

Títol del treball: Aplicació de la tecnologia de seqüenciació massiva a la determinació del genotip Kell Fetal a partir de plasma matern

Estudiant: Raquel Cobo Garcia

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1916065@campus.udg.edu

Tutor: Jose Luis García Marin

Cotutor*: Núria Nogués Gàlvez

Empresa / institució: Banc de Sang i Teixits

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Jose Luis García Marin

Nom del cotutor*: Núria Nogués Gàlvez

Empresa / institució: Banc de Sang i Teixits

Correu(s) electrònics: joseluis.garcia@udg.edu i
nnogues@bst.cat

*si hi ha cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació

ABSTRACT

Knowledge of the fetal Kell genotype in pregnancies of sensitized women with anti-K is of great value to determine if the fetus is at risk of haemolytic anaemia and allows a better management of such, otherwise, high-risk pregnancies. Several non-invasive approaches for fetal Kell genotyping have been developed ages earlier than 20 weeks. The next-generation sequencing (NGS) Technology offers unprecedented possibilities of massive parallel analysis of gene-targets amplified sequences from maternal plasma cell-free (cf) DNA. Initial proof of concept studies have shown promising results.

Objectives: 1) To design a NGS approach for the fetal Kell genotype analysis in plasma cfDNA and 2) To evaluate its sensitivity and the reliability of the fetus in a validation study with a panel of clinical samples from sensitized pregnant women.

Materials and Methods: A total of 17 plasma samples from pregnant women with anti-K have been prospectively collected during the past three years. Cell-free DNA has been extracted from 2 ml of these plasma samples as well as from artificial chimeric mixtures of plasma from individuals with known genotype (major *KEL2/2*, minor *KEL1/2*) using the QIAasympphony extractor. A 125b bp *KEL* gene fragment encompassing the *KEL1/2* SNP has been amplified using gene-specific primers with NGS suitable adaptors. The resulting amplification products have been pooled with other amplicons and sequenced in a MiSeq Desktop Sequencer. The NGS pipeline output paired sequence files have been used as input for the analysis with CLC Genomics Workbench software.

Results: Initial tests were performed with plasma DNA from the artificial chimeric mixtures, having a 1 to 20% minor component represented. Parallel amplification of the AMEL gene and the SRY locus has been optimized as well to include a fetal sex marker. Optimal amplicon size and input plasma DNA have been assessed with a restricted panel of clinical samples representing the real scenario of application.

Conclusion: This NGS method for non-invasive fetal Kell genotyping has shown specific and sensitive detection of the fetal *KEL1* allele in clinical samples of sensitized pregnant women. It is also compatible with the simultaneous sequence analysis of multiple amplicons from different loci. In this sense, further developments may include other loci of blood group polymorphisms, potentially involved in haemolytic disease of the newborn.

RESUM

El coneixement del genotip Kell fetal en gestacions de dones sensibilitzades amb anti-K és de gran utilitat per confirmar si existeix risc d'anèmia hemolítica, permetent un millor maneig de gestacions considerades d'alt risc. S'han desenvolupat aproximacions no invasives per el genotipatge Kell fetal a partir del plasma matern però segueix sent no concloent en algunes mostres i en particular, en setmanes de gestació anteriors a la setmana 20. Les noves tecnologies de seqüenciació massiva o de nova generació (NGS) ofereixen unes possibilitats d'anàlisi de seqüències amplificades a partir de l'ADN de plasma matern. En aquest sentit, els primers assajos de prova de concepte han mostrat uns resultats molt prometedors.

Objectius: 1) Desenvolupar un mètode per el genotipatge Kell fetal basat en l'anàlisi de l'ADN lliure en el plasma matern per seqüenciació massiva i 2) Avaluar la sensibilitat i fiabilitat dels resultats en un estudi de validació amb un panell de mostres clíniques de gestants sensibilitzades.

Materials i mètodes: Durant els últims 3 anys s'han recollit un total de 17 mostres de plasma de gestants amb anti-K. S'han preparat a més mescleres quimèriques artificials amb genotip KEL conegut (majoritari KEL2/2, minoritari KEL1/2). L'ADN lliure s'ha obtingut a partir d'1 ml de plasma utilitzant l'extractor automàtic QIASymphony. L'amplificació d'un fragment del gen KEL de 125 pb, abastant el polimorfisme KEL1/2, es dur a terme amb encebadors específics i adaptadors adequats per NGS i s'han seqüenciat en un instrument MiSeq Desktop Sequencer. Per a l'anàlisi dels resultats s'ha utilitzat el programari CLC Genomics Workbench.

Resultats: Els tests inicials es van realitzar amb ADN de plasma de mescleres quimèriques artificials, amb una representació d'un 1 a un 20% del component K1/K2 minoritari. Paral·lelament, s'ha optimitzat una amplificació dels gens AMEL i SRY, per incloure un marcador de sexe fetal. Les condicions òptimes respecte a la grandària de l'amplicó i la quantitat d'ADN de plasma per reacció s'han avaluat amb un panell de mostres clíniques representant l'escenari real d'aplicació.

Conclusions: La metodologia de seqüenciació massiva en el genotipatge Kell fetal no invasiva presenta la capacitat de detectar de forma específica i sensible l'al·lel KEL1 fetal en mostres de gestants sensibilitzades. També és compatible amb l'anàlisi simultània de seqüències corresponents a altres locus. En aquest sentit, futurs desenvolupaments poden incloure l'anàlisi d'altres polimorfismes de grup sanguini potencialment implicats en malaltia hemolítica del fetus o nouat.

RESUMEN

El conocimiento del genotipo Kell fetal en gestaciones de mujeres sensibilizadas con anti-K es de gran utilidad para confirmar si existe riesgo de anemia hemolítica, permitiendo un mejor manejo de gestaciones consideradas de alto riesgo. Se han desarrollado aproximaciones no invasivas para la genotipificación Kell fetal a partir del plasma materno pero sigue siendo no concluyente en algunas muestras y en particular, en semanas de gestación anteriores a la semana 20. Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS) ofrecen unas posibilidades de análisis de secuencias amplificadas a partir del ADN de plasma materno. En este sentido, los primeros ensayos de prueba de concepto han mostrado unos resultados muy prometedores.

Objetivos: 1) Desarrollar un método para la genotipificación Kell fetal basado en el análisis del ADN libre en el plasma materno por secuenciación masiva y 2) Evaluar la sensibilidad y fiabilidad de los resultados en un estudio de validación con un panel de muestras clínicas de gestantes sensibilizadas.

Materiales y métodos: Durante los últimos 3 años se han recogido un total de 17 muestras de plasma de gestantes con anti-K. Se han preparado además mezclas quiméricas artificiales con genotipo *KEL* conocido (mayoritario *KEL2/2*, minoritario *KEL1/2*). El ADN libre se ha obtenido a partir de 1 ml de plasma utilizando el extractor automático QIAasympphony. La amplificación de un fragmento del gen *KEL* de 125 pb, abarcando el polimorfismo *KEL1/2*, se lleva a cabo con cebadores específicos y adaptadores adecuados para NGS y se han secuenciado en un instrumento MiSeq Desktop Sequencer. Para el análisis de los resultados se ha utilizado el software CLC Genomics Workbench.

Resultados: Los tests iniciales se realizaron con ADN de plasma de mezclas quiméricas artificiales, con una representación de un 1 a un 20% del componente *K1/K2* minoritario. Paralelamente, se ha optimizado una amplificación de los genes *AMEL* y *SRY*, para incluir un marcador de sexo fetal. Las condiciones óptimas respecto al tamaño del amplicón y la cantidad de ADN de plasma por reacción se han evaluado con un panel de muestras clínicas representando el escenario real de aplicación.

Conclusiones: La metodología de secuenciación masiva en la genotipificación Kell fetal no invasiva presenta la capacidad de detectar de forma específica y sensible el alelo *KEL1* fetal en muestras de gestantes sensibilizadas. También es compatible con el análisis simultáneo de secuencias correspondientes a otros locus. En este sentido, futuros desarrollos pueden incluir el análisis de otros polimorfismos de grupo sanguíneo potencialmente implicados en enfermedad hemolítica del feto o recién nacido.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
2. OBJECTIUS	8
3. METODOLOGIA	9
3.1. Separació de plasma a partir d'una mostra de sang materna	9
3.2. Extracció de DNA a partir d'una mostra de plasma matern mitjançant <i>QIA</i>symphony	9
3.3. Fonaments de la tècnica de seqüenciació massiva d'Illumina	10
3.4. Preparació de les llibreries per al Genotipatge de les seqüències gèniques	11
3.4.1 Seqüències i Oligonucleòtids utilitzats	11
3.4.2 Amplificació per PCR de les seqüències gèniques.....	12
3.4.3 Etiquetatge de les mostres amb MIDS Fluidigm	14
3.4.4 Preparació del <i>Pool</i> Final i purificació amb <i>Agentcour Ampure XP</i>	15
3.5. Genotipatge del gen KEL mitjançant tècniques de seqüenciació massiva	15
4. RESULTATS	17
5. DISCUSSIÓ	23
6. CONCLUSIONS	26
7. BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUCCIÓ

El sistema immunitari està dissenyat per protegir a l'organisme de substàncies possiblement nocives, responnent contra antigens (generalment proteïnes) que s'expressen a la superfície cel·lular provinents de virus, fong i/o bacteris. (MedlinePlus, 2015). El sistema immunitari no ha d'atacar les

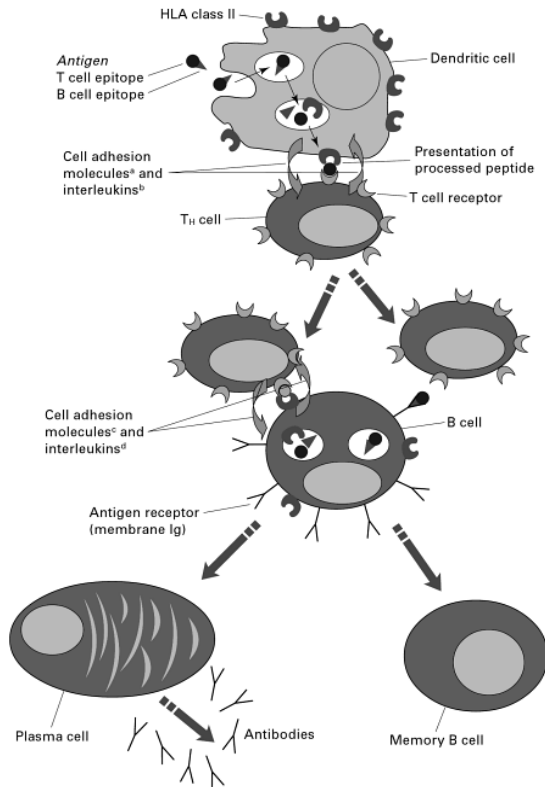


Figura 1. Vies de la reacció al·loimmunitària. (Hadley & Turner, 2001)

cèl·lules pròpies de l'organisme, tot i que en alguns casos falla, atacant cèl·lules que deriven del propi organisme i produeix el que es coneix com a malalties autoimmunitàries (Ferreira et al., 2002). D'altra banda, existeixen reaccions d'al·loimmunitària que són en les que es centrarà aquest treball i que consisteixen en l'atac contra antigens provinents d'un altre organisme de la mateixa espècie. És a dir, quan entren en contacte sang de dues persones, poden haver-hi components que es presenten a la membrana eritrocitària que siguin diferents entre els dos individus provocant una resposta immunitària contra aquests al·loantigens. La resposta es dona mitjançant cèl·lules T i anticossos secretats per cèl·lules B (Hadley & Turner, 2001).

Es durant l'administració de transfusions de sang, la gestació i els transplants on es pot donar una reacció al·loimmunitària (Seetharam et al., 2010). La transfusió sanguínia és la principal situació on la sang de dos individus es posa en contacte. Aquestes es realitzen entre persones del mateix grup sanguini

ABO i RhD, però la membrana eritrocitària pot també expressar antigens que pertanyen a d'altres sistemes de grup sanguini existents, que poden provocar l'activació d'una resposta al·loimmunitària (American Cancer Society, 2015). Durant la gestació, es donen intercanvis de sang entre la mare i el fetus a través de la placenta, que poden donar lloc a una sensibilització al·loimmunitària de la gestant quan el fetus expressa antigens eritrocitaris diferents als de la mare. Així mateix, es podria desencadenar una resposta al·loimmunitària contra el fetus si els anticossos han estat adquirits en transfusions sanguínies anteriors a la gestació (Ferreira et al., 2002).

- Sistema de grup sanguini Kell

Un sistema de grup sanguini es compon d'un o més antigens controlats en un sol locus genètic, normalment codificat per un mateix gen, però poden haver d'un o més gens homòlegs estretament relacionats que codifiquen per els diferents antigens d'un mateix grup sanguini (ISBT, 2015). Els antigens es troben s'expressen en diferents components de la membrana dels eritròcits, es poden trobar units a carbohidrats com en el cas dels antigens del sistema ABO o localitzar-se en proteïnes com els antigens del sistema Rh (Dean, 2005). Actualment, es coneixen 35 sistemes de grup sanguini encara que no tots tenen la mateixa rellevància. Els sistemes de grup sanguini més coneguts són el ABO i el Rh, tot i que el sistema de grup sanguini Kell té també molta importància clínica, com

s'esmentarà posteriorment. Un sistema de grup sanguini pot tenir molts antígens però, no tots tenen la mateixa immunogenicitat ni es donen amb la mateixa freqüència, hi ha antígens que s'expressen de manera més freqüent. Com a conseqüència, la gran majoria de la població comparteix els antígens més freqüents i les incompatibilitats es donen quan s'entra en contacte amb la sang d'individus que expressen antígens minoritaris.

El sistema de grup sanguini Kell, en el qual es centrarà aquest treball, està constituït per 35 antígens diferents i tots es troben localitzats en una proteïna integral de la membrana eritrocitària, anomenada Kell, com el seu grup sanguini. La proteïna Kell (**Figura 2**) és una glicoproteïna amb homologia estructural i de seqüència amb una família d'endopeptidases d'unió a zinc, i es troba estretament associada a una altra proteïna anomenada Kx mitjançant ponts disulfur (NCBI. Blood Group Antigen Gene Mutation Data Base, 2015). El gen KEL consta de 19 exons que ocupen aproximadament 21.5 Kb i codifica per la seqüència aminoacídica de la proteïna Kell, que es troba al cromosoma 7, posició q33 (Lee, 1997). KEL és un gen autosòmic codominant presenta diversos polimorfismes. Entre els diferents polimorfismes existents a la proteïna Kell, el més important des de el punt de vista clínic, és el que determina els antígens eritrocitaris KEL1 (K) i KEL2 (k), situat a l'exó 6 del gen. L'antigen Kell es detecta amb una freqüència del 9% en població caucàsica, un 1.5% en individus africans i molt rarament en els d'origen asiàtic (Cortés et al., 2014).

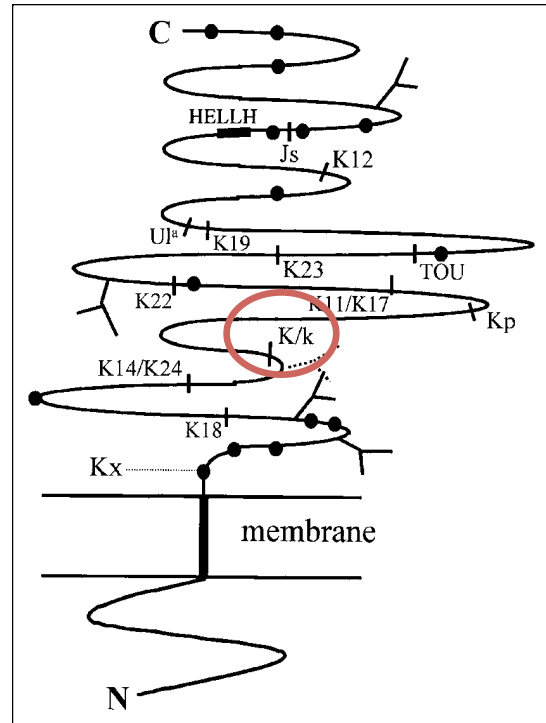


Figura 2. Proteïna Kell i els polimorfismes que es donen per substitució. (Daniels, 2002)

El polimorfisme K/k afecta al residu 193, que passa de Thr (KEL2) a Met (KEL1) (ISBT, 2015). L'SNP que determina aquest canvi és un canvi aminoacídic de C>T a la posició nucleotídica 578. S'ha trobat una variant KEL1-ser193 (**Figura 3**) que es dona a la posició 577 de l'exó 6 i el SNP és un canvi de A>T, mentre que la posició 578 es manté amb C (KEL2) (Poole et al., 2006). Aquest polimorfisme però, no té gaire rellevància clínica per la seva escassa representació.

Allele	Nucleotides 571-582; amino acids 191-194			
<i>KEL*1</i>	AAC; Asn	CGA; Arg	<u>ATG</u> ; Met	CTG; Leu
<i>KEL*2</i>	AAC; Asn ^N	CGA; Arg	ACG; Thr	CTG; Leu
<i>KEL*1-Ser193</i>	<u>AAC</u> ; Asn ^{N7}	CGA; Arg	TCG; Ser	CTG; Leu

* The sequence recognized by the restriction enzyme *BsmI* is underlined. Asn^N = N-glycosylated asparagine residue; Asn^{N7} = asparagine residue probably N-glycosylated.

Figura 3. Polimorfisme KEL1/KEL2. (Poole et al., 2006)

Es creu que la glicoproteïna Kell està relacionada amb la regulació del creixement i la diferenciació dels progenitors eritroides, possiblement modulant els Factors de Creixement (F.C) polipeptídics de la superfície cel·lular. La proteïna Kell s'expressa en fases molt primerenques del procés de maduració dels eritroides. I no només es troba a la membrana de les cèl·lules eritroides, sinó que diversos estudis (Camara-Clayette et al., 2001) mostren una activitat transcripcional basal en altres tipus cel·lulars no eritroides.

Conseqüentment, la unió d'un anticòs anti-K a la glicoproteïna impedeix l'activitat enzimàtica i suprimeix el procés d'eritropoesis. Els al·loanticossos **Anti-K** acostumen a ser IgG1, que destrueixen els eritròcits que expressen l'antigen KEL1. Els anticossos anti-K poden inhibir el procés d'eritropoesis des de les fases inicials i provocar una anèmia aplàsica en el fetus i/o nadó. Es tracta de reaccions que provoquen una anèmia severa fetal coneguda com a malaltia hemolítica del fetus i del nounat (MHFN). S'ha vist (Daniels, 2002) però, que els anticossos anti-K originats prèviament a la gestació per transfusions provoquen MHFN més dèbils que no pas els adquirits durant una primera gestació.

- **Malaltia hemolítica del fetus i del nounat (MHFN)**

La malaltia hemolítica del fetus i del nounat (MHFN) és un quadre clínic induït per al·loanticossos materns de tipus IgG que travessen la placenta i destrueixen els hematies fetals (Finning, et al., 2007). Quan els anticossos que produeix la gestant son IgM aquests no travessen la placenta i per tant no poden causar malaltia hemolítica al fetus. Malgrat la barrera placentària es pot donar intercanvi de cèl·lules entre el fetus i la quan es produeix una hemorràgia fetomaterna (HFM), (Armstrong & Smart, 2008) que es pot produir de manera natural amb la finalització de la gestació i el part o bé, es pot donar per un accident, una amniocentesis o una biòpsia cordial entre altres factors externs. Els anticossos IgG faciliten la destrucció dels eritròcits o fins i tot dels progenitors eritroides o progenitors d'altres llinatges depenent de l'antigen contra el que van dirigit els anticossos (Rieneck et al., 2013). En els casos més severs de MHFN a banda de la destrucció dels eritròcits, es poden donar edemes al fetge i a la melsa que són els òrgans principalment implicats en el procés d'eritropoesis i destrucció cel·lular, arribant en ocasions a provocar la mort intrauterina del fetus .

La sensibilització de la gestant es dur a terme normalment durant una primera gestació. En la que la gestant produeix anticossos de tipus IgM contra l'antigen fetal (Abdel-Fattah & Soothill, 2001). És durant una segona gestació amb incompatibilitat fetomaterna per l'antigen KEL1, on la gestant produeix anticossos IgG que sí poden travessar la placenta i donar una hemòlisi en el fetus (**Figura 4**).

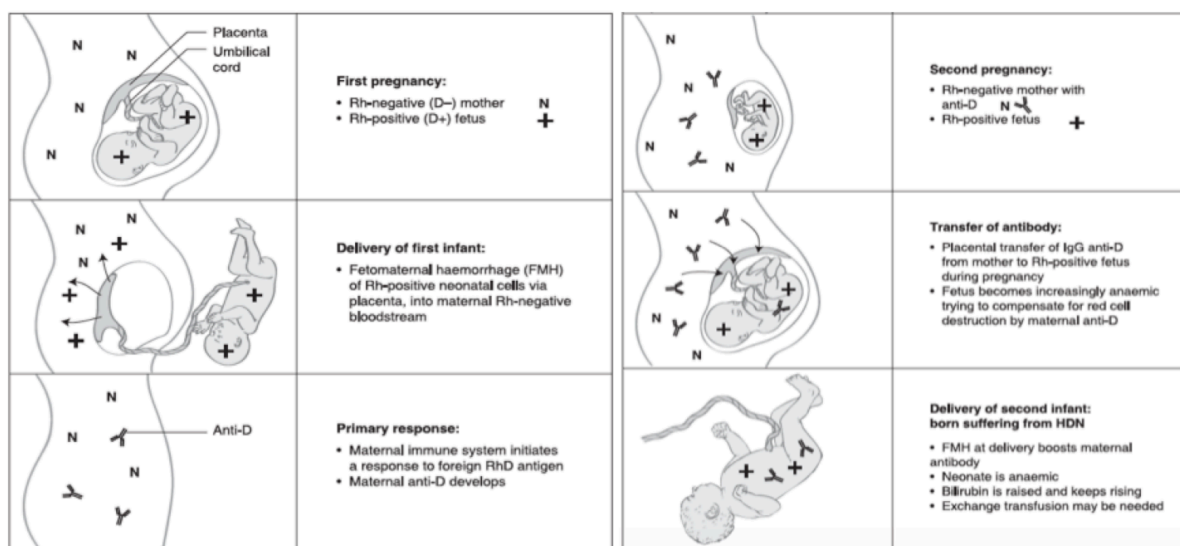


Figura 4. Progressió de MHFN: Procés de sensibilització de la gestant fins naixement d'un nadó afectat amb genotip RHD¹ positiu. (Armstrong & Smart, 2008).

Els factors que determinen la gravetat de la malaltia hemolítica queden recollits en la **Figura 5** i engloben des de la subclasse de IgG, el grau de glicosilació d'aquestes IgG, l'especificitat i la concentració de l'anticòs, i la densitat d'antigen en la membrana eritrocitària.

Existeix un programa de profilaxi amb immunoglobulines anti-RHD que s'administra de forma sistemàtica a les gestants RHD negatives, per prevenir la sensibilització de la gestant. Aquesta gammaglobulina que se li administra és un anticòs que bloqueja l'antigen RHD, evitant la isoimmunització i el risc de MHFN. En el casos on l'especificitat de l'anticòs és anti-K, no existeix cap programa de immunoprofilaxi específic. Donat el potencial hemolític d'aquests anticòs i la inhibició de la eritropoesi que poden arribar a provocar en el fetus / nadó, les gestacions de dones amb al·loanticòs anti-K són considerades d'alt risc i requereixen un seguiment molt estret per evidenciar qualsevol signe d'anèmia fetal (Finning et al., 2007).

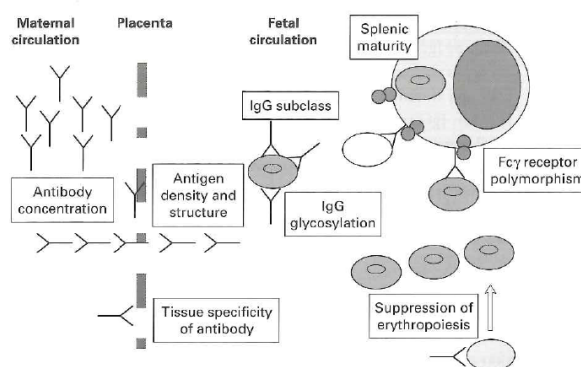


Figura 5. Factors que determinen la severitat de la malaltia hemolítica del fetus. (Hadley & Turner, 2001)

El seguiment d'una gestant amb anticòs anti-K consisteix per una banda en la realització d'un escrutini d'anticòs eritrocitaris a diferents setmanes de la gestació, normalment un cop al mes. En aquests estudis es determina el títol o concentració de l'anticòs anti-K i s'observa l'evolució. Per altre banda, hi ha també un seguiment obstètric amb ecografies seriades per determinar si s'està produint una anèmia del fetus o si s'observen signes d'edema fetal. Alguns casos, requereixen de la realització d'una amniocentesis per tal de determinar si s'està produint MHFN mesurant els nivells

¹ RHD: Antigen D que forma part del sistema de grup sanguini Rh i principal causant d'anèmies hemolítiques severes en fetus.

de bilirubina que hi ha al líquid amniòtic, ja que s'ha vist que un increment d'aquesta en el líquid esta relacionada amb el grau d'anèmia fetal (A. Hadley & Soothill, 2002).

Segons la gravetat de l'anèmia fetal existeixen diferents recursos terapèutics, com pot ser l'administració d'immunoglobulines intravenoses inespecífiques al llarg de la gestació. També es poden realitzar plasmafèresis a la gestant, amb l'objectiu de minimitzar la concentració d'anticossos de la mare (NYU Langone, 2015). En aquest procediment s'extreu la sang de la mare en un circuit extern on els anticossos queden segregats abans de retornar el plasma a la circulació materna. Com a últim recurs, es poden realitzar transfusions intrauterines (NYU Langone, 2015), una tècnica molt invasiva i molt arriscada on es transfonen eritròcits d'un donant Kell negatiu directament a la circulació fetal (**Figura 6**).

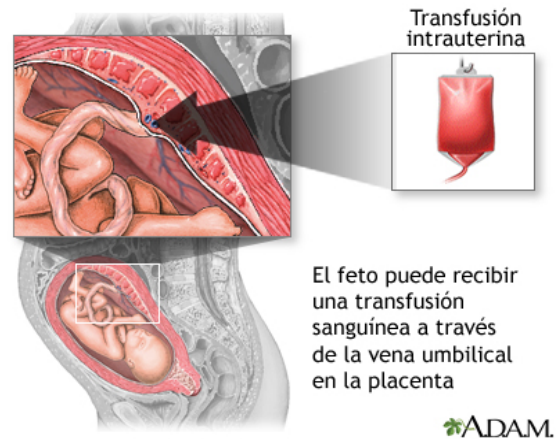


Figura 6. Transfusió intrauterina. MedLine Plus, 2011

Aquestes tècniques han aconseguit salvar la vida de molts nens que es troben en un estadi molt greu de la malaltia (Moise & Whitecar, 2001).

- **Cell free fetal DNA (cffDNA) en plasma matern**

És a l'any 1997 quan es va descobrir la presència de DNA fetal lliure en el plasma de gestants (Y. M. Lo et al., 1997). Aquest DNA d'origen fetal es troba circulant pel torrent sanguini matern i prové dels trofoblasts placentaris (Gupta, A. K, et al., 2004). De fet, el DNA lliure en plasma es majoritàriament d'origen matern i la proporció relativa de DNA d'origen fetal augmenta progressivament al llarg de la gestació. Es calcula que del total de DNA lliure en el torrent sanguini matern, només un 2-6% és d'origen fetal i desapareix ràpidament després del part (E. S. F. Lo et al., 1998). L'anàlisi d'aquest *cffDNA* ha permès genotipar els fetus amb tècniques no invasives, evitant la utilització de tècniques com l'amniocentèsis o la cordocentèsis que comporten certs riscos sobre la vida del fetus.

En el context d'una gestant KEL1 negatiu amb anticossos anti-K i en el que la parella és KEL1 positiu, la possibilitat de determinar el genotip KEL1 del fetus és molt important per a poder dur a terme el millor maneig d'aquestes gestacions, a priori de molt risc. Per analitzar la presència o absència del polimorfisme KEL1 en el fetus, s'extreu una mostra de sang perifèrica materna, se'n separa el plasma i s'extreu el DNA total de plasma. Fins ara, l'anàlisi del genotip KEL a partir del *cffDNA* s'ha realitzat mitjançant PCR a temps real. No obstant, aquest treball es centrarà en el desenvolupament de noves tècniques de seqüenciació massiva (NGS) per al genotipatge del gen KEL a partir de DNA fetal extret de plasma matern.

- Fonaments de la tecnologia de Seqüenciació de Nova Generació (NGS)

La tècnica clàssica de seqüenciació és la ideada per Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Aquesta tècnica es basa en el mètode de terminació de la DNA per seqüenciar i detectar canvis de seqüència però, la poca capacitat i els grans costos han provocat que altres tecnologies més avançades com la seqüenciació de nova generació (NGS) s'implementin cada cop més. La NGS té un gran potencial ja que té una capacitat enorme de processament de mostres i per tant, s'obtenen un nombre de lectures molt superiors a les obtingudes amb Sanger. Aquesta potencialitat ha fet reduir els costos de seqüenciació. També, és capaç de realitzar reaccions *múltiplex* i pot incloure variants d'un únic nucleòtid o mutacions puntuals, petites insercions i delecions i també variants estructurals (SVs) tant equilibrades (inversions i translocacions) com desequilibrades (delecions o duplicacions) perquè es tracta d'una seqüenciació clonal. Les principals diferències de procediment entre les dues tècniques esmentades es troben representades a la **Figura 7**.

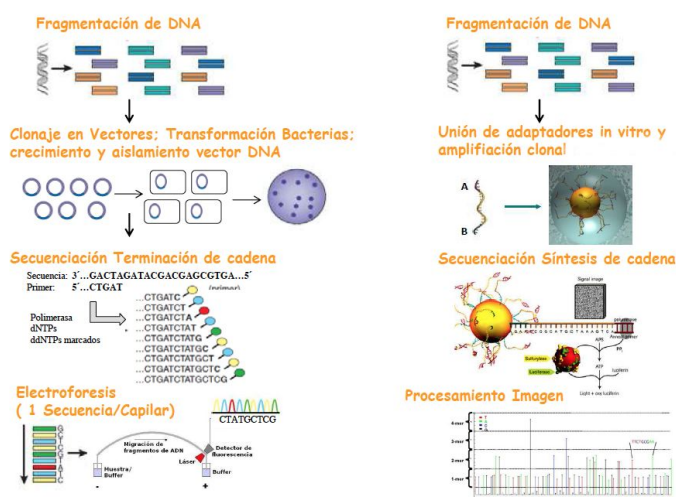


Figura 7. Principals diferències entre la seqüenciació per Sanger i la NGS (UCTS, 2010)

El ventall d'aplicacions de les tècniques de seqüenciació massiva són pràcticament infinites i engloben des de la seqüenciació d'exomes, a la seqüenciació de genomes, l'anàlisi de metilacions, la identificació de la diversitat microbiana (Next-Generation Sequencing, 2015), fins la reseqüenciació i seqüenciació *de novo* (DNA Sequencing, 2015). En l'àmbit del diagnòstic prenatal no-invasiu la tecnologia de NGS fa possible l'anàlisi de les seqüències de DNA de plasma amb un grau de cobertura mai aconseguit anteriorment. Obre unes perspectives d'aplicació tant per detectar aneuploidies com mutacions puntuals en malalties monogèniques que revolucionaran en un futur tot aquest camp.

Existeixen diferents metodologies de NGS però, totes comparteixen els passos bàsics per dur a terme un procés de seqüenciació com es pot observar a la **Figura 8** i consisteix en purificar el DNA, preparar una llibreria, etiquetar les mostres, seqüenciar i disposar d'un software que faci l'alineament i compari les seqüències analitzades amb les de referència per determinar si existeixen variacions, etc.

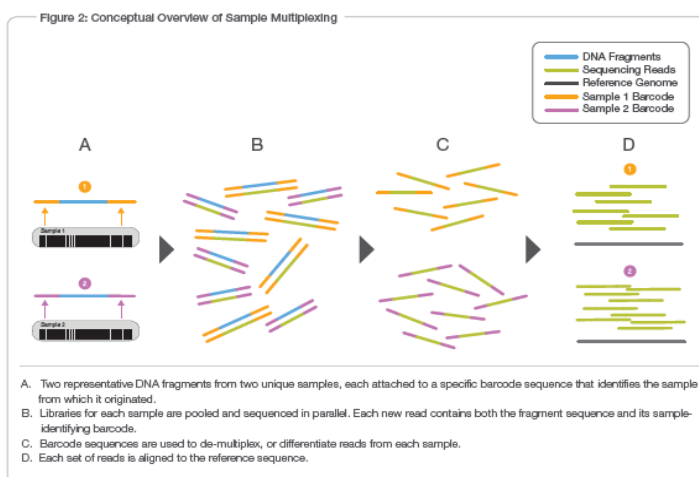


Figura 8. Procés de seqüenciació *multiplex* (Illumina, 2013)

En aquest treball s'ha fet servir la tecnologia de seqüenciació d'Illumina i s'ha utilitzat un seqüenciador MiSeq. El seqüenciador MiSeq (MiSeq desktop, 2015) permet dur a terme aplicacions més específiques com la seqüenciació de gens diana, metagenòmica, seqüenciació de genomes petits, expressió gènica dirigida, seqüenciació d'amplicons i tipificació HLA. Els nous reactius MiSeq permeten outputs de fins a 15 Gb amb la seqüenciació de lectures de 25 Mb i una longitud de seqüència de fins a 2X300 bp.

2. OBJECTIUS

Massive sequencing is causing a breakthrough in non-invasive prenatal diagnosis. This TFG work focuses on the application of massive sequencing to the diagnosis of feto-maternal blood group incompatibilities and particularly focuses on:

- The improvement of fetal KEL genotyping from maternal plasma DNA
- Fetal sex determination from maternal plasma DNA by massive sequencing approaches.
- Development and assessment of an approach for the simultaneous genotyping of KEL and sex markers.

3. METODOLOGIA

Per genotipar el grup sanguini KEL i/o comprovar la presència de *cffDNA* en plasma matern en mostres de sang perifèrica de gestants, es segueixen diverses metodologies i protocols descrits a continuació.

3.1. Separació de plasma a partir d'una mostra de sang materna

La separació del plasma matern es dur a terme sota una campana de flux laminar, prèviament netejada amb aigua, alcohol al 70% i un mínim 15 minuts exposada a raigs UV. Inicialment, la mostra de sang es centrifuga durant 6 minuts a 300 rpm sense fre. Un cop centrifugada es porta fins a la campana de flux on s'obtingran les alíquotes de plasma per realitzar posteriorment l'extracció del DNA. Dins la campana es fan alíquotes d'1ml de plasma (no apurar per no treure la capa de leucòcits) i es van transferint a un falcon de 15 ml, s'homogeneïtza la mostra per inversió i es transfereix el plasma homogeneïtzat a un volum total de 1.3 ml en tubs eppendorf de 2ml. Es centrifuguen les alíquotes a 13.000 rpm durant 10 minuts i es transfereixen 1250µl en tubs de 2 ml, amb tap de rosca i retolats amb el número de mostra. Finalment, les alíquotes es congelaran a -20°C fins al moment de l'extracció del DNA.

3.2. Extracció de DNA a partir d'una mostra de plasma matern mitjançant *QIASymphony*

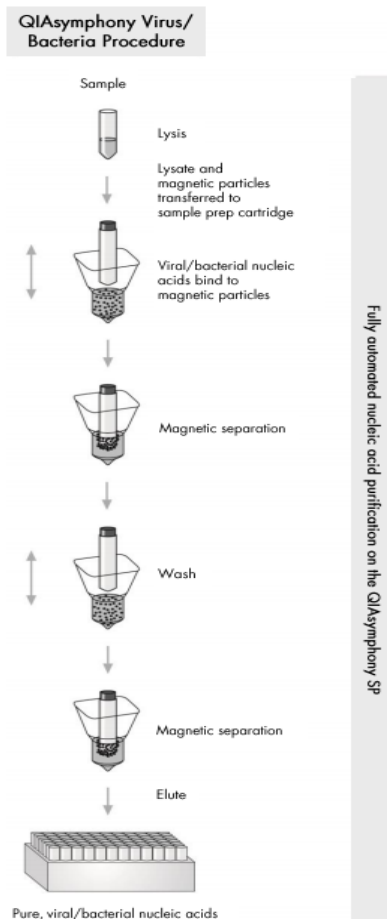


Figura 9. Protocol d'extracció de DNA de plasma

Un cop separat el plasma es procedeix a realitzar l'extracció del DNA circulant lliure en el plasma (*cffDNA*). La tècnica d'extracció de DNA amb *QIASymphony* utilitza la tecnologia de les partícules magnètiques que proporcionen una gran qualitat del DNA extret, aquesta tècnica és adequada per a l'ús directe en aplicacions posteriors, com amplificacions o altres reaccions enzimàtiques.

El DNA que s'extreu està lliure de proteïnes, nucleases i altres impureses. Aquesta tècnica permet el processament de fins a 96 mostres, en lots de 24, de manera simultània. El procediment d'extracció que fa servir el *QIASymphony* es divideix en les 4 etapes observades a la **Figura 9**: Lisi, Unió, Rentat i Elució

Finalment, per a que es pugui donar el procés d'extracció, *QIASymphony* utilitza un KIT de Virus/Bactèria el qual conté partícules magnètiques o *beads* per marcar les mostres, un buffer de lisi, buffers de rentat per eliminar totes les impureses possibles, proteïnasa K per eliminar les proteïnes que pugui contenir la mostra i finalment conté un buffer d'elució per extreure el DNA purificat. L'usuari pot escollir diferents volums d'elució dependent del protocol d'extracció que s'utilitza i en funció del tipus de mostra de la qual es fa l'extracció del DNA. (Farssac, E. et al. 2012).

3.3. Fonaments de la tècnica de seqüenciació massiva d'Illumina

El procediment de seqüenciació que segueix la tecnologia Illumina, concretament el seqüenciador MiSeq utilitzat en aquest treball, és el següent (Generation, 2010):

- **Generació del Cluster:** Els *templates* que es volen seqüenciar es troben immobilitzats sobre la superfície d'una cel·la de flux i queden units gràcies a uns adaptadors de seqüència específics. Així mateix, es facilita l'accés als enzims mentre es manté una gran estabilitat d'unió entre la superfície i la seqüència que es vol analitzar. Un cop inserits els adaptadors, s'uneixen les seqüències de cadena senzilla a la cel·la de flux i es dona la primera amplifcació pont. En aquesta primera amplifcació, els enzims incorporen nucleòtids no marcats per construir els ponts de doble cadena sobre el substrat de fase sòlida. Finalment, es fa una desnaturalització convertint les molècules en cadenes senzilles unides al substrat, generant *clusters* amb densitats al voltant de 10 milions de molècules.

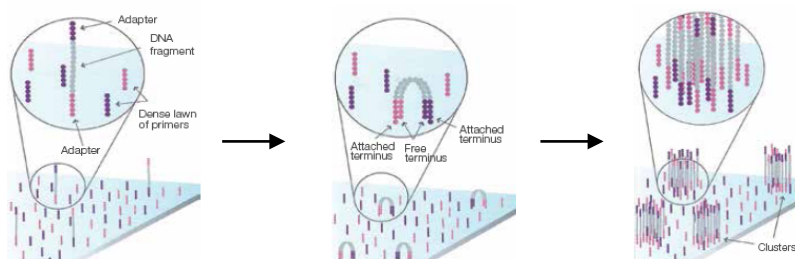


Figura 10. Generació del cluster per a la posterior seqüenciació

- **Seqüenciació:** Illumina realitza una seqüenciació per síntesi que es basa en la utilització dels quatre nucleòtids marcats amb fluoròfors. El primer cicle de seqüenciació s'inicia amb l'addició de quatre terminadors reversibles marcats, encebadors específics i DNA polimerasa. Un únic desoxynucleotid trifosfat (dNTP) quedarà inserit a la seqüència i s'excitarà amb un làser. El fet que s'incorporin tots els dNTPS en el mateix cicle, minimitza els biaixos per que es dona una competició natural. Els diferents *clusters* emeten una fluorescència que es captura amb una càmera fotogràfica, identificant la primera base inserida. En els darrers cicles de seqüenciació es repeteix el mateix procés fins que es determina tota la seqüència de bases del fragment. El resultat final és molt acurat, la seqüenciació base per base elimina el context d'errors específics de seqüència, fent possible una comparació robusta amb el *template* o genoma de referència.

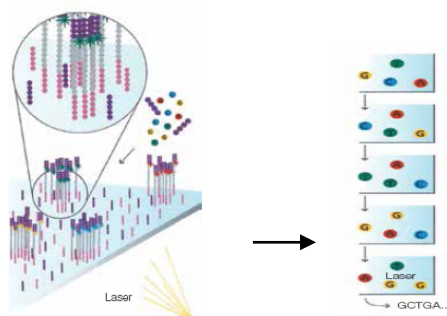


Figura 11. Seqüenciació de nova generació

- **Anàlisi de dades:** La seqüenciació Illumina es basa en una quantitat massiva de lectures de seqüències en paral·lel. Un mostreig profund i una cobertura uniforme és el que s'utilitza per a generar una seqüència consens i assegurar un alt grau de confiança en la determinació de diferències genètiques. El mostreig profund permet identificar homozigots / heterozigots i diferenciar-los dels errors de seqüenciació. El software d'Illumina pot alinear les seqüències analitzades amb seqüències de referència i permet l'accés a l'anàlisi de diferents estadis del procés.

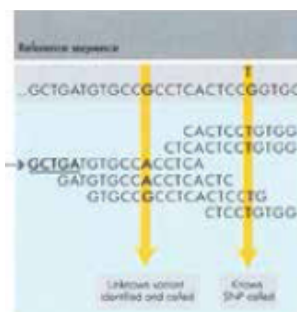


Figura 12. Anàlisi de dades, comparació amb la seqüència consens

3.4. Preparació de les llibreries per al Genotipatge de les seqüències gèniques

L'experiment realitzat segueix un disseny basat en PCR de fusió. Per crear les llibreries d'amplicons es fa servir un protocol específic. La primera PCR es basa en la amplificació de les regions gèniques amb els oligonucleòtids dissenyats específicament amb unes cues o adaptadors als extrems. Posteriorment, en una segona reacció de PCR s'insereixen els adaptadors i les etiquetes (*MID*) per poder dur a terme el procés de seqüenciació en una única reacció *multiplex*. Els oligonucleòtids dissenyats específicament i els protocols seguits, es detallen a continuació.

3.4.1 Seqüències i Oligonucleòtids utilitzats

- **Gen KEL:** El polimorfisme corresponent al genotip Kel1 es troba situat a l'exó 6 del cromosoma 7. Els següents *oligonucleòtids* són els que s'han utilitzat per dur a terme l'experiment i s'espera amplificar una regió de 125bp que conté el polimorfisme C/T.

- Encebador sentit: 5'-CTCTCTCTCCTTAAAGCTTGG-3'
- Encebador anti-sentit: 5'-TAGGTAGGCTCTGAAGAAAGG-3'

- **Gen de l'Amelogenina (AMEL):** El gen de l'Amelogenina es troba de forma homòloga tant al cromosoma X com al Y. El cromosoma X pateix una deleció de 6 pb, fet que permet identificar el sexe d'una mostra de DNA per el tamany de la seqüència amplificada. Per aquests motius, el gen AMEL es pot fer servir com a marcador de sexe fetal. Amb els oligonucleòtids dissenyats s'espera amplificar una regió de 123pb en AMEL-X i 119pb en AMEL-Y:

- Encebador sentit: 5'-CACCTCCTGATCTACAAG-3'
- Encebador anti-sentit: 5'-CAGTTACTTGCTGATAAACTC-3'

- **Gen SRY:** És un gen sexual localitzat al braç curt del cromosoma Y. El gen SRY codifica per la proteïna *testis-determining factor (TDF)*, que provoca la formació dels testicles. Així mateix, el gen SRY només es veu expressat en individus de sexe masculí. Per aquests motius, el gen SRY es pot fer servir com a marcador de sexe fetal. Amb els oligonucleòtids dissenyats s'espera amplificar una regió de 62 pb:

- Encebador sentit: 5'-GAGCAGTCAGGGAGGCAGAT-3'
- Encebador anti-sentit: 5'-GCAAAACATGGTAATTCAGTAACGTT-3'

- **Cues o adaptadors CS1 i CS2:** Corresponen a seqüències específiques i permeten la unió de les seqüències gèniques que es volen analitzar amb els oligonucleòtids de seqüència específics que s'uniran a la cel·la de flux del seqüenciador.

- Cua CS1 sentit: 5'- ACACTGACGACATGGTTCTACAC -3'
- Cua CS2 anti-sentit: 5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT -3'

- **Adaptadors Illumina:** Corresponen a oligonucleòtids de seqüència específics que uneixen els fragments de DNA que es volen analitzar a la cel·la de flux tal i com s'observa a la **Figura 13**.

- Adaptador Illumina P5 sentit:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCT²ACACTGACGACATGGTTCTACA-3'

- Adaptador Illumina P7 anti-sentit:

5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-[BC³]-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3'

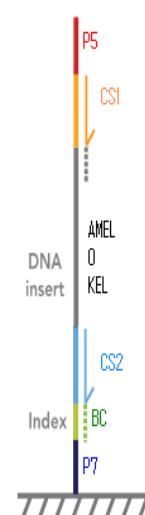


Figura 13. Adaptador Illumina unit a la cel·la de flux

3.4.2 Amplificació per PCR de les seqüències gèniques

Inicialment, s'han de preparar les llibreries de DNA per tal de poder dur a terme la seqüenciació i posterior alineament amb una seqüència de referència. La preparació de les llibreries s'inicia amb la realització d'una primera PCR *uniplex*. Les diferents regions gèniques són amplificades de manera individual. La PCR requereix una *master mix* que conté: tampó amb MgCl, DMSO, Nucleòtids de PCR, enzims i H₂O⁴ (**Taula 1**).

Els microtubs de PCR es preparen sota la campana de flux per evitar qualsevol possible contaminació i darrerament, es col·loquen al termociclador 9700 d'*Applied Biosystems* amb el programa desenvolupat a la **Taula 2**.

² Seqüència d'unió entre els adaptadors P5 i CS1

³ Barcode o etiqueta, que en aquest experiment correspon a MIDS Fluidigm

⁴ La quantitat d'aigua depondrà de la quantitat de DNA afegit, per mantenir el volum final de mostra

Taula 1. Components necessaris per a la preparació de la màster mix

Reactiu	µl/mostra
FastStart Buffer 10X amb MgCl	1,25
DMSO	0,625
PCR Nucleotide Mix	0,25
Enzyme FastStart	0,125

Taula 2. Programa utilitzat en la primera reacció de PCR

Cicles	Temps (seg)	Temperatura (°C)
start	180	94
40	20	94
	30	58
	60	72
Extensió	180	72
Finalització	∞	22

Per comprovar que la PCR ha estat realitzada amb èxit, es prepara un gel d'agarosa al 1% per visualitzar que s'han amplificat tots els amplicons. S'insereix 4 µl de mostra de PCR i 1 µl de tampó de càrrega a cada carril, juntament amb el *Ladder* o marcador molecular de 100 bp com a control.

Un cop amplificats els fragments de manera *uniplex*, es quantifica el DNA de totes les mostres i es normalitza per evitar solapaments durant la seqüenciació. La quantificació es realitza amb la tecnologia *Qubit*, un fluoròmetre d'*Invitrogen*. Inicialment, s'han de passar uns estàndards a l'aparell, es tracta de realitzar una recta patró per a que es pugui obtenir la concentració de les mostres analitzades. La tecnologia *Qubit* requereix la realització d'una *master mix* amb 1 µl de reactiu i 199 µl de buffer per a cada mostra. Posteriorment es preparen les mostres amb 199 µl de *master mix* i 1 µl de Mostra tal i com s'indica a la **Figura 14**.

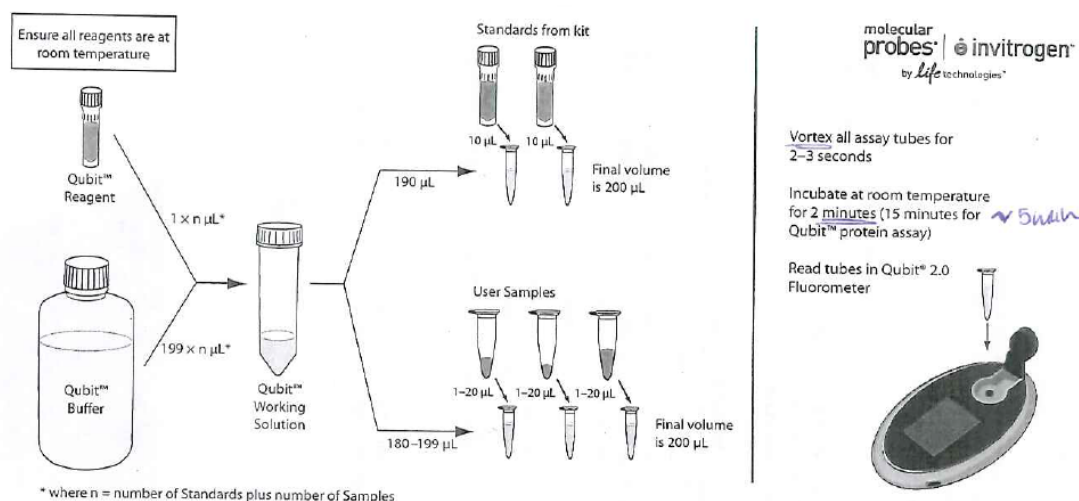


Figura 14. Protocol per a la quantificació de DNA amb Qubit (Life Technologies, 2010)

3.4.3 Etiquetatge de les mostres amb MIDS Fluidigm

Les mostres amplificades per PCR *uniplex* es barregen fent un únic tub o *pool* per pacient, és a dir, cada tub contindrà una barreja del producte de PCR de les diferents seqüències gèniques analitzades d'un mateix pacient. Un cop fets els *pools* s'insereixen les *MIDs* o etiquetes, que corresponen a seqüències úniques de 10 pb per poder identificar els diferents pacients després de la seqüenciació. L'etiquetatge es dona amb unes *MIDs de Fluidigm*, que es troben distribuïdes en 4 plaques de 96 pouets.

Per etiquetar les mostres cal un segon procés d'amplificació per PCR. Aquesta amplificació també requereix la preparació d'una *master mix* amb Tampó MgCl, DMSO, Nucleòtids, Taq polimerasa (enzim) i H₂O (**Taula 3**). Cada microtub ha de contenir 11,5 µl de la *master mix*, 0,5 µl de la MID o etiqueta corresponent i 0,5 µl del *pool* del pacient per tal d'obtenir un volum final de 12,5 µl per tub.

Com que els *pools* contenen material amplificat, s'han d'afegir als microtubs de PCR fora de l'àrea pre-PCR per evitar possibles contaminacions en amplificacions posteriors. Finalment, es col·loquen al termociclador 9700 amb el programa MIDS desenvolupat a la **Taula 4**.

Taula 3. Components necessaris per a realitzar la màster mix

Reactiu	µl/mostra
FastStart Buffer 10X amb MgCl	1,25
DMSO	0,625
PCR Nucleotide Mix	0,25
Enzyme FastStart	0,125
H ₂ O	9,75

Taula 4. Programa MIDS

Cicles	Temps (Seg)	Temperatura (°C)
start	180	94
	20	94
22	30	70
	60	72
Extensió	180	72
Finalització	∞	22

Per comprovar que la PCR ha estat realitzada amb èxit, es prepara un gel d'agarosa al 1% per visualitzar que s'han amplificat tots els amplicons amb les etiquetes. A cada carril s'insereix 3 µl de mostra de PCR, 2 µl d'H₂O i 1 µl de tampó de càrrega, juntament amb el *Ladder* o marcador molecular de 100 bp com a control. Finalment, es torna a quantificar el DNA amb el *Qubit* tal i com indica la **Figura 14** i es normalitza per evitar solapaments posteriors.

3.4.4 Preparació del *Pool Final* i purificació amb *Agencourt Ampure XP*

Un cop etiquetats els pacients, es barregen tots els DNA en un sol microtub anomenat *Pool Final*. Aquesta barreja o *Pool Final* requereix d'una prèvia purificació per eliminar artefactes i dímers de primers que poden interrompre en el procés de seqüenciació. La purificació es dur a terme seguint un protocol específic amb *Agencourt Ampure XP beads*, es tracta d'unes partícules magnètiques (Figura 15). El volum de DNA i *Ampure beads* ve determinat per la casa comercial i depèn de la quantitat de material que es vol precipitar.

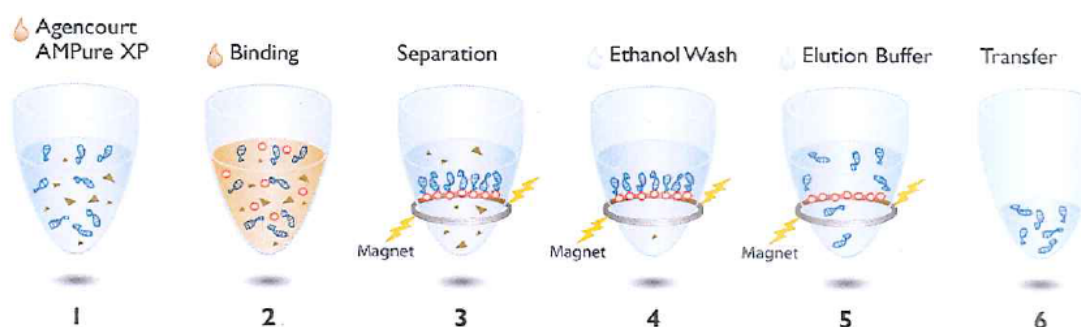


Figura 15. Protocol de purificació amb *AGENTCOURT AMPURE XP*. (Vidal, F. et al. 2014).

3.5. Genotipatge del gen *KEL* mitjançant tècniques de seqüenciació massiva

Un cop purificada la mostra, es procedeix a la descongelació del cartutx de seqüenciació Illumina amb aigua destil·lada. Com s'ha realitzat un disseny *custom*, s'han de preparar els *primers* de seqüència, per tal de que es pugui donar la unió amb la cel·la de flux i la posterior seqüenciació dels fragments. Els *primers* de seqüència corresponen als fragments CS1 i CS2 de les mostres de DNA (Vidal, F. et al. 2015).

Segons el nombre de gens que es vulguin seqüenciar, s'hauria de seguir un protocol de desnaturalització de les llibreries amb *PhiX* o no. *PhiX* és llibreria control lligada als adaptadors que proporciona un control de qualitat en la generació del clústers, en la seqüenciació i en la alineació. En els casos on es dona la seqüenciació de poques seqüències gèniques diferents, *PhiX* impedeix que es doni una saturació durant la captació de fluorescència, és a dir, evita la interrupció del procés de seqüenciació provocant un augment de la variabilitat genètica.

Si es segueix un protocol amb *PhiX*, els *primers* de seqüència preparats s'hauran d'inserir als forats 12, 13 i 14 Del cartutx de seqüenciació. Aquests forats porten incorporats els primers Illumina, que són necessaris per permetre la unió del material *PhiX*, que conté adaptadors Illumina, a la cel·la de flux. Així mateix, si no realitzem un protocol de desnaturalització amb *PhiX*, els *primers* de seqüència preparats s'hauran d'inserir als forats 18, 19 i 20. Aquests forats corresponen a pous buits dissenyats específicament per a dissenys *custom*. Finalment, la mostra s'insereix dins el forat 17 que també es troba buit (Illumina Proprietary, 2012).

Un cop es dona a terme la seqüenciació es procedeix a l'anàlisi dels resultats obtinguts. Al Banc de Sang i Teixits s'utilitza el software CLC Genomics Workbench de QIAGEN, que realitza l'alineament dels resultats obtinguts amb les seqüències de referència. Posteriorment, es calculen les freqüències gèniques obtingudes de les diferents seqüències gèniques analitzades a cada mostra i es determinen les variacions o polimorfismes detectats durant la seqüenciació.

4. RESULTATS

En el Treball de Fi de Grau es van avaluar diferents aspectes en relació a la tipificació del gen KEL fetal en plasma matern.

En primer lloc es va dissenyar una parella de *primers* per amplificar un fragment de l'exó 6 del gen KEL que conté el polimorfisme C/T que posteriorment es volia analitzar per seqüenciació massiva (**veure disseny a la Pàg.15**). Paral·lelament com a control de sexe fetal es va utilitzar una parella de primers del gen Amelogenina, que estava disponible al laboratori i ja s'utilitzava en el diagnòstic prenatal d'hemofília.

El fet que les mostres de gestants han estat recaptades durant un període de temps molt llarg i no s'obtenen gaires alíquotes de DNA de plasma de cadascuna, implica que aquestes mostres siguin molt valuoses i per tant, inicialment es van dissenyar unes barreges quimèriques que mimetitzaven l'escenari d'una gestant. La bateria de mostres han estat preparades amb DNA de plasma de la mostra 135367, una dona Kell negatiu com a component majoritari, i amb DNA de plasma de la mostra 1012030, un home heterozigot K1/K2 com a component minoritari. La primera bateria de mostres es poden visualitzar a la **Taula 5** i es van preparar amb DNA de plasma en comptes de DNA genòmic per les característiques que comparteix amb el DNA de plasma d'una gestant, el qual es troba molt fragmentat. A banda de les barreges quimèriques, es va considerar oportú incloure tres mostres procedents de gestants: 1 i 2) gestant portadora d'un fetus Kell positiu a dues setmanes de gestació diferents i 3) gestant portadora d'un fetus Kell negatiu, per què es disposaven de diverses alíquotes i així es podia representar l'escenari real amb DNA de plasma de gestants. Tot i partir d'unes condicions basals on 3 µl corresponien a un promig de 7,1 ng/µl, es va considerar oportú provar dues concentracions diferents de DNA de plasma (3 i 6 µl) en el cas de la gestant portadora d'un fetus Kell positiu, per tal d'obtenir una primera informació de si era rellevant o no per a la determinació del polimorfisme K1 del gen KEL.

Anteriorment a la seqüenciació de l'exó 6 del gen KEL es pot observar com tant a la en la visualització dels amplicons de la primera PCR *uniplex* com en la segona PCR que correspon als *pools* de les mostres, obtenim un producte normalitzat i amb una mida similar la esperada com es pot visualitzar a la (**Figura 16**).

Taula 5. Mostres utilitzades en el primer anàlisi

Mostres	
135367	DNA plasma ♀ K2/K2 com a Control Negatiu
102030	DNA plasma ♂ K1/K2 com a Control Positiu
Q1 15%	
Q1 10%	
Q1 5%	
57895	
53359	
59389	

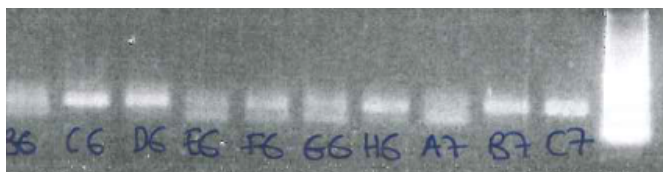


Figura 16. Visualització dels diferents pools d'amplicons (KEL + AMEL) corresponents a cada mostra. **B6** és el pool corresponent a la mostra 135367, **C6** és el pool de la mostra 102030, **D6** és el pool de la mostra Q1 al 15%, **E6** és el pool de la mostra Q1 al 10%, **F6** és el pool de la mostra Q1 al 5%, **G6** és el pool de la mostra 53359, **H6** és el pool de la mostra 57895, **A7** és el pool de la mostra 57895 amb 6 µl de DNA, **B7** és el pool de la mostra 59384 i **C7** és el pool de la mostra 59384 amb 6 µl de DNA.

Aquest primer anàlisi, s'han fet les següents observacions, respecte les quimeres artificials s'observa que la freqüència de detecció del polimorfisme KEL és en tots tres s'apropa a la freqüència esperada. I s'evidencia una tendència a la alta entre la mostra del 5 i 10 %. Per contra en el marcador AMEL-Y no hi ha una correspondència entre la freqüència esperada i la obtinguda. Tot i així en totes tres quimeres el polimorfisme KEL i el fragment AMEL-Y ha estat detectat. (**Figura 17A**). Respecte a les mostres procedents de gestants (totes portadores d'un fetus masculí-dada prèviament coneguda) s'observa un resultat positiu per la seqüència AMEL-Y, concordant amb les dades conegudes del sexe fetal (**Figura 17B**). D'altra banda, el polimorfisme C/T de l'exó 6 del gen KEL només, ha estat detectat tal i com era d'esperar a les mostres 57895 i 59389 corresponent a la gestant d'un fetus Kell positiu. De les dues condicions testades, la detecció del polimorfisme KEL només ha funcionat utilitzant 6 µl de DNA de plasma.

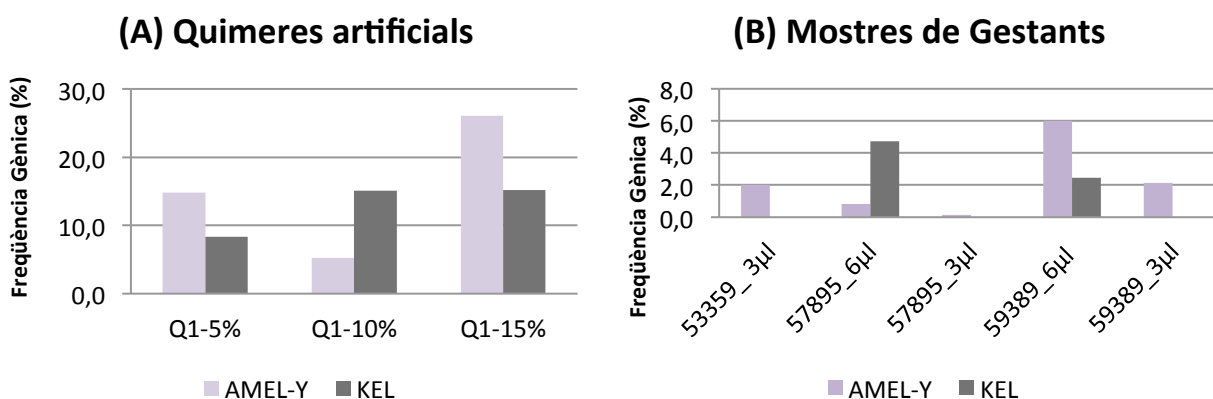


Figura 17. Comprovació de la seqüenciació dels gens KEL i AMEL, S'observa el patró de seqüenciació de l'exó 6 del gen KEL i el gen AMEL-Y. En l'eix d'abscisses s'observen les mostres analitzades i a l'eix d'ordenades el percentatge de DNA fetal corresponen als gens seqüenciats sobre la quantitat de DNA total analitzada. En la Figura A) S'observa el resultat de la seqüenciació de quimeres artificials simulant una gestant. En la Figura B) s'observa la seqüenciació dels gens KEL i AMEL en mostres de gestants a dues concentracions de DNA diferent de 3 i 6 µl.

En segon lloc, es va dissenyar una parella de *primers* per amplificar el gen SRY del cromosoma Y. L'eficàcia del gen SRY, ja està comprovada i validada amb els protocols de detecció del sexe fetal en PCR a temps real que es realitzen de manera rutinària al Banc de Sang i per tant, es volia comprovar si la utilització del gen SRY representava una millora respecte la utilització del gen AMEL com a

marcador de sexe fetal en tècniques de seqüenciació massiva. Així mateix, per comprovar el funcionament d'aquests primers sobre DNA de plasma, es van realitzar unes proves inicials fent servir mostres de DNA genòmic de dos individus diferents (home i dona) en paral·lel amb DNA de plasma de dos individus també amb sexe conegut (**Taula 6**). Tal com s'observa a la **Figura 18**, Només es va obtenir amplificació positiva amb les mostres 102030 i 59640, procedents d'individus de sexe masculí.

Taula 6. Mostres Prova SRY

Mostra	Sexe
DNA Plasma 135367	Femení
DNA Plasma 102030	Masculí
DNA Genòmic 60395	Femení
DNA Genòmic 59640	Masculí

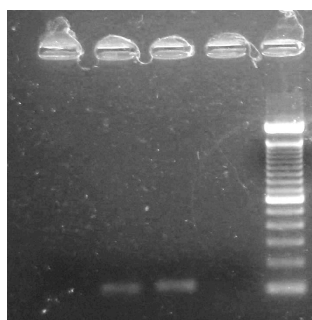


Figura 18. Comprovació de l'amplificació del gen SRY. Al segon i tercer carril s'observa un amplificació, per tant aquestes dues mostres pertanyen a individus de sexe masculí. Al primer i quart carril no es dona una amplificació perquè les mostres pertanyen a individus de sexe femení.

En tercer lloc, la següent prova es va dissenyar per tal d'avaluar la possible utilització del gen SRY com a marcador de sexe paral·lelament al ge KEL i així poder comparar els resultats obtinguts d'una mateixa gestant analitzada amb les dues tècniques existents actualment. Donats els resultats obtinguts amb les quimeres artificials preparades anteriorment, es van tornar a preparar un conjunt de quimeres artificials més ampli, aquest cop fent dilució seriada de la barreja més concentrada i analitzant duplicats de cada reacció per veure la reproductibilitat. En aquesta ocasió el component majoritari l'aporta la mostra 301274, dona homocigot Kell negatiu, simulant una gestant i el component minoritari el proporciona la mostra 206643, home heterocigot, simulant un fetus. Les diferents proporcions preparades en aquestes barreges quimèriques es poden visualitzar a la **Taula 7**. Per aprofundir en l'avaluació de l'efecte que pot produir les diferències de volum de DNA de plasma, es van analitzar els duplicats a diferents volums de DNA de 3 i 6 μ l.

Un cop processades aquestes mostres i analitzant les seqüències obtingudes per alineament amb la seqüència de referència, podem extreure la següent informació (**Figura 19A**): Respecte del polimorfisme K1 del gen KEL, s'observa que en les mostres Q15, Q12, Q8 i Q3 la freqüència promig del polimorfisme K1 es molt aproximada a la freqüència teòrica. En canvi, en les mostres Q20 i Q6 son inferiors a les teòriques i en la mostra Q1, en la que el percentatge de representació de K1 era només d'un 1%, no arriba detectar-se. Pel que fa a la seqüència del gen SRY (**Figura 19B**), es detecta molt bé en totes les mostres excepte en el control negatiu.

Taula 7. Mostres controls i artificials per a la validació de l'experiment

Mostra	
301274	DNA plasma ♀ K2/K2 com a Control Negatiu
206643	DNA plasma ♂ K1/K2 com a Control Positiu
Q2 20%	
Q2 15%	
Q2 12%	
Q2 8%	
Q2 6%	
Q2 3%	
Q2 1%	

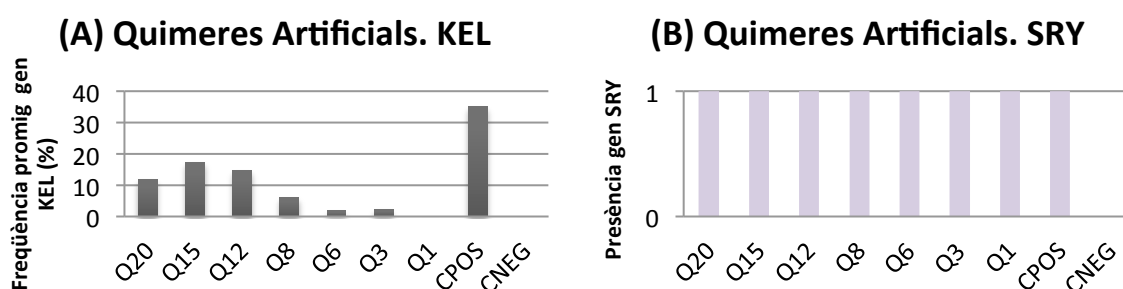


Figura 9. Comprovació de les freqüències de DNA fetal inserit a cada barreja quimèrica. A la figura A) s'observa la freqüència mitjà obtinguda del gen KEL en les diferents quimeres artificials. A l'eix d'ordenades es pot observar la freqüència gènica en percentatge. A la figura B) s'observa la presència o absència del gen SRY en cadascuna de les barreges quimèriques. A l'eix d'ordenades es pot observar la presència del gen SRY (1) o la seva absència (0).

En quart lloc, un cop verificada l'eficàcia de la tècnica en mostres quimèriques control, el pas següent va ser de comprovar si la tècnica emprada per a l'anàlisi de l'exó 6 del gen KEL era adequada per a l'anàlisi de mostres procedents de gestants portadores de fetus Kell positiu o negatiu. En aquesta ocasió es van utilitzar fins a 17 mostres de plasma de gestants (**Taula 8**) i es van introduir les següents variables: 1) analitzar triplicats de cada mostra i 2) provar d'utilitzar tres concentracions de DNA diferents (3, 6 i 9 µl de DNA de plasma).

Un cop processades aquestes mostres i analitzant les seqüències obtingudes per alineament amb la seqüència de referència (**Figura 20**), s'observa que en les mostres 59389, 57895, 57494, 52684, 51601, 42318 i 26782 es detecta el polimorfisme K1 del gen KEL, determinant que els fetus tenien un fenotip Kell positiu concordant amb els genotips KEL fetal positiu coneguts prèviament. En canvi, en les mostres 59931, 53359, 50523, 49910, 49488, 45554, 41437, 29148, 28995 i 18518 no es detecta el polimorfisme K1 del gen KEL, determinant que els fetus tenien un fenotip Kell negatiu concordant amb els genotips KEL fetal negatius coneguts. Malgrat que els resultats han estat correctes qualitativament en totes les mostres, el nivell de detecció del polimorfisme K1 en les mostres positives ha estat força baix, de l'ordre d'un 1%.

Taula 8. Mostres analitzades de gestants

59931	57494	51601	49488	41437	26782
59389	53359	50523	45554	29148	18518
57895	52684	49910	42318	28995	

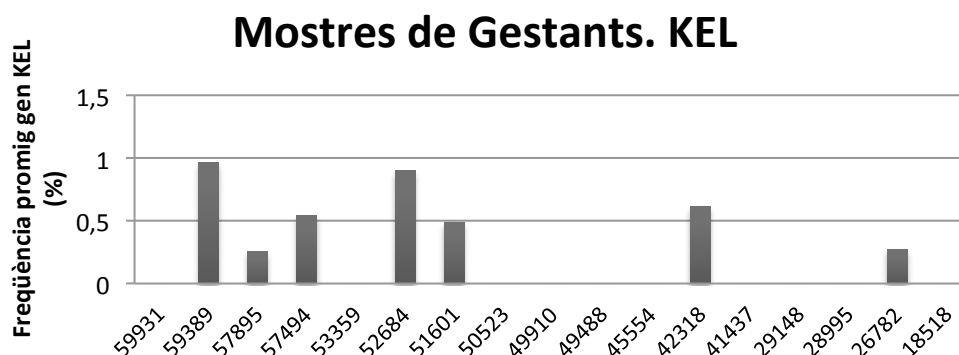


Figura 10. Comprovació de la seqüenciació de l'exó 6 del gen KEL en mostres de gestants. En l'eix d'abscisses s'observen les mostres analitzades i a l'eix d'ordenades el percentatge de DNA fetal corresponen als gens seqüenciats

Finalment, dintre del aspectes potencialment millorables en el procediment, està la qualitat del DNA de plasma que es el punt de partida i que com sabem prové de cèl·lules apoptòtiques i està molt fragmentat. En aquest sentit s'ha volgut avaluar la utilització d'un sistema de reparació de DNA (**NEBNext FFPE Repair⁵**) per veure si millorava l'amplificació i/o seqüenciació dels fragments gènics analitzats. D'altra banda, i tenint en compte que el que es pretén detectar es el component minoritari d'un barreja, s'ha volgut comprovar si una disminució de cicles durant la primera reacció de PCR (PCR1), afavoria o no, el ratio de seqüències d'origen fetal respecte les seqüències d'origen matern que estaven representades abans de prosseguir el procés amb la multiplexació. Les mostres de gestants seleccionades per realitzar aquestes proves es troben indicades a la **Taula 9**. Per obtenir una reproductibilitat més elevada del resultats, les mostres han estat analitzades per duplicat. D'altra banda, es van analitzar aquests duplicats a concentracions diferents per aprofundir en l'efecte de les diferències del volum de DNA de plasma.

Un cop processades aquestes mostres i analitzant les seqüències obtingudes per alineament amb les seqüències de referència (**Figura 21A**) s'observa que en les mostres 57895 i 42318, tractades amb un sistema de reparació del DNA, es detecta el polimorfisme K1 del gen KEL amb una freqüència màxima 0,9%. En canvi, en la mostra 53359 no s'ha detectat el polimorfisme K1 del gen KEL. D'altra banda, l'anàlisi de la mostra amb 37 cicles en la primera PCR no ha detectat el polimorfisme K1 del gen KEL. Pel que fa a l'anàlisi del gen SRY a les mostres esmentades anteriorment (**Figura 21B**), s'observa com únicament les mostres que no han detectat el gen SRY, són les tractades amb el sistema de reparació de DNA. En canvi, la mostra analitzada amb una PCR de 37 cicles si que ha detectat la presència del gen SRY.

Totes les seqüències analitzades en aquest segon experiment no contenen una variabilitat gènica molt elevada perquè només s'analitzaven dos tipus de gens diferents. El fet de no tenir una

⁵ **NEBNext FFPE Repair:** Còctel d'enzims específicament formulats i dissenyats per a la reparació de DNA danyat. (BioLabs, Inc., 2015)

variabilitat elevada podria saturar la càmera fotogràfica del seqüenciador mentre les bases inserides emeten fluorescència, per una sobrerrepresentació d'aquestes. Per aquest motiu, s'ha desnaturalitzat i diluït la llibreria afegint *PhiX* (**veure material i mètodes Pàg.19**), per tal d'augmentar aquesta variabilitat i evitar una possible saturació del sistema.

Taula 9. Mostres emprades en els anàlisis amb un sistema de reparació del DNA i la realització d'una PCR de 37 cicles.

Mostres	Anàlisi
57895	Repair + PCR 37 Cicles
53359	Repair
42318	Repair

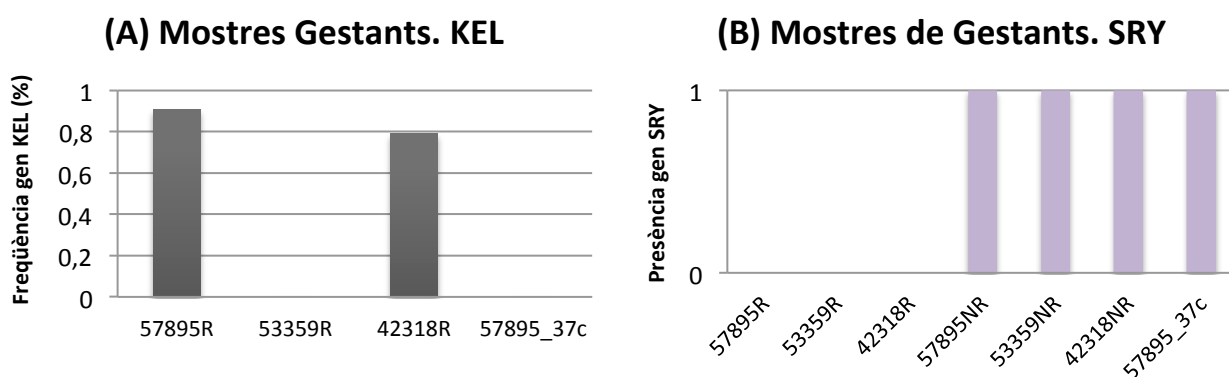


Figura 11. Comprovació de les freqüències de DNA fetal amb el polimorfisme C/T en mostres de gestants. A la figura A) s'observa la freqüència mitjà obtinguda del gen KEL en les diferents gestants. A l'eix d'ordenades es pot observar la freqüència gènica en percentatge. A la figura B) s'observa la presència o absència del gen SRY en cadascuna de les mostres analitzades. A l'eix d'ordenades es pot observar la presència del gen SRY (1) o la seva absència (0).

5. DISCUSSIÓ

El protocol estàndard per a la determinació del genotip Kell fetal en plasma matern al Banc de Sang i Teixits és l'amplificació de l'exó 6 de manera *uniplex* utilitzant tècniques de PCR a temps real. La utilització de tècniques de seqüenciació massiva per a l'amplificació i detecció d'aquest genotip rau en que aquest exó presenta un únic *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*, a la posició nucleotídica 578 on es canvia una C per una T. Les tècniques de seqüenciació massiva poden comportar un avenç molt important en el genotipatge d'aquest gen ja que detecció d'un sol SNP pot resultar molt inespecífica realitzant només tècniques d'amplificació que no pas amb tècniques de seqüenciació de nova generació, on es generen al voltant d'un milió de *clústers* per molècula de DNA unida a la cel·la de flux del seqüenciador. Durant la seqüenciació del gen problema es poden fer servir gens com AMEL o SRY per què son gens que indiquen el sexe de la mostra analitzada. El fet, que s'indiqui el sexe de la mostra només es útil en casos on les gestants siguin portadores de fetus amb sexe masculí. En aquests casos, es podrien validar els resultats obtinguts perquè es corroboraria que només s'ha detectat DNA de plasma procedent del fetus i no pas de la mare que es el component majoritari en les mostres de plasma extretes a les gestants.

En ell treball de Fi de Grau s'avaluen quatre aspectes diferents en relació amb el genotipatge del gen KEL. En primer lloc, per realitzar les primeres probes i determinar si existeix una relació entre el volum de mostra i la qualitat dels resultats, es va procedir a comprovar l'eficàcia de la seqüenciació i detecció del polimorfisme KEL1 emprant tres volums de DNA inicials diferents. Antigament, en els protocols estàndard de tipificació gènica, l'extracció de DNA es realitzava manualment mentre que actualment es realitza mitjançant l'extractor *QIAasympfony* que té un rendiment de recuperació del DNA de plasma molt superior. Així mateix, com la el volum disponible de mostra actualment es superior, es podia avaluar si el fet d'utilitzar una quantitat de DNA de plasma més o menys elevada, estava relacionat amb la seqüenciació de les diferents seqüències gèniques i afectava a la freqüència de detecció. En els primers resultats que es mostren a la **Figura 17B**, no s'observa cap relació aparent entre el volum de DNA de plasma inicial i la qualitat de la detecció del polimorfisme KEL1. Posteriorment, al segon experiment (**Figura 20**) es van agafar tres volums de DNA de plasma diferents per a cada mostra analitzada. En aquest cas, els resultats tampoc mostren que existeixi una relació entre el volum de DNA i la freqüència de detecció. El fet que no s'observi una relació a aparent ens va donar la opció de realitzar un promig de la freqüència de detecció del polimorfisme per poder simplificar els resultats i determinar de manera més eficient en quines mostres s'obtenia un resultat positiu i en quines no es detectava. Per tant, no es pot determinar que un augment del volum inicial de DNA de plasma, que es fa servir per a la ampliació de les diferents seqüències gèniques influeixi ni positivament ni negativament sobre el procés de seqüenciació i detecció.

Finalment, amb la realització de la primera prova es va poder observar si la setmana de gestació de la pacient era primordial per a obtenir una bona freqüència de detecció o no. Teòricament s'estableix que la concentració de DNA de plasma procedent del fetus augmenta amb les setmanes de gestació, tot i que aquesta concentració no sol ser superior a un 2-6% del volum total de plasma matern. No obstant això, a la pràctica no s'ha pogut corroborar perquè com es pot observar a la **Figura 20**, les mostres 51601 i 52684, es trobaven en setmana de gestació 22 però, la freqüència de detecció del polimorfisme en 51601 es inferior a la obtinguda en 52684. Aquests resultats, indiquen que realment la concentració de DNA fetal no depèn únicament de la setmana de gestació sinó que

també es pot veure influenciada per el metabolisme matern i la conservació i manipulació de la mostra de sang perifèrica extreta a la gestant.

En segon lloc, es va analitzar l'eficiència i utilitat de fer servir els gens AMEL i/o SRY com a marcador de sexe fetal en una amplificació *multiplex*. En la primera prova es va fer servir el gen AMEL com a marcador de sexe (**Figura 17**), ja que els *primers* es trobaven disponibles al laboratori. Els resultats obtinguts de les mostres procedents de gestants (totes portadores d'un fetus masculí-dada prèviament coneguda) s'observa un resultat positiu per la seqüència AMEL-Y, concordant amb les dades conegudes del sexe fetal. Tot i així, es va decidir fer unes proves amb el gen SRY, ja que es el gen que s'utilitza de manera rutinària durant el genotipatge amb PCR a temps real. Per aquest motiu, es podrien comparar els resultats obtinguts amb les dues tècniques i analitzar si realment l'anàlisi del polimorfisme KEL1 amb tècniques de seqüenciació massiva representen un avenç respecte les tècniques actuals. Com s'observa a la **Figura 18**, la freqüència de detecció ha estat molt bona i les mostres detectades concorden amb els resultats esperats. No obstant, la freqüència de detecció del gen SRY ha estat molt per sobre que la freqüència de detecció del gen KEL. Aquest fenomen pot esdevenir de la mida del gen SRY, que només té 62 pb i per contra el KEL té 125pb. La diferència de mida ha provocat que el procés d'amplificació del gen SRY es veiés afavorit i llavors es donés un solapament sobre el KEL durant el procés de seqüenciació fent disminuir al mínim el número de lectures realitzades sobre el gen KEL. Si el procés d'amplificació no hagués desviat el nombre d'amplicons de cada gen, s'haurien d'haver obtingut pràcticament un 50% de lectures de cadascun dels gens en comptes de pràcticament un 80% de lectures de SRY. Per evitar aquest solapament, s'hauria d'haver tingut en compte la mida en tots els processos i s'hauria d'haver agafat el doble de volum de mostra de KEL que de SRY a l'hora de realitzar el *pool* per dur a terme la PCR *multiplex* d'etiquetatge de les mostres. Aquesta pèrdua de lectures sobre el gen KEL pot influir en la probabilitat de detecció del polimorfisme KEL1. Com a conseqüència, interessaria optimitzar la tècnica per tal d'utilitzar aquest gen en altres ocasions o d'altra banda, per evitar-ho es podria fer servir AMEL que a més es capaç de detectar tant el component Y com el X.

En tercer lloc, es va aplicar un sistema de reparació del DNA a una bateria de mostres que teníem disponibles per determinar si comportava una millora en l'amplificació i posterior seqüenciació del polimorfisme del gen KEL fetal ja que la proporció de DNA lliure en plasma procedent del fetus, com s'ha esmentat anteriorment es molt baixa i a més aquest DNA es troba molt fragmentat i per tant es molt inestable. Tal i com es pot observar a la **Figura 21A**, només dues de les mostres de gestants utilitzades han detectat el polimorfisme KEL1, concordant amb els resultats esperats. No obstant, la freqüència de detecció d'aquestes es molt similar a la freqüència de detecció de les mostres sense tractament. D'altra banda, com es pot observar a la **Figura 21B**, el sistema de reparació de DNA utilitzat en la prova ha afectat de manera negativa sobre la detecció del sexe fetal, ja que els resultats no concorden amb els esperats (SRY no ha estat detectat en cap de les mostres de gestants portadores amb un fetus de sexe masculí). Tot i això es desconeixen els motius que han provocat aquest succés, ja que el sistema de reparació es tracta d'una barreja d'enzims i en principi no haurien d'afectar en el procés de seqüenciació. Analitzant els resultats obtinguts es pot determinar que en les proves sobre DNA fetal lliure no ha representat cap resultat significativament positiu però tampoc negatiu, per tant, la utilització d'aquesta tècniques quedaria descartada per a futurs experiments sobre DNA de plasma.

Finalment, es va analitzar el possible efecte d'una disminució del nombre de cicles durant la primera PCR. El primer procés d'amplificació per PCR requeria 40 cicles però, es va plantejar que pot ser amb aquest nombre tan elevat potser estàvem massa a prop de l'etapa *plateau*. Per aquest motiu, es va decidir disminuir el procés d'amplificació en tres cicles menys i realitzar una prova sobre una de les mostres de gestants que es tenien més alíquotes disponibles al laboratori i que a més es coneixia que era portadora d'un fetus masculí Kell positiu. Com es pot observar als resultats de la **Figura 21A i B**, mentre que SRY ha estat detectat sense problemes, el polimorfisme C/T no ha estat detectat. Una de les possibles respostes és que d'una banda, probablement la mida de SRY ha provocat un desviament del procés d'amplificació, desfavorint l'amplificació de l'exó 6 del gen KEL. I d'altra banda, la disminució de cicles segurament ha provocat que no es tingués temps per realitzar suficients rèpliques de l'amplicó. Per aquests motius, es pot determinar que la disminució de cicles del procés d'amplificació en la primera PCR s'hauria de descartar en futurs projectes perquè no s'han observat resultats positius, però si realment es plantejés una disminució per trobar el nombre de cicles òptim, s'hauria d'optimitzar el procés realitzant més proves.

6. CONCLUSIONS

- Assessment of the sensitivity of polymorphism detection reveals that does not exist a direct relationship between the amount of plasma DNA used in the assay and the frequency of polymorphism detection.
- About the analysed sex markers, SRY is detected in all cases with good efficiency. Nevertheless, as the SRY amplicon size is much smaller, the efficiency of its amplification in a multiplex run with other sequences has disfavoured their amplification. Therefore, in future multiplex assays it would be better to avoid it .
- Analysis of the AMEL gene, in contrast, provides information on both components X/Y and the amplicon size makes it more suitable for multiplex analysis parallel to other sequences of interest.
- The evaluation of different strategies to determine the fetal KEL genotype from maternal plasma, leads to the conclusion that is not helpful to use a repair DNA system on *cffDNA* nor to reduce the PCR cycles without altering the sequencing reaction and the polymorphism detection.
- The different conditions assayed have shown that the overall approach is effective, but it still needs optimization, because it is an innovative strategy and there are still reaction parameters that need to be refined before to offer this test as a routine service.
- Finally, the strategy developed represents the first step towards the application of next-generation sequencing approaches to non-invasive fetal genotyping in immunized pregnant women. Despite the present work has focused on the fetal KEL polymorphism and sex markers, other blood group incompatibilities may be analysed by similar approaches in the future.

7. BIBLIOGRAFIA

Llibres i Articles

- Abdel-Fattah, S., & Soothill, P. (2001). Assessing the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn: clinical aspects. In A. Hadley & P. Soothill (Eds.), *Alloimmune disorders of pregnancy* (pp. 153–172). Cambridge University Press. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511527043.011>
- Armstrong, B., & Smart, E. (2008). Haemolytic diseases. *ISBT Science Series*, 3, 93–109. doi:10.1111/j.1751-2824.2008.00189.x
- Camara-Clayette, V., Rahuel, C., Lopez, C., Hattab, C., Verkarre, V., Bertrand, O., & Cartron, J. P. (2001). Transcriptional regulation of the KEL gene and Kell protein expression in erythroid and non-erythroid cells. *The Biochemical Journal*, 356, 171–180. doi:10.1042/0264-6021:3560171
- Cortés, A., Muñoz, E., & León, G. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada.pdf*.
- Daniels, G. (2002). *Human Blood Groups. Human Blood Groups*.
- Dean, L. (2005). Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane. *Blood Groups and Red Cell Antigens*, 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>
- Ferreira, A., Roseblatt, M., & Vergara, U. (2002). *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*.
- Finning, K., Martin, P., Summers, J., & Daniels, G. (2007). Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*, 47, 2126–2133. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01437.x
- Generation, C. (2010). Illumina Sequencing Technology. *Image Rochester NY*, 21, 1–5. doi:10.1016/S0167-7799(03)00189-6
- Gupta, A., Holzgreve, W., Huppertz, B., Malek, A., Schneider, H., & Hahn, A. (2004). Detection of Fetal DNA and RNA in Placenta-Derived Syncytiotrophoblast Microparticles Generated in Vitro. *Clinical Chemistry*, 50(11), 2185–2187. doi:10.1373/clinchem.2004.036806
- Hadley, A. G., & Turner, C. (2001). Pathophysiology of the alloimmune cytopenias. In A. Hadley & P. Soothill (Eds.), *Alloimmune disorders of pregnancy* (pp. 1–20). Cambridge University Press. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511527043.003>
- Hadley, A., & Soothill, P. (2002). *Alloimmune Disorders of Pregnancy: Anaemia, Thrombocytopenia and Neutropenia in the Fetus and Newborn*. Cambridge University Press. Retrieved from https://books.google.es/books?id=lnYzm8t_h1cC
- Illumina. (2013). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. *Illumina*, 1–12. doi:Pub No. 770-2012-008
- Lee, S. (1997). Molecular basis of Kell blood group phenotypes. *Vox Sanguinis*, 73, 1–11. doi:10.1046/j.1423-0410.1997.7310001.x

- Lo, E. S. F., Lo, Y. M. D., Hjelm, N. M., Thilaganathan, B., Petit, T., Brison, O., ... Gluckman, E. (1998). Transfer of nucleated maternal cells into fetal circulation during the second trimester of pregnancy [1]. *British Journal of Haematology*, *100*(1997), 605–606. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.0636a.x
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, *350*, 485–487. doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0
- Moise, K. J. J., & Whitecar, P. W. (2001). Antenatal therapy for haemolytic disease of the fetus and newborn. In A. Hadley & P. Soothill (Eds.), *Alloimmune disorders of pregnancy* (pp. 173–202). Cambridge University Press. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511527043.012>
- Poole, J., Warke, N., Hustinx, H., Taleghani, B. M., Martin, P., Finning, K., ... Daniels, G. (2006). A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL1 antigen. *Transfusion*, *46*(November), 1879–1885. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00993.x
- Rieneck, K., Bak, M., Jønson, L., Clausen, F. B., Krog, G. R., Tommerup, N., ... Dziegiel, M. H. (2013). Next-generation sequencing: Proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*, *53*, 2892–2898. doi:10.1111/trf.12172
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, a R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Seetharam, A., Tiriveedhi, V., & Mohanakumar, T. (2010). Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation*, *15*, 531–536. doi:10.1097/MOT.0b013e32833b31f4

UCTS, V. H. (2010). “Tecnologías de alto rendimiento en genómica.”

Protocols Interns

1. Farssac, E. et al. (2012) Extracció de DNA a partir de mostres de sang utilitzant l'extractor QIAasymphony.
2. Vidal, F. et al. (2014). Purificació de DNA en placa amb Agentcourt Ampure XP
3. Vidal, F. et al. (2015). Preparació RUN seqüenciació Miseq

Pàgines Web

1. American Cancer Society, [<http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectos/secundarios/otrotratamientos/fragmentado/trasplante-de-celulas-madre-de-la-medula-osea-y-de-la-sangre-periferica-allogeneic-transplant>]. [Consulta: 11-02-15]
2. BioLabs, Inc., New England, [<https://www.neb.com/products/m6630-nebnext-ffpe-dna-repair-mix>] [Consulta: 11-05-2015]

3. Illumina. DNA Sequencing, [http://www.illumina.com/applications/sequencing/dna_sequencing.html]. [Consulta: 26-02-2015]
4. Illumina. MiSeq Desktop Sequencer, [<http://www.illumina.com/systems/miseq.html>]. [Consulta: 26-02-2015]
5. Illumina. Next-Generation Sequencing (NGS), [<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>]. [Consulta: 26-02-2015]
6. Illumina. Sequencing by synthesis, [<https://www.youtube.com/embed/HMyCqWhwB8E?iframe&rel=0&autoplay=1>]. [Consulta: 25-02-2015]
7. ISBT. International Society of Blood Transfusion, [<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/>]. [Consulta: 11-02-2015]
8. MedlinePlus. Información de salud para usted, [<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000821.htm>]. [Consulta: 10-02-2015]
9. MedlinePlus. Información de salud para usted, [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/17170.htm]. [Consulta: 23-02-2015]
10. NCBI. Blood Group Antigen Gene Mutation Data Base, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_info&system=kel]. [Consulta: 17-02-2015]
11. NYU Langone medical center. Transfusión intrauterina, [<http://www.med.nyu.edu/content?ChunkIID=629522>]. [Consulta: 23-02-2015]
12. NYU Langone medical center. Plasmaféresis, [<http://www.med.nyu.edu/content?ChunkIID=121207>]. [Consulta: 23-02-2015]
13. QIAGEN, [<file:///C:/Documents%20and%20Settings/immuno.BSTCAT/My%20Documents/Downloads/EN-QIASymphony-VirusBacteria-Handbook.pdf>] [Consulta: 25-02-2015]