Lin et al., 2020*).

3.1.2. Caspa

La caspa sense eritema afecta fins a un 50% de la població adulta i es limita al cuir cabellut, i implica picor i descamació de la pell sense inflamació visible. És molt similar a la dermatitis seborreica ja que comparteixen moltes característiques i responen a tractaments similars, i només difereixen en les zones que es veuen afectades i en la gravetat (*Saxena et al., 2018*). També afecta més a homes, comença a la pubertat, assoleix el màxim d'incidència i severitat als 20 anys i es fa menys freqüent entre les persones majors de 50 anys. A diferència de la dermatitis seborreica, la incidència de la caspa sí que varia entre els grups ètnics. Afecta entre el 81 i 95% dels afroamericans, entre el 66 i 82% als caucàsics i entre el 30 i 42% als xinesos (*Borda and Wikramanayake, 2015*).

3.2. Estudis anteriors

Els estudis anteriors genètics, bioquímics i investigacions en models animals i, més recentment amb l'ajuda de la seqüenciació massiva, indiquen que la dermatitis seborreica i la caspa són

malalties multi-patogèniques causades per la disbiosi de fongs i bacteris, amb més rellevància pels fongs. La disbiosi es defineix com un desequilibri dels microorganismes o una pèrdua de diversitat microbiana, portant a símptomes no desitjats o efectes negatius a l'organisme. Des de mitjans dels anys 50, s'ha relacionat al gènere *Malassezia* com un dels causants patogènics mitjançant biologia de cultius o biologia clàssica, i amb el temps, han anat apareixent noves tècniques que han confirmat aquesta hipòtesi.

Mitjançant tècniques de seqüenciació massiva, en els individus amb dermatitis seborreica s'ha detectat un increment de dos gèneres fúngics, *Malassezia* i *Mycosphaerella* i tres gèneres bacterians, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* i *Brevibacterium*, disminuint la diversitat microbiana respecte als individus sans. Pel que fa a la caspa, *Malassezia* i *Staphylococcus epidermidis* s'han associat anteriorment amb la malaltia. En els pacients sans predominen els fongs *Aspergillus*, *Ganoderma*, *Exidia*, *Pilatoporus* i *Engyodontiumi*, i els bacteris *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Proteus*, *Devosia* i *Bacteroides* (Lin et al., 2020).

Tots aquests s'han considerat com a biomarcadors taxonòmics potencials. Cal destacar que l'espècie *Malassezia* (inicialment anomenada *Pityrosporum ovalis*) ja va ser directament relacionada amb la malaltia als anys 30 i posteriorment també associada a altres malalties infeccioses (Moore and Kile, 1935). No obstant, són necessàries més investigacions per veure si a part de *Malassezia* hi ha altres microorganismes que participen més activament en aquestes patologies, sobretot a nivell de bacteris, que estan menys descrits en aquest camp d'estudi. Així s'aconseguirien marcadors microbians més específics per la dermatitis seborreica i la caspa.

3.3. Microbioma

Els microorganismes residents en una zona concreta de l'organisme que inclouen bacteris, fongs i virus, formen una comunitat complexa coneguda com a microbioma. Una àmplia gamma de factors externs, juntament amb les predisposicions genètiques a una microbiota particular, configuren el microbioma de la pell i donen lloc a altes variabilitats interpersonals. A part, cada comunitat microbiana té el seu hàbitat preferit dins dels diversos microambients de la pell, per tant, la microbiota present a les diferents zones de la nostra pell serà única. La diversitat i l'abundància de la flora microbiana cutània varia segons el gènere, l'edat, les estacions, l'ètnia i diversos factors d'estrès, entre altres (Costello et al., 2009; Akaza et al., 2010; Zapata et al., 2015).

Recentment, s'està fent evident el paper del microbioma de la pell en la salut de la pell mitjançant diversos mecanismes, com ara la modulació de la resposta immune de l'hoste i la protecció contra els patògens de la dermis (Byrd *et al.*, 2018). El microbioma de la pell interacciona amb els queratinòcits de l'hoste i el sistema immunitari innat provocant una secreció estimulada de pèptids antimicrobians, àcids grassos lliures, citocines i quimiocines, sent beneficiós per a l'hoste. Per tant, hi ha una correlació entre la microbiota i els factors de l'hoste (Xu *et al.*, 2016). Per exemple, *Malassezia restricta* és un fong lipòfil, les seves lipases hidrolitzen els triacilglicerols, component principal del sèbum, alliberant àcids grassos insaturats. A l'entrar en contacte amb la pell, aquests poden afectar a la funció de barrera del cuir cabellut i induir una resposta inflamatòria (Dawson *et al.*, 2007). *Staphylococcus* prospera a pH elevats, i en concret els productes de *S. aureus* causen un exsudat que incrementa el pH, creant un cercle viciós. També té la capacitat d'hidrolitzar el sèbum i proporcionar nutrients a *Malassezia* (Tanaka *et al.*, 2016; Rippke *et al.*, 2004).

3.4. Patologia

Una part de la patogènesi descrita els últims anys, tot i no estar del tot clara, sembla consistir en la secreció lipídica per les glàndules sebàcies a la superfície de la pell, seguida d'una colonització de *Malassezia* d'aquestes zones cobertes per lípids. El sèbum secretat pel cuir cabellut és una barreja de triglicèrids, diglicèrids, àcids grassos lliures, esqualens, èsters de colesterol, èsters de cera i colesterol. Els àcids grassos insaturats generats pel fong activen la resposta inflamatòria, i el sistema immunitari comença a generar citocines que estimulen la proliferació dels queratinòcits aberrants, donant lloc a anomalies de la capa còrnia. L'alteració de la barrera cutània resulta amb eritema, pruija i descamació clínicament evidents (Adalsteinsson *et al.*, 2020).

No obstant, encara hi ha molt que es desconeix, ja que hi participen molts factors intrínsecs i ambientals, i es necessiten més investigacions rigoroses per descriure millor la seva patogènesi i etiologia, especialment per enfocar els nous tractaments. A l'estar tan estretament relacionat amb l'hoste, podria presentar-se de diferent manera segons el pacient, que també podria respondre de formes diverses als tractaments convencionals segons els factors de predisposició. Tanmateix, encara es desconeix el paper exacte del microbioma del cuir cabellut, concretament del bacterioma, que és essencial per a una millor comprensió de la seva influència en la salut del cuir cabellut i la fisiopatologia dels trastorns relacionats.

3.5. Tractaments

Els objectius principals són disminuir els signes visibles de la malaltia, reduint la pruíja i l'eritema i mantenir la remissió amb teràpia a llarg termini. Els tractaments disponibles inclouen xampús i antifúngics tòpics, inhibidors de la calcineurina, que inhibeixen la síntesi de citocines proinflamatòries (*Gutfreund et al., 2013*), i corticoides. Amb l'ús prolongat d'aquests tractaments s'obté una reducció significativa dels símptomes, però amb resposta diferent segons el pacient i la severitat de les lesions, i podrien perdre efectivitat amb el temps. Els agents antifúngics tòpics, en format de crema o incorporats en xampús, són la teràpia de preferència per al tractament agut i a llarg termini de la dermatitis seborreica de la cara i el cos (*Kircik, 2010*). A més, l'ús d'aquests xampús una vegada a la setmana pot prevenir una recaiguda però presenten efectes adversos com irritació, pruíja, xerodermia i dermatitis (*Clark et al., 2015*).

Tenint en compte la importància dels tractaments antimicrobians contra la dermatitis seborreica, es proposa la cerca de biomarcadors taxonòmics o microbians perquè serveixin de diana terapèutica per a futurs tractaments. Si els nous tractaments tinguessin una diana més concreta, serien més efectius al no perjudicar a la resta de microbioma beneficiós present al cuir cabellut i no es disminuiria tant la diversitat poblacional. És d'interès ja que aquest microbioma protegeix l'organisme de les agressions externes i dels microorganismes invasors, i contribueix a la immunitat de l'hoste (*Dréno et al., 2016*).

3.6. Metagenòmica i seqüenciació massiva

Per trobar els diferents marcadors microbians que diferenciïn els pacients amb dermatitis seborreica i els controls sans, són imprescindibles els estudis metagenòmics. La metagenòmica és un camp d'investigació força nou centrat en l'anàlisi de dades de seqüenciació massiva de material genètic derivades de poblacions d'organismes tant bacterians, eucariotes com vírics. Els diferents organismes presents poden tenir nivells d'abundància molt diferents, així com diferents nivells de relació entre ells. La seqüenciació de nova generació és un gènere de tecnologies que permet seqüenciar de manera simultània i independent fins a milers de milions de fragments de DNA. El desenvolupament d'aquestes tècniques ha permès la producció de dades genòmiques d'alta qualitat i a preus assequibles, suficients per identificar i quantificar relativament unitats taxonòmiques microbianes.

Ion torrent és una plataforma de seqüenciació per síntesi, mitjançant l'addició d'un sol nucleòtid. Aquesta és més simple, ràpida i realitza més lectures que altres tecnologies de seqüenciació de nova generació, i presenta una eficiència similar al sistema Illumina (Goodwin *et al.*, 2016). La seqüenciació per Ion Torrent consta de dues parts. La primera consisteix en una clonació de molècules individuals de DNA en una perla (*bead*) dins d'una emulsió partint d'un pool equimolar (Rothberg *et al.*, 2011). A continuació, les mostres clonades es col·loquen en un xip de seqüenciació, en el cas de la microbiota s'utilitza el xip 530 que permet realitzar fins a 15 milions de lectures. S'afegeixen nucleòtids d'un en un als pous i es dona una reacció d'allargament. Les bases no incorporades es renten i s'afegeix la següent. La incorporació de bases provoca l'alliberament d'un protó, que produeix un canvi de pH de 0,02 unitats. Aquest canvi és detectat per un semiconductor d'òxid metàl·lic complementari (CMOS) integrat i un dispositiu de transistor d'efecte de camp sensible a ions (ISFET) i permet identificar el nucleòtid seqüenciat, tal com es mostra a la Figura 1 (Kanzi *et al.*, 2020).

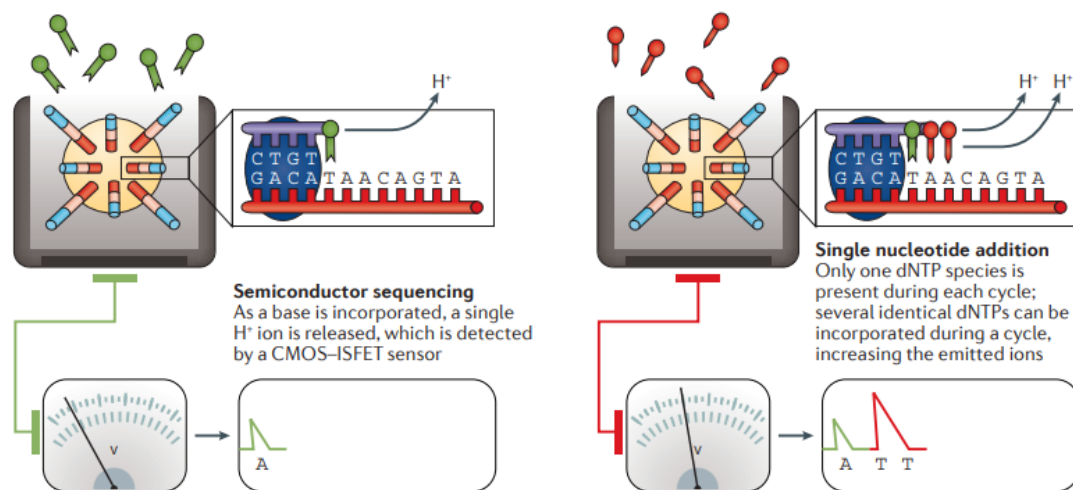


Figura 1. Representació de la tècnica Ion Torrent. Font: Goodwin *et al.*, 2016.

Els estudis basats en el gen de l'rRNA 16S i les seqüències espaiadores transcrites internes (ITS) ja han generat una gran quantitat de dades sobre comunitats microbianes de bacteris i fongs, respectivament. No cal seqüenciar tot el genoma, l'amplificació parcial per PCR de diferents gens ribosomals i la seva posterior seqüenciació és un dels mètodes més usats en metagenòmica per analitzar la diversitat microbiana.

3.7. Regions ITS i gen 16S rRNA

La unitat gènica de l'RNA ribosòmic nuclear eucariota es transcriu com un gran precursor que conté els gens rRNA 17/18S o nuclear ribosomal small subunit rRNA gene (SSU), 5.8S i 25/28S o nuclear ribosomal large subunit rRNA gene (LSU) separats per seqüències d'espaiadors transcrits externs i interns (ETS i ITS). Hi ha dos ITS, anomenats ITS1 i ITS2 de 350 i 400 pb, respectivament (*Toju et al., 2012*). Amb polimorfismes interespecífics, la curta longitud d'aquests fragments és fàcil d'amplificar, seqüenciar i analitzar (*Schoch et al. 2012*).

L'homòleg del gen 18S eucariota, el gen 16S rRNA procariota, s'utilitza sovint com a diagnòstic d'espècies de bacteris. Abasta uns 1.500 pb i s'estructura en regions altament conservades entre espècies, degut a la seva importància en la traducció, intercalades amb nou regions variables, V1 a V9. Aquestes regions variables són diferents en funció de l'espècie i, per tant, la seva seqüència permet identificar-les. Estudis recents han demostrat que l'ús de les regions V3 i V4 del gen bacterià 16S rRNA proporciona suficient informació taxonòmica per aportar resultats precisos a nivell d'espècie (*Wang et al., 2009*). Conseqüentment, s'han creat moltes bases de dades del gen 16S rRNA.

Les regions conservades poden servir per al disseny de *primers* i facilitar l'amplificació de les regions variables desitjades de totes les espècies presents en una mateixa mostra.

En aquest projecte es duu a terme l'anàlisi de la diversitat microbiana, tant de bacteris com fongs, de pacients amb dermatitis seborreica i caspa com de persones sanes, mitjançant la seqüenciació massiva amb la plataforma Ion Torrent de les regions variables V3 i V4 del gen 16S rRNA i la regió ITS2 del gen 18S rRNA per la recerca de marcadors microbians, importants tant en el diagnòstic com en el tractament.

4. Hipòtesis del treball i objectius

La hipòtesi del treball és que es poden diferenciar pacients sans i pacients malalts amb caspa o dermatitis seborreica mitjançant biomarcadors capil·lars microbians bacterians i fúngics obtinguts mitjançant seqüenciació massiva.

Per tant, l'objectiu principal del treball és la recerca de biomarcadors microbians aplicats a l'estudi de la microbiota del cuir cabellut, en concret biomarcadors de pacients amb dermatitis seborreica o caspa, per a que puguin servir de diana terapèutica per a futurs tractaments.

Per aconseguir el objectiu principal, es perseguiran dos objectius específics: i) familiaritzar-se amb el correcte processament de les mostres, és a dir, amb els passos d'extracció de DNA, creació de llibreries i seqüenciació per la plataforma Ion Torrent; ii) realitzar l'anàlisi bioinformàtica comparativa entre mostres procedents de pacients sans i pacients amb dermatitis seborreica o caspa.

Addicionalment, s'ha afegit l'objectiu de comprovar quin és el número de fol·licles capil·lars mínims per obtenir una bona caracterització i si poden servir per trobar nous biomarcadors.

5. Metodologia

5.1. Reclutament de pacients i presa i emmagatzematge de mostres

Es van reclutar 22 voluntaris, 11 homes i 11 dones, d'entre 20 i 45 anys, que es van separar en 3 grups diferents (control, caspa o dermatitis seborreica) tenint en compte el *Adherent scalp flaking score* (ASFS), per avaluar la gravetat de la descamació, i la presència o absència d'eritema (Taula 1) (Bacon et al., 2014). Cal remarcar que finalment només es van poder reclutar dos pacients amb dermatitis seborreica, i els resultats estadístics que s'obtinguin no seran prou significatius.

Taula 1. Voluntaris reclutats per l'estudi, grups d'estudi i número de subjectes a cada grup.

Grup	Voluntaris	
	Homes	Dones
Control	7	7
Caspa	3	3
Dermatitis seborreica	1	1
Total	22 subjectes	

Els voluntaris havien de seguir diferents criteris: no ser fumadors, no estar embarassada ni en període de postpart i/o lactància, no patir malalties cutànies de cap tipus, no consumir ni aplicar antibiòtics o antifúngics sistèmics 1 mes abans de la presa de mostres, no utilitzar cap tractament anticaiguda mínim durant 3 mesos abans del mostreig i no utilitzar xampús anticaspa o productes relacionats amb el cabell (tints, decolorants, allisat,...) en el cuir cabellut i/o cabell durant 3 mesos abans de la presa de mostres.

Per la presa de mostres es va seguir el mateix protocol en tots els subjectes. Els voluntaris no s'hauran de rentar el cabell en els dos dies anteriors i s'utilitza el mètode *swabing* per agafar mostres del cuir cabellut (fricció amb un hisop de cotó fluix estèril). Les mostres s'agafaran de la coroneta des del vèrtex (zona 1) i el clatell (zona 2). Per cada zona es recol·lectarà una àrea de 16 cm², on 8 segments de 4 cm de longitud s'aïllaran successivament, separant les fibres capil·lars amb una pinta estèril. Els hisops de cotó estèrils s'impregnaran amb PBS estèril i es fregaran al llarg de cada fragment fent 4 passades. Es repetirà a cadascuna de les 8 línies de manera no superposada. El hisop es col·loca al tub recol·lector i les mostres s'emmagatzemaran a -20°C fins al moment de l'extracció del DNA. El transport fins al laboratori s'ha de fer com

a màxim a 4°C. La presa de mostres la va realitzar un col·laborador extern i jo vaig ser la responsable de la resta de procediments.

5.2. Extracció de DNA de les mostres

El primer pas és realitzar l'extracció de DNA. Es parteix de les mostres de cèl·lules provinents del cuir cabellut agafades amb un *swab*, amb el DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen. Aquest kit d'extracció permet l'aïllament de DNA genòmic microbià de tots els tipus de sòls, preparant-lo per les aplicacions i passos posteriors. Tot i ser específic de sòl, és el més adequat per mostres microbianes, sobretot per fongs, ja que presenta una doble lisi (mecànica i química), ideal per trencar les parets fúngiques més gruixudes. A més, les columnes de sílice permeten la unió del DNA de les mostres, per la seva posterior elució una vegada que s'ha rentat, obtenint un alt nivell de puresa. Es segueixen les instruccions del fabricant que permeten: 1) lisi de les cèl·lules, 2) unió del DNA a la membrana de sílice, 3) rentat del DNA i 4) elució del DNA. Particularment, la part de cotó dels *swabs* amb les cèl·lules es separa del bastó i se submergeix sencera en medi de lisi. També s'ha afegit un pas addicional de lisi tèrmica a 56°C, una vegada s'ha afegit el primer reactiu de lisi, durant 10 minuts. Per últim, l'elució final es fa amb 50 µl d'aigua *nuclease-free* a 56 °C, i l'eluit es passa un segon cop per la columna (Protocol d'Extracció de DNA detallat a l'Annex I).

Una vegada feta l'extracció, es fa una quantificació del DNA amb el NanoDrop de Thermo Scientific per guiar-nos en els següents passos i veure la puresa de les mostres (Protocol d'ús detallat a l'Annex II). La quantificació mitjançant el NanoDrop es basa en l'espectrometria i mesura la variació de l'absorbància amb la longitud d'ona emprant només una microgota. Els àcids nucleics absorbeixen la llum UV a 260 nm a causa dels fragments de bases aromàtiques dins de la seva estructura, la qual cosa la converteix en l'estàndard per quantificar mostres de DNA o RNA. A més, el NanoDrop proporciona la relació d'Absorbància 260/280 que és un indicatiu de la puresa del DNA.

5.3. Creació de les llibreries

L'amplificació de la regió ITS2, en el cas dels fongs, o del gen 16S rRNA V3 i V4, en els bacteris, es realitza mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*) i *primers* de fusió. L'estratègia de *primers* de fusió està pensada per a crear llibreries genòmiques llestes per

seqüenciar a partir de la tècnica PCR. Aquests *primers* tenen uns *barcodes*, unes seqüències de nucleòtids de 10 pb, a l'extrem 5' que serà diferent per cada mostra i permetrà distingir-les quan es realitzi la seqüenciació. A més, també incorporen la seqüència adaptadora necessària en el procés de seqüenciació en la plataforma Ion Torrent. En resum, l'amplificació de cada mostra es realitzarà amb un *primer forward* diferent però amb el mateix *reverse*. S'ha de tenir en compte que els *barcodes* de les mostres que es seqüencien en un mateix *run* i, per tant, xip, siguin diferents per tal que no se solapin entre mostres. Els *primers*, les polimerases i els cicles de temperatura es basen en la bibliografia i anàlisis anteriors (Tridico et al., 2014; Torrell et al., 2020). Les PCR es realitzen mitjançant l'Applied Biosystems Veriti Dx Thermal Cycler. Els reactius per la preparació de les PCR i les condicions seran les que es mostren a les Taules 2 i 3.

Taula 2. Reactius per la preparació de les PCR de les regions V3, V4 del gen 16S i ITS.

Reactius	V3 i V4	ITS
<i>Polimerasa DreamTaq 2X (Thermo Scientific)</i>	12,5 µl	-
<i>Polimerasa HiFi Platinum SuperMix (Invitrogen)</i>	-	18,6 µl
<i>Primer Fw</i>	0,7 µl*	2 µl
<i>Primer Rv</i>	0,7 µl*	2 µl
DNA + H ₂ O (100 ng/µl)	5 µl	7 µl
BSA	1 µl	-
H ₂ O	5,1 µl	-

*en els *primers* per V3 i V4 cal realitzar una dilució 10 µl Stock / 190 µl H₂O

Taula 3. Cicles de temperatura per la PCR de les regions V3 i V4 del gen 16S i ITS.

V3 i V4			ITS		
Cicles	Temperatura	Temps	Cicles	Temperatura	Temps
	94°C	5 min		94°C	1 min
25	94°C	30 s	25	94°C	30 s
	57°C	30 s		52°C	30 s
	72°C	30 s		68°C	30 s
	72°C	10 min		68°C	10 min
	4°C	<i>hold</i>		4°C	<i>hold</i>

Els cicles de temperatura depenen de la polimerasa utilitzada per cada amplificació.

En definitiva, cada *primer forward* té una regió *adaptor*, seguida d'una regió *key* que uneix *adaptor* al *barcode* i un *spacer* abans de la regió *target* del *primer* que s'unirà a la seqüència diana del DNA per l'amplificació. Els primers *reverse* només consten de regió *adaptor*, *spacer* i *target* (Taula 4).

Taula 4. Primers utilitzats per amplificar V3, V4 i ITS

	Nom/ direcció	Adaptor	Key	Barcode	Spacer	Target (5'-3')
V3	<i>Forward</i>	CCATCTCATCCCTG CGTGTCTCCGAC	TCAG	CTAAGGTAAC*	GAT	CCTACGGGRSGCAGCAG
	<i>Reverse</i>	CCTCTATGGGCAGT CGGTGAT	-	-	CC	ATTACCGCGGCTGCT
V4	<i>Forward</i>	CCATCTCATCCCTG CGTGTCTCCGAC	TCAG	CTAAGGTAAC*	GAT	GTGCCAGCMGCCCGGTAA
	<i>Reverse</i>	CCTCTCTATGGGCA GTCGGTGAT	-	-	CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
ITS	<i>Forward</i> ITS1f	CCATCTCATCCCTG CGTGTCTCCGAC	TCAG	CTAAGGTAAC*	GAT	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
	<i>Reverse</i> ITS2_kyo2	CCATCTCATCCCTG CGTGTCTCCGAC	-	-	CC	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

*el *barcode* serà diferent per cada mostra, s'utilitzen 22 *barcodes* diferents per V3, per V4 i ITS.

Per evitar la seqüenciació de productes no desitjats, es carrega el resultat de la PCR en un gel d'agarosa a l'1,5% i es realitza una electroforesi amb 200V durant uns 30 minuts. El DNA es pot visualitzar mitjançant la funció de UV del transil·luminador Chemidoc XRS gràcies a que s'afegeix l'agent intercalant *SybrSafe* al gel, i es talla la banda que correspon a la mida del fragment desitjat comparant-ho amb el *Gene Ruler* 1 kb de ThermoScientific (marcador molecular). El producte de V3 és d'aproximadament 250 parells de bases, el de V4 és de 360 pb i el de ITS d'entre 200 i 700 pb, ja que s'ha de tenir en compte que poden sortir diferents bandes en una mateixa mostra a causa de les diferents espècies fúngiques presents, que poden presentar una llargada diferent de la regió ITS2 (*Yang et al., 2018*).

Les bandes obtingudes es retallen del gel d'agarosa i el DNA que conté es purifica amb el kit PCR Clean-up (DNA extraction from agarose gel) de Macherey Nagel i s'elueix amb aigua *nuclease-free* amb un volum final de 20 µl. Aquest kit de purificació afavoreix la dissolució de l'agarosa i així el DNA s'uneix a la membrana de sílice, que permet que es puguin eliminar els contaminants mitjançant rentats i, finalment, eluir el DNA (Protocol de Purificació detallat a l'Annex III).

A continuació, s'utilitza Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System per determinar la qualitat, la longitud i la concentració d'aquests productes, que a partir d'ara s'anomenaran llibreries. Es tracta d'un sistema de microelectroforesis automatitzada, que permet l'anàlisi de fragments de DNA o llibreries de 35 a 5000 pb en aproximadament un minut. A més, permet

calcular els valors de concentració mitjançant la comparació de l'àrea del pic de mostra amb la concentració coneguda del marcador superior. Cal obtenir la regió de molaritat (pmol/l) per la seva correcta seqüenciació (Protocol d'ús detallat a l'Annex IV).

5.4. Seqüenciació massiva

Es preparen els pools, que són barreges equimolars de les llibreries, per dur a terme la seqüenciació. S'utilitza un xip 530 que permet generar fins a 15M de lectures, l'amplificació clonal es realitza al Ion Chef (Life Technologies) i la seqüenciació es fa a l'equip Ion GeneStudio S5 (Life Technologies). La seqüenciació es realitza emprant 840 fluxos de nucleòtids i es calcula obtenir al voltant de 150.000 lectures per cada amplicó (16S i ITS2).

5.5. Generació i anàlisi de dades

Primer es fa un filtrat de qualitat, on s'eliminen les seqüències obtingudes en l'equip S5 de baixa qualitat i policlonals. L'anàlisi de les seqüències restants es fa amb el Software QIIME v2 (*Caporaso et al., 2010*) que separa les mostres segons el seu *barcode* i les converteix en fitxers individuals. S'agrupen els ASV (*amplicon sequence variant*) amb l'eina d'agrupament i es fa l'assignació de la taxonomia amb un blast amb el 97% d'homologia mitjançant la base de dades Silva (*Pruesse et al., 2007*). A partir d'aquí es crea d'un llistat amb les categories taxonòmiques trobades per cada nivell taxonòmic. En alguns casos pot passar que només es pugui especificar a nivell de gènere però no d'espècie.

Els resultats d'anàlisi de diversitat obtinguts a partir de la seqüenciació parcial del gen rRNA 16S o ITS del gen rRNA 18S s'agrupen segons l'anàlisi comparativa que s'hagi aplicat (*Torrell et al., 2021*):

Diversitat beta

La diversitat beta és un càlcul per determinar la diferència de diversitat entre mostres o ecosistemes tenint en compte la distribució global de totes les categories taxonòmiques que s'hi troben. En aquest cas, és més útil per comparar grups. Per quantificar la dissimilitud entre comunitats, es poden fer servir mètriques diferents, com: Bray-curtis es basa en l'abundància de les categories taxonòmiques comunes entre les mostres, Jaccard només considera la presència o absència de categories taxonòmiques i UniFrac té en compte la informació

filogenètica i l'abundància dels taxons (*Lozupone et al., 2011*), però no es pot realitzar per les ITS. Bray-Curtis i Unifrac són les més emprades en la comparació de poblacions microbianes.

En el gràfic de PCoAs (*Principal Coordinate Analysis*) a partir de la diversitat beta, com més separació presentin les mostres en l'espai, més dissimilitud presentaran entre elles. S'obtidrien clústers diferents en el cas que els grups experimentals tinguin comunitats bacterianes o fúngiques diferents.

Es fa un anàlisi amb els tests estadístics PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) i ANOSIM (*Analysis of similarities*) per determinar si aquestes comunitats són estadísticament diferents, el llinard del *p* valor significatiu s'estableix < 0.05 .

Diversitat taxonòmica

Es generen gràfics i taules per diversitat relativa per cada nivell taxonòmic (L1 domini, L2 fílum, L3 classe, L4 ordre, L5 família, L6 gènere, L7 espècie).

Els gràfics Barplots representen l'abundància relativa de cada categoria taxonòmica detectada per cada nivell i es construeixen a partir de taules d'abundància (per a cada nivell taxonòmic). Els valors d'abundància de cada categoria taxonòmica i per a cada nivell taxonòmic es comparen estadísticament amb el test de comparació de mitjanes Kruskal-Wallis amb la correcció Holm-Šidák. Un valor $p \leq 0,05$ es considera estadísticament significatiu.

Riquesa o diversitat alfa

La diversitat alfa és un càlcul per determinar quantes categories taxonòmiques diferents hi ha en una mostra o un ecosistema determinat i ens indica com de rica o diversa és. En el cas d'estudis de malalties és interessant fer el càlcul i la comparació d'aquests valors ja que, en alguns casos, es tendeix a una disminució de la diversitat poblacional de la microbiota.

Existeixen moltes mètriques per avaluar la diversitat alfa, en aquest cas s'ha calculat mitjançant la mètrica Shannon i la mètrica Chao1 que, a part de tenir en compte com de diferents filogenèticament són dues seqüències, també tenen en compte com de representades es troben en la mostra global. La diversitat serà major, com més alts siguin els valors. Mitjançant els valors obtinguts de diversitat alfa, es creen gràfics BoxPlots Alfa, on cada caixa representa un

grup experimental o una mostra. Amb el test de Kruskal-Wallis també s'obtenen els valors d'alfa diversitat significativament diferents entre els grups experimentals.

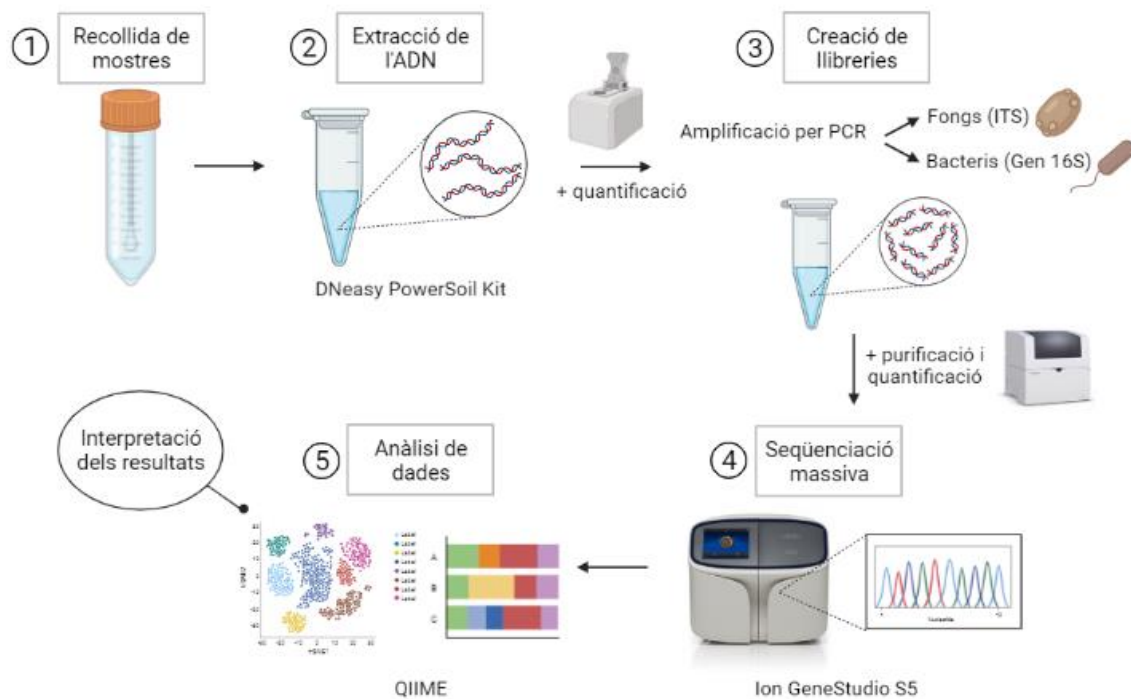


Figura 2. Diagrama de flux de la metodologia seguida en l'estudi.

5.6. Prova amb mostres de fol·licles capil·lars

Una vegada realitzat l'estudi amb mostres cel·lulars del cuir cabellut i en veure que en moltes de les mostres ha estat difícil obtenir suficient DNA bacterià, es vol provar si la microbiota dels fol·licles capil·lars són bons marcadors de salut del cuir cabellut i si s'obtenen millors resultats i nous biomarcadors respecte els obtinguts amb les cèl·lules recollides mitjançant la tècnica *swab*, que és la més utilitzada. La seva funció de reservori i diferenciació cap a parts més profundes, converteixen als fol·licles capil·lars en un lloc de comunicació intensa amb l'entorn extern i cal tenir en compte que el microbioma difereix entre les diferents parts dels fol·licles (Polak-Witka *et al.*, 2020). El que es vol determinar és si l'ús dels fol·licles capil·lars és una bona tècnica de mostreig per enfocar els estudis futurs sobre marcadors de salut del cuir cabellut.

En aquest cas, es fa la recollida de mostres de fol·licles capil·lars per punció, que resulta una tècnica més invasiva. S'agafa tant la part infrainfunibular com el bulb, representats a la Figura 3. S'obtenen 24 fol·licles capil·lars d'un mateix pacient sa, que es divideixen en 5 i 19

fol·licles. Al ser una tècnica d'obtenció de mostres més invasiva, es vol comprovar quin és el número de fol·licles capil·lars mínims per obtenir una bona caracterització.

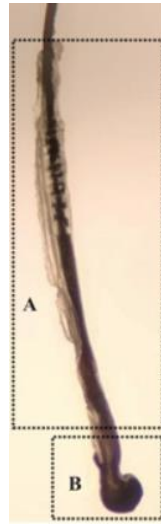


Figura 3. Imatge d'un fol·licle capil·lar arrancat del cuir cabellut. A) part infrainfunibular i B) bulb. Font: *Polak-Witka et al., 2021*.

El procediment per a l'extracció de DNA i creació de llibreries és el mateix que amb les mostres agafades amb *swab*, tot i que en aquest cas només s'ha amplificat la regió V4 del gen rRNA 16S i ITS, seguint el mateix protocol de les Taules 2, 3 i 4. A més, la primera quantificació després de l'extracció de DNA de les mostres, es fa amb el fluorímetre Qubit™ de Invitrogen amb els reactius Qubit™ 1X dsDNA HS Assay, que permet quantificar valors de concentració més baixos i precisos que amb el NanoDrop. Aquesta tècnica es basa en la fluorescència que proporcionen els colorants dels diferents kits, que emetran senyal només quan s'uneixen a les molècules diana específiques, fins i tot a concentracions baixes, minimitzant així els efectes dels contaminants, inclòs el DNA o l'RNA degradats (Protocol d'ús detallat a l'Annex V).

6. Resultats, discussió i relació amb els objectius plantejats

6.1. Extracció del DNA de les mostres de cuir cabellut

Quantificació del DNA amb NanoDrop

Després de l'extracció, interessa obtenir una concentració elevada de DNA en les mostres i que sigui el més pura possible. Per això, es va mesurar amb el espectrofotòmetre NanoDrop la concentració i la relació d'absorbància 260/280 com indicador de qualitat del DNA (Taula 5).

Taula 5. Concentració de DNA de les mostres després de l'extracció amb el DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen, mesurades amb el NanoDrop. La relació d'absorbància 260/280 ($A_{260/280}$) és un bon indicador de la puresa de la mostra.

Grup	Mostra	Àcids nucleics (ng/μl)	$A_{260/280}$	Grup	Mostra	Àcids nucleics (ng/μl)	$A_{260/280}$
Sa	1	24	1,25	Sa	12	21	1,17
Sa	2	30	1,64	Sa	13	11	1,04
Sa	3	12	1,09	Sa	14	11	0,67
Sa	4	14	1,55	Caspa	15	16	2,36
Sa	5	13	1,73	Caspa	16	16	3
Sa	6	11	1,91	Caspa	17	51	1,40
Sa	7	27	1,29	Caspa	18	17	1,4
Sa	8	25	1,19	Caspa	19	29	1,37
Sa	9	17	1,65	Caspa	20	57	1,96
Sa	10	29	1,21	Dermatitis	21	18	1,09
Sa	11	21	1,35	Dermatitis	22	19	1,31

S'obtenen uns valors de concentració més o menys dins d'un mateix rang per totes les mostres, i el valor de relació d'absorbància 260/280 mostra que la gran majoria de mostres de DNA no contenen contaminació proteica.

6.2. Creació de lliberies

Visualització del producte de PCR

Una vegada realitzada la PCR amb els primers específics per bacteris (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3' i 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3' per la regió V3 i 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' i 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' per la regió V4) i per fongs (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' i 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), els resultats de PCR s'analitzen per electroforesis per verificar que s'ha amplificat la regió desitjada (Figura 4).

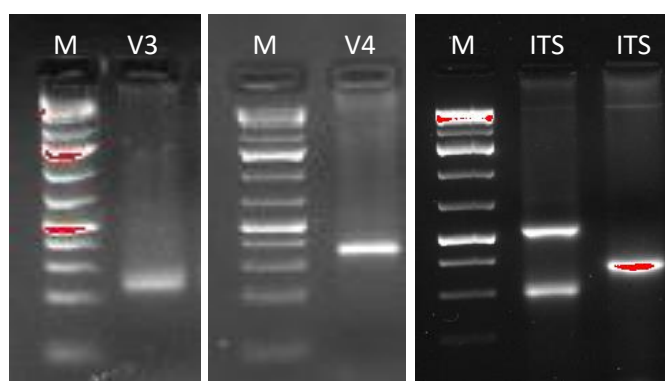


Figura 4. Imatge d'exemple de tres electroforesis on es mostra la comparació entre els productes de PCR quan s'ha amplificat V3 (250 pb), V4 (360 pb) i ITS (entre 200 i 700) amb el *Gene Ruler* (primer carril de cada imatge, M). Les àrees vermelles indiquen una gran concentració. Es pot observar que en el cas de les ITS es poden obtenir diversos resultats, depenent de les diferents espècies fúngiques presents en una mateixa mostra.

En la majoria de casos es van obtenir bandes visibles, tot i que bastant subtils. Es van repetir les PCR de les mostres que no presentaven bandes en l'electroforesi amb les mateixes condicions.

Control de qualitat i quantificació de les lliberies

Després de la purificació de les bandes d'agarosa, cal analitzar la qualitat de les lliberies mitjançant Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System, que mesura la longitud i freqüència dels fragments amplificats (Taula 6).

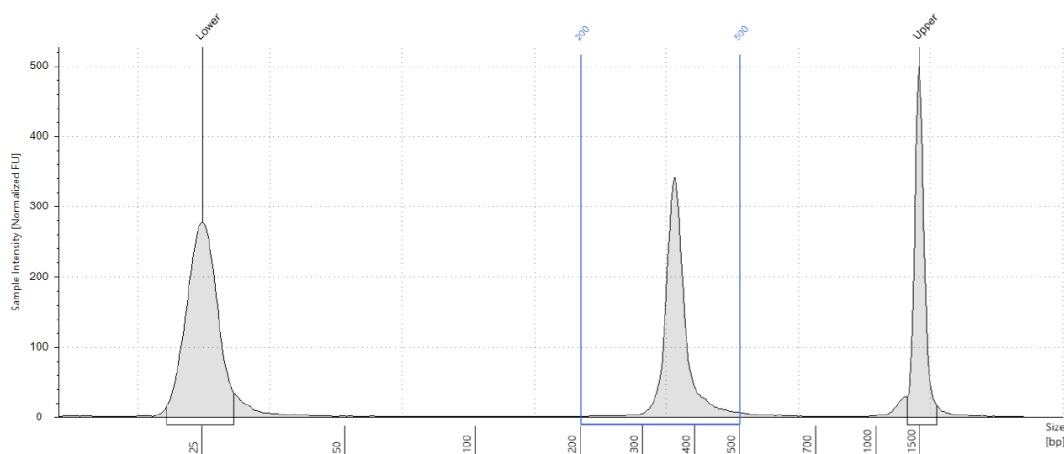


Figura 5. Exemple d'electroferograma de la mostra 13 amb amplificació de la regió V4. L'eix de les abscisses (x) correspon a la mida en parells de bases i el de les ordenades (y) a la intensitat de la mostra en [FU], unitats de fluorescència. S'inclouen el marcador inferior i superior. En aquest cas s'ha acotat entre les regions de 200 i 500 parells de bases (color blau), amb fragments d'una mida mitja de 368 parells de bases, obtenint així una molaritat de 1430 pmol/l.

Mitjançant aquest mètode quedaria demostrada la integritat de les llibreries per l'amplificació de fragments de la mida esperada i amb prou concentració. Es considera 100 pM com la concentració mínima per afirmar que és una bona llibreria.

Taula 6. Resultats obtinguts en la quantificació de les mostres realitzades amb el Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System. El rang seleccionat per obtenir la regió de molaritat en les mostres on s'ha amplificat V3 i V4 és de 200 a 500 pb i ITS de 200 a 700 pb.

Grup	V3		V4		ITS	
	Mostra	Regió de molaritat (pmol/l)	Mostra	Regió de molaritat (pmol/l)	Mostra	Regió de molaritat (pmol/l)
Control	1	-*	1	376	1	-
	2	-	2	1070	2	681
	3	-	3	-	3	-
	4	-	4	-	4	-
	5	-	5	-	5	-
	6	-	6	-	6	-
	7	-	7	-	7	-
	8	-	8	-	8	-
	9	-	9	-	9	-

	10	-	10	-	10	-
	11	-	11	-	11	-
	12	-	12	-	12	-
	13	-	13	1430	13	642
	14	574	14	364	14	-
	15	550	15	750	15	2650
	16	-	16	603	16	123
Caspa	17	-	17	526	17	480
	18	1020	18	470	18	449
	19	-	19	875	19	552
	20	-	20	598	20	250
	21	-	21	555	21	264
Dermatitis seborreica	22	-	22	745	22	1030

*les mostres amb caselles amb “-“ no es van amplificar de la manera desitjada i no hi ha llibreries disponibles.

Tot i que no es va tenir gaire èxit en la PCR, es va purificar igualment el producte obtingut i, per tant, només es van obtenir les llibreries de les mostres que es troben quantificades a la Taula 6. Que les PCR no sortissin com s’esperava, tot i haver obtingut suficient DNA en l’extracció, es podria explicar si el DNA obtingut fos de l’hoste i no de la microbiota o que haguessin quedat inhibidors després de l’extracció que no permetessin l’amplificació per PCR.

6.3. Seqüenciació massiva

Per tant, només es van acabar seqüenciant dues mostres de cada grup, indicades a la Taula 7.

Taula 7. Mostres seqüenciades de cada grup.

Grup	Mostres/pacients
Sa	1 i 2
Caspa	19 i 20
Dermatitis seborreica	21 i 22

Les lectures obtingudes de cada mostra seqüenciada passen per un filtrat de qualitat. A la Taula 8 es mostren les lectures totals obtingudes per mostra i per grup, les que s'obtenen després del filtrat de qualitat i finalment les que no són quimèriques, que seran les que s'utilitzaran per la comparació estadística. També s'han afegit el número de seqüències diferents que s'han obtingut per fongs i per bacteris.

Taula 8. Lectures per mostra obtingudes per la seqüenciació massiva i lectures en cada pas del filtrat.

	Grup	Mostra	Lectures totals	Lectures filtrades	% de lectures filtrades	Lectures no quimèriques*	% de lectures no quimèriques	Seqüències diferents		
Bacteris	Caspa	19	153370	109192	71,2	105855	69,02	2861		
		20	88172	55911	63,41	53834	61,06			
	Dermatitis	21	5884	1681	28,57	1397	23,74			
		22	188996	127368	67,39	122730	64,94			
	Sa	1	1141374	992104	86,92	987068	86,48			
		2	1011559	872604	86,26	818117	80,88			
	Fongs	Caspa	19	41074	8149	19,84	8102		19,73	129
			20	27613	7012	25,39	6971		25,25	
Dermatitis		21	336	51	15,18	37	11,01			
		22	13606	3632	26,69	3573	26,26			
Sa		1	382910	270939	70,76	270522	70,65			
		2	1500	1305	87	1098	73,2			

*les lectures quimèriques són aquelles seqüències formades per dues o més seqüències biològiques unides incorrectament. Això passa sovint durant les reaccions d'amplificació per PCR.

Cal tenir en compte que el nombre de lectures obtingudes i la seva qualitat també influirà en els resultats de la comparació estadística entre els tres grups.

En comparació, les llibreries bacterianes han obtingut un major número de lectures que les fúngiques. A més, les lectures dels grups caspa i dermatitis són de molt més baixa qualitat que les del grup sa, sobretot pels fongs. També és important destacar que s'han detectat moltes més

seqüències diferents per bacteris que per fongs, el que ja indica una menor diversitat en les mostres fúngiques a nivell general. Una de les mostres de fongs del grup dermatitis presenta molt poques lectures i de baixa qualitat, fent que al passar pels filtres només es puguin utilitzar 37 de les lectures per l'anàlisi posterior.

6.4. Comparació estadística entre els grups d'anàlisi

Finalment, només es van utilitzar dos individus de cada grup per realitzar l'anàlisi comparatiu.

Els resultats d'anàlisi de diversitat obtinguts es representen de diferents maneres segons l'anàlisi comparatiu que s'apliqui i es divideixen en comunitat bacteriana i fúngica.

6.4.1. Bacteris

Diversitat beta

Es fa servir la mètrica de Bray-Curtis per realitzar els gràfics d'anàlisi de components principals, ja que la mètrica Unifrac no ens serveix per les ITS (poblacions fúngiques), i així s'utilitza la mateixa mètrica en tota la comparació estadística.

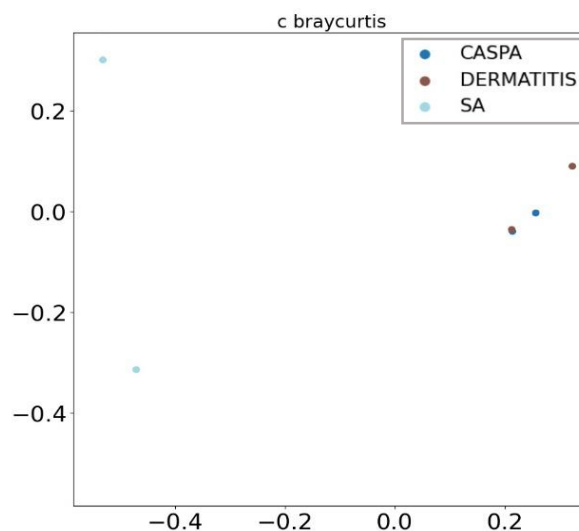


Figura 6. Gràfic PcoAs mitjançant la mètrica Bray-Curtis de les comunitats bacterianes, ens mostra la dissimilitud entre comunitats.

Els resultats indiquen que en quant als bacteris (Figura 6), les mostres dels grups caspa i dermatitis estan més relacionades entre elles ja que es troben més properes i, fins i tot, una mostra de dermatitis i una de caspa es superposen. En canvi, les dues mostres del grup sa són

molt diferents entre elles i amb els altres grups. També és normal que els pacients sans presentin major diferència entre elles, ja que la microbiota, tot i que habitualment hi sol haver una predisposició a que hi hagi uns microorganismes concrets depenent de les característiques de cada zona topogràfica, varia interpersonalment i depèn de molts factors.

Les proves estadístiques PERMANOVA i ANOSIM per comparar diferències entre comunitats poblacionals s’han fet seguint la mètrica Bray-Curtis (Taula 9). Tot i aconseguir valors p baixos, cap dels dos valors obtinguts per cada test és $\leq 0,05$ i, per tant, no hi ha diferències significatives entre les comunitats bacterianes.

Taula 9. Resultats de les proves estadístiques PERMANOVA i ANOSIM mitjançant la mètrica Bray-Curtis per les comunitats bacterianes. Un valor de $p \leq 0,05$ indica que els valors de diversitat beta són significativament diferents entre els grups comparats.

Nom del test estadístic	PERMANOVA	ANOSIM
	Pseudo-F	R
Número de mostres	6	6
Número de grups	3	3
Valor p	0,247	0,188

Les dues proves es fan amb 100 permutacions (correcció per assegurar-se que l’ordre de les variables no afecta al resultat).

Diversitat taxonòmica

El gràfic Barplot (Figura 7) mostra que els grups caspa i dermatitis seborreica són més semblants entre ells que amb el grup sa i en els tres grups hi ha un percentatge similar de bacteris no identificats amb una representació $< 1\%$.

Sorpren que el gènere *Staphylococcus* que, anteriorment s’ha relacionat amb malalties del cuir cabellut, es trobi amb major abundància al grup sa (47,57%) respecte als grups de caspa (9,40%) o dermatitis seborreica (6,28%), tot i que també es trobi de manera habitual en la pell sana (Byrd et al., 2018).

La família *Dermacoccaceae*, amb un 5,29%, i el gènere *Bacteroides*, amb un 3,55% són la segona i la tercera categoria taxonòmica més representada en el grup sa, seguit de la família *Lachnospiraceae* amb una abundància del 3,32%. No obstant, *Dermacoccaceae* no s’ha trobat en els grups caspa o dermatitis i *Bacteroides* només hi té una representació del 0,07% i del 0,01%, respectivament.

En el grup caspa i dermatitis les categories amb major abundància són el gènere *Lawsonella* amb un 14,01% i 11,66%, *Lactobacillus* amb un 12,91% i un 12,85%, *Clostridium* amb un 8,01% i un 9,11%, la família *Lachnospiraceae* amb un 3,63% i un 5,35% i el gènere *Prevotella* amb un 3,94% i un 4,76%, respectivament.

Tot i això, no hi ha cap gènere que presenti un valor de significança $\leq 0,05$, possiblement degut al baix nombre de mostres comparades dins de cada grup, i també es pot veure influenciat per la diferència de lectures entre grups.

Els gèneres *Propionibacterium* i *Brevibacterium*, que també s'havien relacionat amb la dermatitis seborreica, no s'han trobat a les mostres analitzades i *Brevibacterium* només s'ha vist al grup sa amb una abundància del 0,4%. A més, mentre que *Bacteroides* és una de les categories taxonòmiques més presents en les mostres del grup sa, altres gèneres bacterians que s'havien trobat anteriorment a la microbiota de cuir cabellut de pacients sans, s'han trobat amb una abundància $< 1\%$, com *Pseudomonas* (0,04% al grup sa i 0,02% al grup caspa), *Hyphomicrobium* (0,0044% al grup dermatitis), *Proteus* (0,01% al grup sa) i *Devosia* (0,0007% al grup sa).

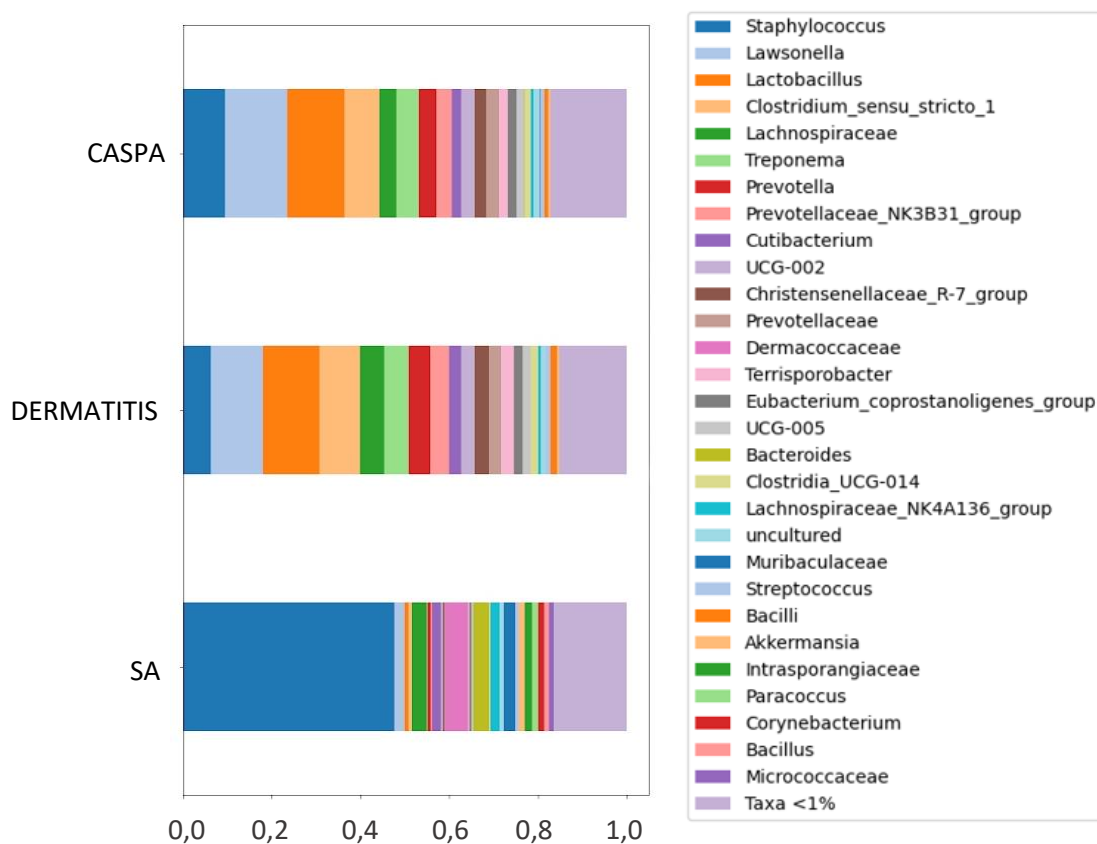


Figura 7. Gràfic Barplot a nivell de gènere bacterià (L6) on es representen les abundàncies relatives de cada categoria taxonòmica dels tres grups analitzats (Caspa, dermatitis i sa).

Per tant, es pot dir que en aquest estudi les categories taxonòmiques bacterianes associades anteriorment amb els pacients sans (*Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Proteus* i *Devosia*) no s'han trobat o hi són en abundàncies molt baixes, de manera que no es pot concloure que siguin biomarcadors microbians per pacients sans. Tot i això, el gènere *Bacteroides* és el tercer més representat en els pacients sans, però no presenta un valor de *p* significatiu.

No es pot determinar que *Staphylococcus* sigui un marcador en pacients amb dermatitis seborreica o caspa i *Propionibacterium* i *Brevibacterium*, que s'havien considerat possibles marcadors, no s'han trobat o s'han trobat amb una taxa < 1%.

La diferència entre els grups taxonòmics obtinguts i els trobats en estudis anteriors podria ser degut a les escasses mostres analitzades per grup o a que l'anàlisi s'ha dut a terme en poblacions diferents respecte els previs. Per exemple, l'estudi de *Lin et al.* (2020) es va realitzar a la Xina, mentre que aquest és el primer estudi que es realitza amb pacients residents de Catalunya. Per tant, caldria repetir el mateix estudi partint de més subjectes habitants de Catalunya per a obtenir resultats significatius.

Riquesa o diversitat alfa

La mitjana de la diversitat alfa entre els grups és una mica diferent i també varia segons la mètrica utilitzada (Figura 8). El grup caspa és el que té una diversitat alfa més similar entre les dues mostres, i el grup sa presenta una gran diferència entre les dues mostres. El que ens indica que una de les mostres del grup sa és molt menys diversa que l'altra. Es podria explicar pel fet que hi ha una mostra on un 68,53% de les lectures correspon a *Staphylococcus*, que també hauria fet pujar la mitjana d'abundàncies d'aquesta categoria taxonòmica.

En definitiva, no es veu una disminució de la diversitat de la comunitat bacteriana en els grups caspa i dermatitis respecte el grup sa.

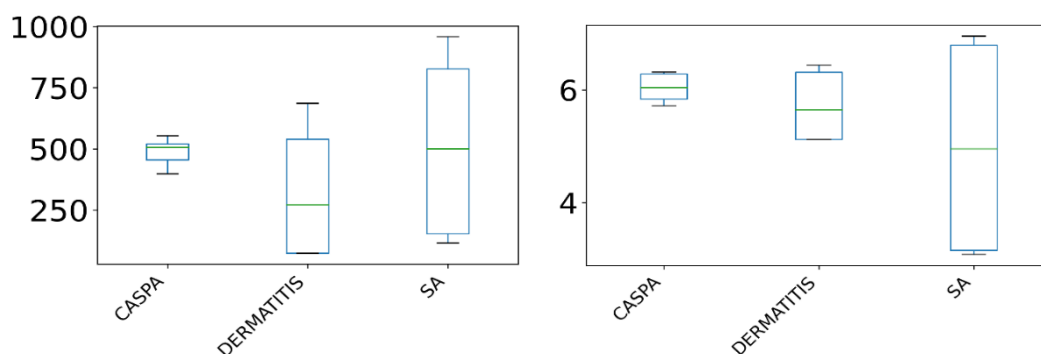


Figura 8. Gràfics de tipus BoxPlot on es representen les mitjanes de diversitat alfa bacterianes entre grups. A l'esquerra s'ha utilitzat la mètrica Chao1 i a la dreta, la mètrica Shannon.

Mitjançant el test de Kruskal-Wallis s'han comparat els valors d'alfa diversitat entre els grups experimentals mitjançant les mètriques Chao1 i Shannon. Els valors de significança obtinguts es mostren a la Taula 10. Cap dels valors p és estadísticament significatiu, per tant, no hi ha cap grup que presenti una diversitat alfa significativament diferent respecte als altres dos grups. En canvi, es veu que el grup caspa i grup sa presenten la mateixa riquesa poblacional segons la mètrica Chao1. Mitjançant la mètrica Shannon, es considera que els tres grups tenen la mateixa diversitat.

Taula 10. Valors de significança (p) obtinguts pel test Kruskal-Wallis amb les mètriques Chao1 i Shannon de les mostres de bacteris. Un valor de $p \leq 0,05$ indica que els valors d'alfa diversitat són significativament diferents entre els grups comparats. Els valors p s'han ajustat mitjançant la correcció de Bonferroni.

	Valor p	
	Chao1	Shannon
Grup 1 – Grup 2	0,425	1
Grup 2 – Grup 3	0,108	1
Grup 1 – Grup 3	1	1

Grup 1: Caspa; Grup 2: Dermatitis; Grup 3: Sa

6.4.2. Fongs

Diversitat beta

En el gràfic d'anàlisi de components principals pels fongs (Figura 9), s'observa que les dues mostres de caspa són pràcticament idèntiques però presenten dissimilitud amb els altres grups, és a dir, no hi ha cap grup que s'assembli amb els altres. Les dues mostres del grup dermatitis també es troben totalment superposades, indicant que no presenten dissimilitud i estan ben

agrupades. Les dues mostres del grup sa es troben molt separades entre elles, demostrant l'alta dissimilitud que presenten. És a dir, presenten tanta diferència entre elles com amb les mostres dels altres grups.

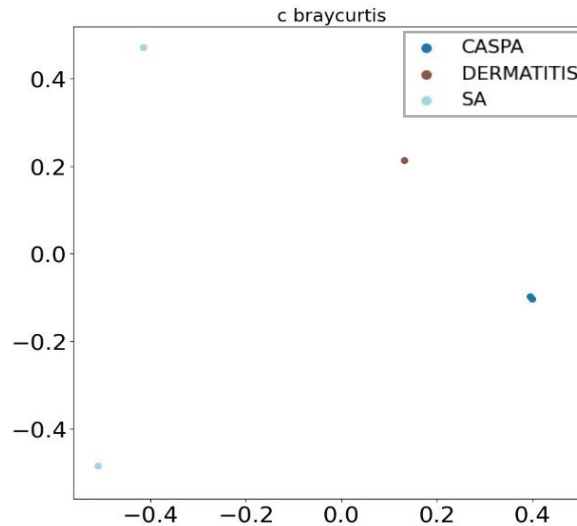


Figura 9. Gràfics PcoAs mitjançant la mètrica Bray-Curtis de les comunitats fúngiques, ens mostra la dissimilitud entre comunitats.

Com passa amb els bacteris, els valors de significança obtinguts pels testos estadístics PERMANOVA i ANOSIM són baixos i no es consideren estadísticament significatius.

Taula 11. Resultats de les proves estadístiques PERMANOVA i ANOSIM mitjançant la mètrica Bray-Curtis per les comunitats fúngiques. Un valor de $p \leq 0,05$ indica que els valors de diversitat beta són significativament diferents entre els grups comparats.

Nom del test estadístic	PERMANOVA	ANOSIM
	Pseudo-F	R
Número de mostres	6	6
Número de grups	3	3
Valor p	0,168	0,178

Les dues proves es fan amb 100 permutacions (correcció per assegurar-se que l'ordre de les variables no afecta al resultat).

Diversitat taxonòmica

Observant el gràfic Barplot a nivell de gènere fúngic (Figura 10) es veu que els grups caspa i dermatitis seborreica també són més semblants entre ells que amb el grup sa.

En els grups de caspa i dermatitis seborreica predomina el gènere *Malassezia* amb un 99% i 97,6%, respectivament, en comparació amb el grup sa que també presenta una gran abundància però només amb un 41,7%. Tot i això, el valor de *p* no és significatiu.

Un altre resultat a destacar és que al grup sa hi ha un 49,1% d'abundància de fongs que no s'han assignat i el gènere *Cystobasidium*, amb un 7,9%, mentre que a la resta de grups no s'ha detectat.

A part de *Malassezia* i *Cystobasidium*, no s'ha trobat cap altre fong que tingui una representació major a l'1%.

En el grup dermatitis s'ha trobat el gènere *Epicoccum* i l'ordre *Xylariales*, no presents en el grup caspa i grup sa, però amb abundàncies molt baixes de 0,18 % i 0,12% (taxa < 1%).

Pel que fa a *Mycosphaerella*, que també havia estat relacionat amb la dermatitis seborreica, no s'ha trobat en cap dels grups. Dels gèneres fúngics que anteriorment s'havien associat al cuir cabellut de pacients sans, *Aspergillus*, *Ganoderma*, *Exidia*, *Pilatoporus* i *Engyodontiumi*, només s'ha detectat *Ganoderma* al grup sa amb una abundància del 0,00003%.

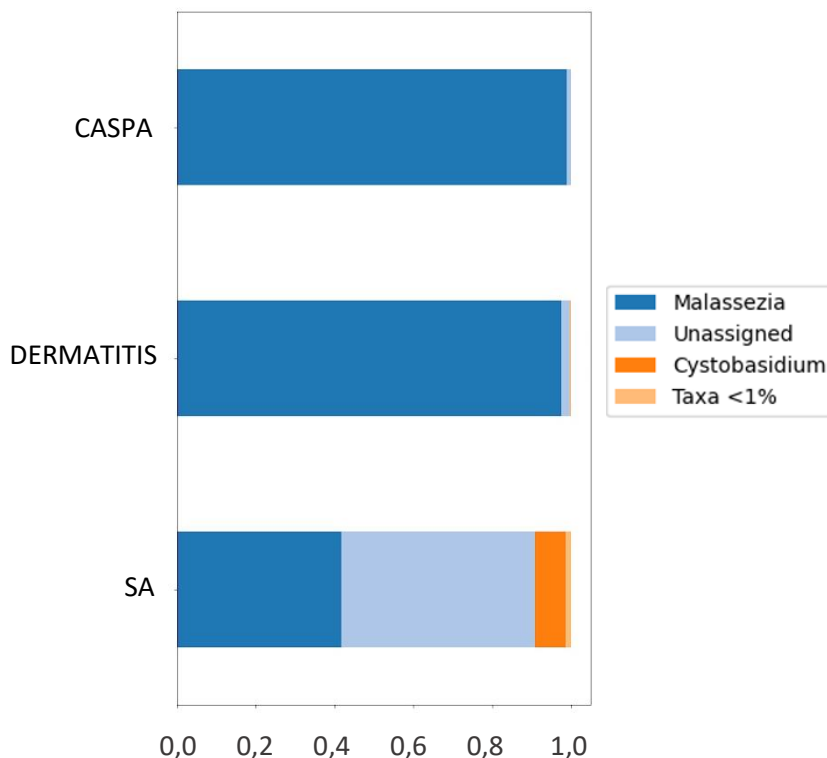


Figura 10. Gràfic Barplot a nivell de gènere fúngic (L6) on es representen les abundàncies relatives de cada categoria taxonòmica dels tres grups analitzats (Caspa, dermatitis i sa/control).

Tot i que els grups caspa i dermatitis sí que presenten diferències respecte el grup sa, no hi ha una *p* significativa per poder definir *Malassezia* com a biomarcador de caspa o dermatitis seborreica.

Al grup sa s'ha detectat una abundància del 7,9% de *Cystobasidium*, que a part de *Malassezia* és l'únic que s'ha trobat, però aquest gènere no s'ha associat mai al microbioma humà, sinó que les espècies descrites pertanyents al gènere *Cystobasidium* s'han trobat en diferents ambients naturals (Yurkov *et al.*, 2015; Turchetti *et al.*, 2018).

El gènere *Epicoccum*, que només s'ha trobat a les mostres de dermatitis seborreica, s'ha trobat en algun cas en el microbioma de l'arrel del cabell (Huang *et al.*, 2019) i s'ha associat al microbioma dels peus en pacients sans (Findley *et al.*, 2013; Adamczyk *et al.*, 2020). I l'ordre *Xylariales* s'ha lligat a mucosa inflamada però no amb microbiota de la pell (Lam *et al.*, 2019; Liguori *et al.*, 2016), però cap d'aquests dos s'ha relacionat amb la microbiota del cuir cabellut.

Cal tenir en compte que al grup sa hi ha un 49,1% d'abundància de fongs que no s'han assignat que, tenint en compte que només s'han seqüenciat dues mostres per grup, podria ser degut a que una de les mostres no s'ha analitzat correctament i ha fet variar la mitjana d'abundàncies de grup, a una limitació per part de la base de dades, ja que cap està del tot completa, o a una gran variació entre les lectures. Així que els resultats podrien no ser rellevants. La gran quantitat de fongs no assignats al grup sa en l'anàlisi de comunitats fúngiques podria ser el causant de la gran dissimilitud entre les mostres que s'observa en els gràfics de PCoAs (Figura 9). Tampoc s'han trobat cap dels altres gèneres associats al cuir cabellut sa.

Tenint en compte aquesta gran quantitat de seqüències no assignades, s'ha proposat fer un blast baixant el percentatge d'homologia per intentar associar-ho a algun grup taxonòmic. Fent això s'ha vist que una de les mostres de cuir cabellut sa és la que presenta més lectures filtrades de seqüències no assignades (el 98,2% de lectures totals). Per tant, segurament aquesta mostra s'hauria d'eliminar per realitzar l'anàlisi comparatiu, però si ho féssim ens quedaríem amb una sola mostra al grup sa i els anàlisis comparatius entre els grups d'estudi no serien significatius. De totes maneres, els resultats del blast mostren que 165 de les lectures no assignades tenen similituds amb la classe *Tremellomycetes* (fílum *Basidiomycota*) i 199 amb *Pezizomycotina*, subfílum *d'Ascomycota* filamentosos, però de les 714 lectures restants no s'ha obtingut cap resultat. La classe de *Tremellomycetes* només representa un 1% de les lectures assignades de l'altra mostra del grup sa, i el subfílum *Pezizomycotina* no s'hi ha detectat.

Veient aquests resultats, per als propers estudis es proposaria amplificar unes altres regions del gen rRNA 18S eucariòtic que no fossin les ITS i que presentessin una major resolució per aquests tipus de mostres. També es podria repetir l'estudi amb més mostres, ja que podria haver estat un problema aïllat, i determinar si l'amplificació de les regions ITS és un bon mètode de d'assignació taxonòmica per mostres del microbioma de cuir cabellut.

Així doncs, no hi ha cap categoria taxonòmica que presenti una p significativa i, per tant, pugui considerar-se biomarcador microbià ni de malaltia ni de cuir cabellut sa. A l'igual que amb les mostres bacterianes, podria ser degut a les poques mostres que s'han analitzat per grup o a que l'estudi s'ha realitzat en una població diferent a les anteriors. Per tant, també caldria repetir-ho amb més pacients residents de la zona per poder-ho comprovar.

Riquesa o diversitat alfa

Com era d'esperar basant-nos en la bibliografia (Tao *et al.*, 2021), hi ha una major riquesa poblacional fúngica al grup sa, i els grups caspa i dermatitis tenen una mitjana de diversitat alfa molt més baixa i més similar entre ells (Figura 11). La disminució de riquesa poblacional seria deguda a la colonització per part de *Malassezia* que s'ha descrit anteriorment, tot i que en aquest cas no es pot comprovar del tot ja que hi ha gran quantitat de fongs no assignats al grup sa.

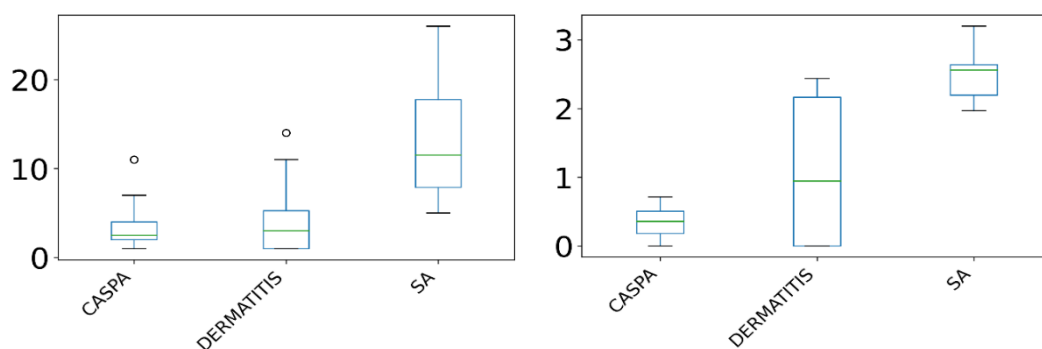


Figura 11. Gràfics de tipus BoxPlot on es representen les mitjanes de diversitat alfa fúngiques entre grups. A l'esquerra s'ha utilitzat la mètrica Chao1 i a la dreta, la mètrica Shannon.

Els valors de significança obtinguts pel test Kruskal-Wallis mitjançant les mètriques Chao1 i Shannon es mostren a la Taula 12. En aquest cas, els dos grups de pacients malalts (grup caspa i grup dermatitis) sí que presenten diferències significatives de riquesa respecte el grup sa. En

canvi, entre ells no hi ha diferències en quant a la diversitat que presenten les mostres. És a dir, les malalties sí que han causat una disminució en la riquesa poblacional significativa.

Taula 12. Valors de significança (p) obtinguts pel test Kruskal-Wallis amb les mètriques Chao1 i Shannon de les mostres de fongs. Un valor de $p \leq 0,05$ indica que els valors d'alfa diversitat són significativament diferents entre els grups comparats. Els valors p s'han ajustat mitjançant la correcció de Bonferroni.

	Valor p	
	Chao1	Shannon
Grup 1 – Grup 2	1	1
Grup 2 – Grup 3	< 0,001	< 0,001
Grup 1 – Grup 3	< 0,001	< 0,001

Grup 1: Caspa; Grup 2: Dermatitis; Grup 3: Sa

S'ha repetit el mateix procediment d'anàlisi comparatiu agrupant les mostres dels pacients amb caspa i dermatitis seborreica en un mateix grup, tant per fongs com per bacteris, per veure si d'aquesta manera s'obtenien resultats amb diferències estadísticament significatives. Però s'obtenen unes resultats similars als descrits anteriorment, i segueixen sense aparèixer diferències significatives en la diversitat beta o en les abundàcies taxonòmiques.

6.5 Resultats de la prova amb fol·licles capil·lars d'un pacient sa

6.5.1. Extracció de DNA de les mostres de fol·licles capil·lars

Quantificació del DNA amb Qubit

Com era la primera vegada que es provava d'extreure DNA de mostres de fol·licles capil·lars, es va preferir realitzar la quantificació dels àcids nucleics mitjançant Qubit, ja que permet mesurar concentracions molt més baixes que el NanoDrop i amb més precisió, arribant fins a una concentració mínima de 0,1 ng/ μ l. Això és així perquè la quantificació es basa en un fluoròfor que s'intercala entre la doble cadena de DNA, mentre que el NanoDrop mesura absorbància, que pot provenir d'altres fonts a banda del DNA de la mostra. Els resultats mostren que s'obtenen concentracions molt més baixes que amb les mostres recollides amb el mètode de *swabing* i, com era d'esperar, s'obté una major concentració amb l'ús de 19 fol·licles (Taula 13).

Taula 13. Concentració de DNA de les mostres després de l'extracció amb el DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen, mesurades amb el Qubit.

Mostra	Àcids nucleics (ng/µl)
1 (5 fol·licles)	0,4
2 (19 fol·licles)	3,3

6.5.2. Creació de llibreries

Visualització del producte de PCR

Pel que fa als productes de PCR de l'amplificació de les ITS, no s'obté cap banda visible que tingui la mida desitjada. No està clar si és degut a que el tampó de càrrega era defectuós, si la concentració de partida era massa baixa per amplificar-se de manera correcta o si s'ha amplificat alguna altra regió. En canvi, amb els productes de PCR de l'amplificació de V4 s'obtenen unes bandes lleugerament visibles (Figura 12) que corresponen a la mida desitjada. En aquest cas no es veu una gran diferència entre les dues mostres.

Una vegada les mostres van estar seqüenciades i analitzades, es va veure que els *primers* per V4 estaven contaminats i es va haver de tornar a realitzar la PCR i els passos següents. S'obtenen unes bandes bastant similars a la primera vegada i de la mida desitjada, que també es poden observar a la Figura 12.

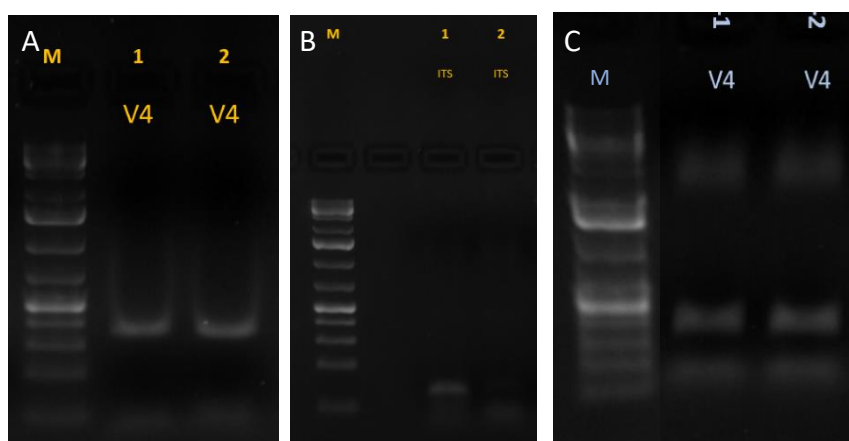


Figura 12. Imatges de l'electroforesi realitzada dels resultats de PCR de (A) V4 amb contaminació als *primers* (B) ITS de les mostres 1 (5 fol·licles) i 2 (19 fol·licles), (C) la repetició de la PCR amb els *primers* sense contaminació. El primer carril correspon al marcador (M).

Control de qualitat i quantificació de les llibreries

Les molaritats obtingudes són similars en les dues mostres analitzades, i són més altes a les obtingudes anteriorment amb el mètode *swabing* (Taula 14).

Taula 14. Resultats obtinguts de la quantificació de les mostres realitzades amb el Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System. El rang seleccionat per obtenir la regió de molaritat en les mostres on s'ha amplificat V4 és de 200 a 500 pb.

Mostra	Regió de molaritat (pmol/l)
1 (5 fol·licles)	3180
2 (19 fol·licles)	4230

Tot i que després de la purificació es va obtenir una major concentració de DNA amb 19 fol·licles, una vegada feta l'amplificació i purificació, les llibreries no tenen gaire diferència en quant a la regió de molaritat, obtenint valors força elevats en els dos casos. Això significa que el DNA que s'havia extret inicialment de les mostres corresponia a la microbiota i no a l'hoste, o que no hi havia inhibidors de PCR presents.

6.5.3. Seqüenciació massiva

Es van seqüenciar les mostres amb 5 i 19 fol·licles amb les regions V4 amplificades, ja que van ser les úniques de les que es va obtenir una llibreria amb una bona molaritat.

Les lectures obtingudes de cada mostra seqüenciada després de passar pel filtrat de qualitat són de 40113 per la mostra amb 5 fol·licles i 31937 per la mostra amb 19 fol·licles. I es van aconseguir 393 seqüències diferents per la mostra amb 5 fol·licles i 365 per la de 19 fol·licles. No es veu una diferència molt gran en quant als resultats de la seqüenciació massiva entre les dues mostres.

6.5.4. Comparació taxonòmica entre mostres

Pel que fa a la diversitat microbiana (Figura 13), els resultats no quadren amb un pacient sa. Alguns dels bacteris més comuns de la microbiota capil·lar en pacients sans no s'hi troben gaire representats, com *Bacteroides* (2,19% amb 5 fol·licles i 1,59% amb 19 fol·licles) i *Pseudomonas* (0,07% amb 5 fol·licles i 0,04% amb 19 fol·licles).

Per exemple, *Lachnospiraceae*, que és un dels gèneres més representat, s'ha associat amb acné (Shi et al., 2021) i en models animals s'ha relacionat amb la calvicie, juntament amb *Lactobacillus*, *Ruminococcus* i *Prevotella*, però en la microbiota intestinal (Barquero-Orias et al., 2021). I *Lactobacillus*, s'ha trobat anteriorment en el cuir cabellut de pacients sans i els seus productes de fermentació s'han utilitzat com a tractament per l'acné i caspa (Reygagne et al., 2017; Kwon et al., 2014). *Lawsonella* s'ha vist en altres estudis més present en la part infundibular que en el bulb de pacients sans (Polak-Witka et al., 2021). Es podria explicar si en l'anàlisi de 19 fol·licles s'hagués agafat més part infundibular que en el de 5 fol·licles.

Que *Staphylococcus* es trobi en una taxa < 1% i només en la mostra amb 19 fol·licles pot ser degut al seu tipus de metabolisme, ja que són anaerobis, i podria ser que fossin capaços de viure a la superfície del cuir cabellut, però en zones més profundes, com els fol·licles capil·lars, no tinguin suficient oxigen.

Però, en definitiva, no s'observen diferències taxonòmiques entre 5 i 19 fol·licles, és a dir, que utilitzar menys fol·licles no fa perdre riquesa poblacional.

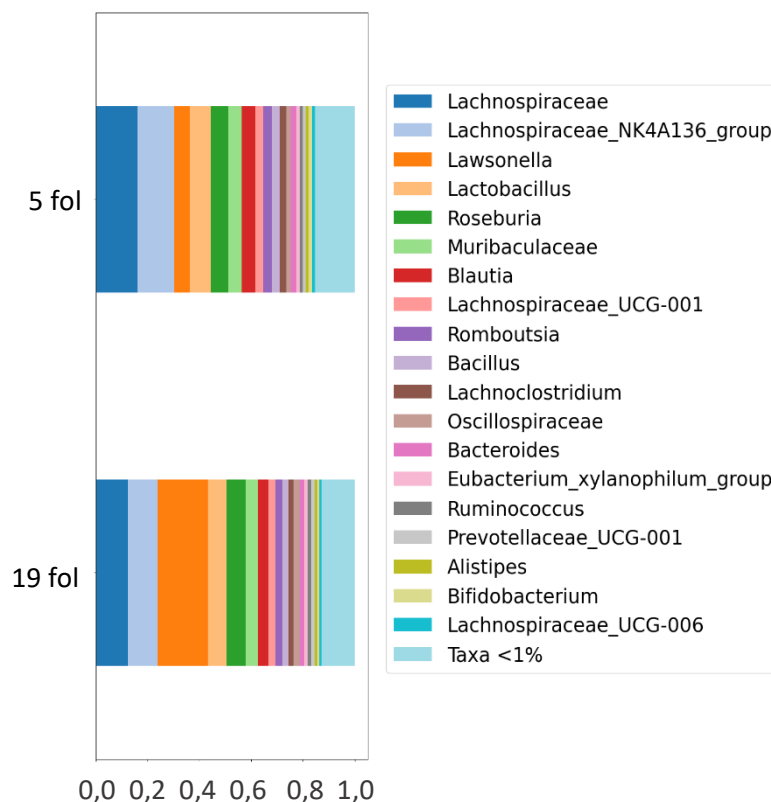


Figura 13. Gràfic Barplot a nivell de gènere bacterià (L6) on es representen les abundàncies relatives de les dues mostres analitzades (mostra amb 5 fol·licles i mostra amb 19 fol·licles)

Utilitzant 5 fol·licles s'ha aconseguit obtenir una llibreria amb una bona molaritat, molt semblant a la que s'ha obtingut amb 19 fol·licles. I tenint en compte que no s'han obtingut diferències significatives en les abundàncies taxonòmiques, potser seria millor agafar més de 5 fol·licles per pacient per assegurar-se que inicialment s'aconseguirà una major concentració de DNA per l'amplificació, tant de V4 com de ITS.

Cal ser conscients de les limitacions d'aquesta comparació, com que només s'ha utilitzat un subjecte i que no s'ha comparat amb la microbiota obtinguda pel mètode del hisop del mateix pacient. Per tant, una vegada s'ha pogut establir que 5 fol·licles són suficients per analitzar la diversitat bacteriana, el següent pas per a futurs estudis seria comparar estadísticament la microbiota del fol·licle capil·lar amb la microbiota de cuir cabellut recollida amb la tècnica del hisop.

6. Conclusions

S'ha aconseguit generar llibreries per la seqüenciació massiva amb la plataforma Ion Torrent de qualitat suficient de les mostres dels tres grups d'estudi, malgrat que, com no s'han pogut crear llibreries de totes les mostres, fa posar en dubte que el mètode d'extracció amb hisop sigui el més adequat i, per això, ens interessa trobar una nova tècnica de mostreig, com poden ser els fol·licles.

No obstant, no s'han trobat diferències significatives per cap gènere bacterià o fúngic entre els pacients sans i els malalts, tant pacients amb caspa com dermatitis, tot i presentar diferències d'agrupació de les mostres basades en els la diversitat beta i la diversitat taxonòmica. Per tant, no s'han pogut identificar marcadors bacterians o fúngics per individus sans o malalts, ni s'han observat els grups taxonòmics majoritaris associats als tres grups en estudis anteriors. No obstant, cal destacar que s'han trobat diferències de diversitat alfa significatives, on el grup sa presenta una comunitat microbiana eucariòtica més rica que els altres dos grups.

En quant al mètode alternatiu de mostreig basat en fol·licles capil·lars, es pot concloure que 5 fol·licles per mostra són suficients per obtenir una bona llibreria i analitzar la diversitat bacteriana, però es proposa partir de més fol·licles per assegurar-se que hi ha suficient DNA inicial.

Al llarg de l'estudi s'han presentat diverses limitacions que han dificultat poder obtenir resultats concloents. Com, per exemple, les poques mostres que s'han pogut seqüenciar i utilitzar per la comparació estadística, la diferència de lectures entre grups i que una mostra d'un pacient sa presenta un 98,2% de fongs no identificats.

Per això, als propers estudis es proposa utilitzar més subjectes per grup d'estudi, utilitzar altres regions del gen 18S eucariòtic per obtenir una major resolució a l'hora d'assignar els grups taxonòmics i comparar estadísticament la diversitat microbiana de les dues tècniques de mostreig utilitzades.

8. Bibliografia

- Adamczyk, K., Garnarczyk, A., Antończak, P., & Wcisło-Dziadecka, D. (2020). The foot microbiome. *Journal of cosmetic dermatology*, 19(5), 1039–1043. <https://doi.org/10.1111/jocd.13368>
- Adalsteinsson, J. A., Kaushik, S., Muzumdar, S., Guttman, E., & Ungar, J. (2020). An update on the microbiology, immunology and genetics of seborrheic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 29(5), 481–489. <https://doi.org/10.1111/EXD.14091>
- Akaza, N., Akamatsu, H., Sasaki, Y., Takeoka, S., Kishi, M., Mizutani, H., Sano, A., Hirokawa, K., Nakata, S., & Matsunaga, K. (2010). Cutaneous Malassezia microbiota of healthy subjects differ by sex, body part and season. *The Journal of dermatology*, 37(9), 786–792. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00913.x>
- Allali, I., Arnold, J.W., Roach, J. et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol* 17, 194 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8>
- Bacon, R. A., Mizoguchi, H., & Schwartz, J. R. (2014). Assessing therapeutic effectiveness of scalp treatments for dandruff and seborrheic dermatitis, part 1: a reliable and relevant method based on the adherent scalp flaking score (ASFS). *The Journal of dermatological treatment*, 25(3), 232–236. <https://doi.org/10.3109/09546634.2012.687089>
- Barquero-Orias, D., Muñoz Moreno-Arrones, O., & Vañó-Galván, S. (2021). Alopecia and the Microbiome: A Future Therapeutic Target? *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 112(6), 495–502. <https://doi.org/10.1016/J.ADENGL.2021.03.011>
- Borda, L. J., & Wikramanayake, T. C. (2015). Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Investigative Dermatology*, 3(2). <https://doi.org/10.13188/2373-1044.1000019>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ...

Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 2010 7:5, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Clark, G. W., Pope, S. M., & Jaboori, K. A. (2015). Diagnosis and treatment of seborrheic dermatitis. *American family physician*, 91(3), 185–190.

COS | Centre for Omic Sciences. (n.d.), from <https://omicscentre.com/>

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5960), 1694–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>

Dawson, T. L. (2007). *Malassezia globosa* and *restricta*: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 12(2), 15–19. <https://doi.org/10.1038/SJ.JIDSYMP.5650049>

Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L. F., Martin, R., & Bieber, T. (2016). Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 30(12), 2038–2047. <https://doi.org/10.1111/jdv.13965>

Eurecat Centre Tecnològic - Innovant per a les empreses. (n.d.), from <https://eurecat.org/>

Eurecat - Centro Tecnològic de Catalunya | LinkedIn. (n.d.), from <https://es.linkedin.com/company/eurecat>

EURECAT – Coordinadora Catalana de Fundacions. (n.d.), from <https://ccfundacions.cat/directori-de-fundacions/fundacio-eurecat/>

Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program, Kong, H. H., & Segre, J. A. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 498(7454), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nature12171>

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

- Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual review of pathology, 14*, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- Gutfreund, K., Bienias, W., Szewczyk, A., & Kaszuba, A. (2013). Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. *Postepy dermatologii i alergologii, 30*(3), 165–169. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.35619>
- Huang, J., Ran, Y., Pradhan, S., Yan, W., & Dai, Y. (2019). Investigation on Microecology of Hair Root Fungi in Androgenetic Alopecia Patients. *Mycopathologia, 184*(4), 505–515. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00345-8>
- Kanzi, A. M., San, J. E., Chimukangara, B., Wilkinson, E., Fish, M., Ramsuran, V., & de Oliveira, T. (2020). Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Frontiers in genetics, 11*, 544162. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.544162>
- Kircik L. (2010). The evolving role of therapeutic shampoos for targeting symptoms of inflammatory scalp disorders. *Journal of drugs in dermatology : JDD, 9*(1), 41–48.
- Kwon, H. H., Yoon, J. Y., Park, S. Y., Min, S., & Suh, D. H. (2014). Comparison of clinical and histological effects between lactobacillus-fermented *Chamaecyparis obtusa* and tea tree oil for the treatment of acne: an eight-week double-blind randomized controlled split-face study. *Dermatology (Basel, Switzerland), 229*(2), 102–109. <https://doi.org/10.1159/000362491>
- Lam, S., Zuo, T., Ho, M., Chan, F. K. L., Chan, P. K. S., & Ng, S. C. (2019). Review article: fungal alterations in inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 50*(11–12), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/APT.15523>
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Di Simone, M. P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., & Sokol, H. (2016). Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *Journal of Crohn's & colitis, 10*(3), 296–305. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv209>
- Limbu, S. L., Purba, T. S., Harries, M., Wikramanayake, T. C., Miteva, M., Bhogal, R. K., O'Neill, C. A., & Paus, R. (2021). A folliculocentric perspective of dandruff pathogenesis: Could a troublesome condition be caused by changes to a natural secretory

mechanism?. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 43(10), e2100005. <https://doi.org/10.1002/bies.202100005>

Lin, Q., Panchamukhi, A., Li, P., Shan, W., Zhou, H., Hou, L., & Chen, W. (2021). Malassezia and Staphylococcus dominate scalp microbiome for seborrheic dermatitis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(5), 965–975. <https://doi.org/10.1007/S00449-020-02333-5>

Lousada, M. B., Lachnit, T., Edelkamp, J., Rouillé, T., Ajdic, D., Uchida, Y., Di Nardo, A., Bosch, T., & Paus, R. (2021). Exploring the human hair follicle microbiome. *The British journal of dermatology*, 184(5), 802–815. <https://doi.org/10.1111/bjd.19461>

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>

Mameri, A., Carneiro, S., Mameri, L., Telles da Cunha, J. M., & Ramos-E-Silva, M. (2017). History of Seborrheic Dermatitis: Conceptual and Clinico-Pathologic Evolution. *Skinmed*, 15(3), 187–194.

Moore, M., & Kile, R. L. (1935). PITYROSPORUM OVALIS AS A CAUSATIVE AGENT OF SEBORRHEIC DERMATITIS. *Science (New York, N.Y.)*, 81(2098), 277–278. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.81.2098.277>

Performance of the Agilent D1000 and the Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay for the Agilent 4200 TapeStation System Technical Overview. (n.d.).

Polak-Witka, K., Constantinou, A., Schwarzer, R., Helmuth, J., Wiessner, A., Hadam, S., Kanti, V., Rancan, F., Andruck, A., Richter, C., Moter, A., Edelmann, A., Rudnicka, L., Blume-Peytavi, U., & Vogt, A. (2021). Identification of anti-microbial peptides and traces of microbial DNA in infrainfundibular compartments of human scalp terminal hair follicles. *European journal of dermatology : EJD*, 31(1), 22–31. <https://doi.org/10.1684/ejd.2020.3948>

Polak-Witka, K., Rudnicka, L., Blume-Peytavi, U., & Vogt, A. (2020). The role of the microbiome in scalp hair follicle biology and disease. *Experimental dermatology*, 29(3), 286–294. <https://doi.org/10.1111/exd.13935>

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal

RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM864>

Reygagne, P., Bastien, P., Couavoux, M. P., Philippe, D., Renouf, M., Castiel-Higounenc, I., & Gueniche, A. (2017). The positive benefit of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 ST11 in healthy volunteers with moderate to severe dandruff. *Beneficial microbes*, 8(5), 671–680. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0144>

Rippke, F., Schreiner, V., Doering, T., & Maibach, H. I. (2004). Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *American Journal of Clinical Dermatology*, 5(4), 217–223. <https://doi.org/10.2165/00128071-200405040-00002>

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>

Sampai, A. L. S. B., Mameri, Â. C. A., Vargas, T. J. de S., Ramos-e-Silva, M., Nunes, A. P., & Carneiro, S. C. da S. (2011). Seborrheic dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(6), 1061–1074. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600002>

Saxena, R., Mittal, P., Clavaud, C., Dhakan, D. B., Hegde, P., Veeranagaiah, M. M., Saha, S., Souverain, L., Roy, N., Breton, L., Misra, N., & Sharma, V. K. (2018). Comparison of Healthy and Dandruff Scalp Microbiome Reveals the Role of Commensals in Scalp Health. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 346. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00346>

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. https://doi.org/10.1073/PNAS.1117018109/SUPPL_FILE/SD01.XLS

- Shi, J., Cheng, J. W., Zhang, Q., Hua, Z. X., & Miao, X. (2021). Comparison of the skin microbiota of patients with acne vulgaris and healthy controls. *Annals of Palliative Medicine*, 10(7), 7933941–7937941. <https://doi.org/10.21037/APM-21-1482>
- Tanaka, A., Cho, O., Saito, C., Saito, M., Tsuboi, R., & Sugita, T. (2016). Comprehensive pyrosequencing analysis of the bacterial microbiota of the skin of patients with seborrheic dermatitis. *Microbiology and Immunology*, 60(8), 521–526. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12398>
- Tao, R., Li, R., & Wang, R. (2021). Skin microbiome alterations in seborrheic dermatitis and dandruff: A systematic review. *Experimental Dermatology*, 30(10), 1546–1553. <https://doi.org/10.1111/EXD.14450>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS one*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torrell, H., Cereto-Massagué, A., Kazakova, P., García, L., Palacios, H., & Canela, N. (2021). Multiomic Approach to Analyze Infant Gut Microbiota: Experimental and Analytical Method Optimization. *Biomolecules*, 11(7), 999. <https://doi.org/10.3390/biom11070999>
- Tridico, S. R., Murray, D. C., Addison, J., Kirkbride, K. P., & Bunce, M. (2014). Metagenomic analyses of bacteria on human hairs: A qualitative assessment for applications in forensic science. *Investigative Genetics*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13323-014-0016-5/COMMENTS>
- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS one*, 4(10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Turchetti, B., Selbmann, L., Gunde-Cimerman, N., Buzzini, P., Sampaio, J. P., & Zalar, P. (2018). *Cystobasidium alpinum* sp. nov. and *Rhodospordiobolus oreadorum* sp. nov. from European Cold Environments and Arctic Region. *Life* 2018, Vol. 8, Page 9, 8(2), 9. <https://doi.org/10.3390/LIFE8020009>
- Xu, Z., Wang, Z., Yuan, C., Liu, X., Yang, F., Wang, T., Wang, J., Manabe, K., Qin, O., Wang, X., Zhang, Y., & Zhang, M. (2016). Dandruff is associated with the conjoined interactions between host and microorganisms. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP24877>
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2,

for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLOS ONE*, 13(10), e0206428. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206428>

Yurkov, A. M., Kachalkin, A. V., Daniel, H. M., Groenewald, M., Libkind, D., de Garcia, V., Zalar, P., Gouliamova, D. E., Boekhout, T., & Begerow, D. (2015). Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f.a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchieii* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 173–185. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0315-0>

Zapata, H. J., & Quagliarello, V. J. (2015). The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(4), 776–781. <https://doi.org/10.1111/jgs.13310>

9. Autoavaluació

Després de realitzar les pràctiques curriculars al COS, em vaig alegrar molt quan em van proposar realitzar el meu treball de fi de grau amb ells, sobretot perquè l'àrea de la genòmica és la que més m'havia cridat l'atenció d'entre tots els serveis que ofereixen. A més, des de que vaig iniciar els meus estudis universitaris tenia molt clar que volia cursar la menció en biomedicina, i he pogut realitzar un treball relacionat amb el tema, que m'ha ajudat a reafirmar que és el que vull seguir fent en un futur.

Un cop finalitzat el meu treball de fi de grau, he de reconèixer que s'han acomplert totes les expectatives que tenia quan el vaig començar i estic satisfeta amb els resultats que he pogut obtenir mitjançant tot l'esforç que he realitzat.

Valoro molt positivament tots els aprenentatges adquirits, tant teòrics com pràctics, sobretot la millora de les meves habilitats i coneixements a l'hora de treballar en un laboratori i poder realitzar les tasques de manera autònoma o en equip, sempre amb la supervisió de la tutora de pràctiques i un bon grup de professionals. Crec que una de les millors aportacions ha estat poder veure com es realitza un estudi de principi a final, i poder participar en tots els passos. A més, m'ha sobtat veure tot el temps i l'esforç que implica realitzar un estudi d'aquest tipus, des del moment del mostreig fins l'anàlisi final, i que el mínim error pot fer que es perdi una mostra o que no s'obtinguin uns bons resultats.

De totes maneres, cal realitzar una mica d'autocrítica i, tot estar molt contenta amb el treball realitzat, sempre hi ha coses que penses que es podrien haver millorat o fet diferent. Per exemple, crec que podria haver fet canvis en les condicions de PCR per veure si s'obtenia una millor amplificació.

Per acabar, vull donar les gràcies a la Dra. Helena Torrell, una gran professional del sector, per guiar-me i ajudar-me en tot moment i de la que he pogut aprendre molt. També a la Dra. Núria Canela, per confiar en mi i proposar-me realitzar aquest estudi amb la col·laboració de tot l'equip de genòmica, que m'han acceptat com una més. Cal remarcar la gran implicació que ha mostrat la Dra. M. Carmen Portillo, a qui vull agrair totes les aportacions que ha fet per millorar el treball, donant-me unes indicacions molt valuoses, i que ha sobrepassat amb escreix les seves obligacions com a tutora.

10. Annexes

Annex I. Protocol DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen.....	51
Annex II. Protocol NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer.....	52
Annex III. Protocol PCR Clean-up de Macherey Nagel.....	53
Annex IV. Protocol Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System.....	54
Annex V. Protocol Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits.....	54

Annex I

Protocol DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen

Sample preparation

1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.

Cell lysis

2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.

Note: If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.

3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 1 min.

4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).

Note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.

Inhibitor Removal Technology

5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.

6. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).

Note: Expect 500–600 µl.

Bind DNA

7. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.

8. Load 650 µl of lysate to an MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.

9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.

10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.

Wash

11. Add 500 µl of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.

12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.

13. Add 500 µl of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.

14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).

15. Centrifuge at up to 16,000 x g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).

Elute

16. Add 50–100 µl of Solution C6* to the center of the white filter membrane.

17. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

***nosaltres utilitzem H₂O**

Annex II

NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer

1. Open the desired application. Load an aliquot of the blank onto the lower measurement pedestal and lower the sampling arm.

2. Click Blank to measure and store the reference spectrum.

3. Analyze a fresh replicate of the blank as though it were a sample by choosing Measure. The result should be a spectrum that varies no more than 0.04 A (10 mm absorbance equivalent).

4. Wipe the blank from both measurement pedestal surfaces with a dry laboratory wipe, and repeat the process until the spectrum is within 0.04 A (10 mm path).

Pedestal Basic Use

5. Raise the sampling arm and pipette the sample onto the lower measurement pedestal.

6. Lower the sampling arm and initiate a spectral measurement using the software on the PC. The sample column is automatically drawn between the upper and lower pedestals and the measurement is made.

7. When the measurement is complete, raise the sampling arm and wipe the sample from both the upper and lower pedestals using a dry, lint-free laboratory wipe. Simple wiping prevents sample carryover in subsequent measurements for samples varying by more than 1000 fold in concentration.

Field experience indicates that the following volumes are sufficient to ensure reproducibility:

- Aqueous solutions of nucleic acids: 1 µL
- Purified protein: 2 µL
- Bradford, BCA, Lowry or Protein Pierce 660 nm assays: 2 µL
- Microbial cell suspensions: 2 µL

Annex III

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (DNA extraction from agarose gel)

1. Excise DNA fragment / solubilize gel slice

For each 100 mg of agarose gel < 2 % add 200 µL Buffer NTI. For gels containing > 2 % agarose, double the volume of Buffer NTI.

Incubate sample for 5–10 min at 50 °C. Vortex the sample briefly every 2–3 min until the gel slice is completely dissolved!*

2. Bind DNA

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

3. Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column.

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and low A260/A230

4. Dry silica membrane

Centrifuge for 1 min at 11,000 x g to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.

Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions.

5. Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add 15–30 µL Buffer NE** and incubate at room temperature (18–25 °C) for 1 min. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g.

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min.

***nosaltres ho deixem entre 15 i 30 min en vòrtex horitzontal**

****Nosaltres eluim amb H₂O**

Annex IV

Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System

Sample Preparation

1. Allow reagents to equilibrate at room temperature for 30 min
2. Vortex mix before use
3. If running ladder, prepare by mixing 2 μ L High Sensitivity D1000 Sample Buffer (●) with 2 μ L High Sensitivity D1000 Ladder (●)
4. Prepare sample by mixing 2 μ L High Sensitivity D1000 Sample Buffer (●) with 2 μ L DNA sample
5. Spin down, then vortex using IKA vortexer and adaptor at 2000 rpm for 1 min
6. Spin down to position the sample at the bottom of the tube.

Sample Analysis

1. Load samples into the 2200 TapeStation instrument.
2. Select the required samples on the 2200 TapeStation Controller Software.
3. Click Start and specify a filename with which to save your results.

Annex V

Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits

1.1. Set up the required number of assay tubes (or tube strips) for standards and samples. The Qubit™ 1X dsDNA HS Assay requires 2 standards.

Note: Use thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes (Cat. No. Q32856) for the Qubit™4 Fluorometer and 8 \times 200 μ L tube strips (Cat. No. Q33252) for the Qubit™ Flex Fluorometer.

1.2. Label the tube lids.

Note: Do not label the side of the tube as this could interfere with the sample read. Label the lid of each standard tube correctly. Calibration of the Qubit™ Fluorometer requires the standards to be inserted into the instrument in the right order.

1.3. Add 10 μ L of each Qubit™ standard to the appropriate tube.

1.4. Add 1–20 μ L of each user sample to the appropriate tube.

Note: If you are adding 1–2 μ L of sample, use a P-2 pipette for best results.

1.5. Add the Qubit™ 1X dsDNA working solution to each tube such that the final volume is 200 μ L.

Note: The final volume in each tube must be 200 μ L. Each standard tube requires 190 μ L of Qubit™ working solution, and each sample tube requires anywhere from 180–199 μ L. Ensure that you have sufficient Qubit™ working solution to accommodate all standards and samples.

Note: To avoid any cross-contamination, we recommend that you remove the total amount of working solution required for your samples and standards from the working solution bottle and then add the required volume to the appropriate tubes instead of pipetting directly from the bottle to each tube.

1.6. Mix each sample vigorously by vortexing for 3–5 seconds.

1.7. Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes, then proceed to “Read standards and samples”. Follow the procedure appropriate for your instrument.