

Estudio preliminar del genotipo plaquetario HPA en pacientes en espera de trasplante renal

Romero-Díaz Y, Soler-Noda G, Segura-Cadiz F, Aquino-Rojas S, Bencomo-Hernández A
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.
Email: yisi2801@gmail.com

RESUMEN

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) se expresan en 6 glucoproteínas plaquetarias diferentes y ha sido descrito que estos antígenos pueden estimular la producción de aloanticuerpos una vez expuestos a plaqueta humanas con diferentes HPAs, provocando varios problemas clínicos tales como la trombocitopenia neonatal aloinmune (NAIT, por sus siglas en inglés) y púrpura postransfusional. El estudio de genotipo de los antígenos HPA-1,2,3 a/b se realizó mediante PCR multiplex, mientras que para el estudio de genotipo de los antígenos HPA-5a/b se utilizó la técnica de PCR con secuencia específica de primer. Los productos de ADN amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa y mediante electroforesis capilar. El análisis de los fragmentos de ADN amplificados reveló que para el genotipo de los antígenos HPA-1,2,3 a/b se obtuvo amplificación de los fragmentos en el 100 % de las muestras siendo estas homocigóticas para el fenotipo a; en el análisis del fenotipo HPA-5 solo el 45 % de las muestras resultó ser positiva; siendo el 26 % de estas muestras homocigóticas para el fenotipo a, mientras que el 19 % de las muestras resultó ser homocigótica para el fenotipo b. Nuestros resultados muestran diferencias significativas para los genotipos HPA 1,2,3 a/b con respecto a lo planteado en la literatura, no así, para el genotipo HPA 5.

Palabras clave: antígenos, genotipo, fenotipo, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA por sus siglas en inglés) se expresan en 6 glucoproteínas plaquetarias diferentes y ha sido descrito que estos antígenos pueden estimular la producción de aloanticuerpos una vez expuestos a plaqueta humanas con diferentes HPAs, provocando varios problemas clínicos como la trombocitopenia neonatal aloinmune (NAIT, por sus siglas en inglés) y púrpura postransfusional. Hasta la fecha han sido reportados en la literatura alrededor de 27 antígenos HPA, 12 de los cuales se encuentran agrupados en sistemas bialélicos (HPA-1; 2; 3; 4; 5 y 15) siendo estos últimos sistemas no solo caracterizados sino que también es conocida la frecuencia de ellos en diferentes poblaciones; sin embargo la frecuencia de estos antígenos en la población cubana es desconocida.

La técnica de inmovilización de antígenos plaquetarios con anticuerpos monoclonales (MAIPA por sus siglas en inglés) es uno de los procedimientos más empleados en la detección de anticuerpos anti-HPA; sin embargo esta técnica a pesar de ser sensible requiere de anticuerpos específicos para estos antígenos además de ser una técnica muy laboriosa por lo que los métodos basados en el estudio del ADN han sido ampliamente utilizados en distintos laboratorios a nivel mundial no solo por la especificidad de estos sino también por la facilidad que implica su uso en el diagnóstico por lo que el genotipaje de los distintos sistemas HPA es requerido en la investigación de pacientes con sospechas de alosensibilización contra antígenos HPA para proveer al paciente unidades de concentrado de plaquetas compatibles, carentes del antígeno contra el cual se desarrolló la respuesta inmune.

OBJETIVOS

- Determinar el genotipo HPA en una pequeña muestra de pacientes con enfermedad renal crónica en espera de trasplante.
- Realizar la amplificación de los primers específicos para los genotipos HPA 1,2,3 a/b, HPA 5 a/b, HPA 15 a/b mediante PCR-SSP
- Realizar la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis capilar y electroforesis en gel de agarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS



Obtención de la muestra

A partir de una muestra de sangre total de los pacientes se procedió a la centrifugación de la misma para separar el plasma de los eritrocitos. Una vez separada la fase sólida de la fase líquida, se tomó la capa intermedia de buffycoat para realizar la extracción del material genético en el equipo de extracción de ADN Qiacube, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción de amplificación

Durante la reacción de amplificación fueron utilizados los cebadores correspondientes a las hormonas de crecimiento HGH-1 y HGH-2, los cuales fueron utilizados como controles y los cebadores específicos para la amplificación de los genotipos HPA-1; 2;3 a/b y HPA5 a/b.

Primer HGH-1 5'-CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A-3'

Primer HGH-2 5'-ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3'

Primer 1a 5'-ACT TAC AGG CCC TGC CTC T-3'

Primer 1b 5'-ACT TAC AGG CCC TGC CTC C -3'

Primer 1II 5'-GTG CAA TCC TCT GGG GAC T -3'

Primer 2a 5'-CC CCC AGG GCT CCT GAC-3'

Primer 2b 5'-CC CCC AGG GCT CCT GAT-3'

Primer 2 II 5'-GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG-3'

Primer 3a 5'-GGG GGA GGG GCT GGG GA-3'

Primer 3b 5'-GGG GGA GGG GCT GGG GC-3'

Primer 3I 5'-GGC CCT GGG ACT GTG AAT G-3'

Primer 5AK 5'-AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG-3'

Primer 5BK 5'-AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA-3'

Primer 5D 5'-CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA CAC T-3'

Primer 15-a 5'-TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT GG -3'

Primer 15-b 5'-TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT GT -3'

Primer 15 COM 5'-ATG ACC TTA TGA TGA CCT ATT -3'

La reacción de amplificación de los genotipos HPA 1;2;3 a/b se realizó mediante PCR multiplex, mientras que la amplificación de los genotipos HPA 5 a/b y HPA15 a/b fue realizada mediante la técnica de PCR con secuencia específica de primers siguiendo las instrucciones del protocolo establecido por Muñiz y colaboradores, los componentes de las distintas reacciones se muestran en la tabla.

La detección de los productos amplificados de todas las reacciones se realizó mediante electroforesis capilar en el equipo de electroforesis capilar Qiaxcel (Qiagen) y mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa a una concentración del 2 %. Posterior a la aplicación del producto de PCR, el gel de agarosa se sumergió en una solución tampón Tris-Borato EDTA (TBE 10X) (Tris base 0.089 M; 0.089 M de ácido bórico; 2 mM de EDTA pH 8) conteniendo 4 gotas de Gel Red en sustitución del bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 45 min empleando como patrón de peso molecular el DNA Molecular Weight (Roche). La visualización de la banda amplificada se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un UV-transiluminador.

Tabla I. Componentes de la mezcla de reacción (PCR) HPA-1;2;3 *a/b*, HPA5 *a/b* y HPA15a, *b*.

Componentes	Volumen empleado (μL)
Top Taq Buffer 5x	5
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
dNTPs (10 mM)	1
HGH-1 (10 μM)	0.37
HGH-2 (10 μM)	0.37
HPA-1 <i>a/b</i> (12,5 μM)	0.75
HPA-2 <i>a/b</i> (12,5 μM)	0.5
HPA-3 <i>a/b</i> (10 μM)	0.5
HPA-1 II (12,5 μM)	0.75
HPA-2 II (12,5 μM)	0.5
HPA-3I (10 μM)	0.5
HPA-5 A	1.04
HPA-5 B	1
HPA-15 <i>a/b</i> (100 μM)	0.12
HPA-15 COMI (100 μM)	0.12
GoTaqFlexi	0.2
H ₂ O	a completar 25

Resultados

Las glucoproteínas plaquetarias expresan múltiples estructuras polimórficas determinadas genéticamente o antígenos HPA que pueden inducir alosensibilización por embarazos y

transfusión de componentes plaquetarios, provocando TNAI, PPT, Refractoriedad plaquetaria, entre otras patologías.

El análisis de los fragmentos de ADN amplificados reveló que para el genotipo de los antígenos HPA-1,2,3a/b se obtuvo amplificación de los fragmentos en el 100 % de las muestras siendo estas homocigóticas para el fenotipo *a*.

La reacción de amplificación correspondiente al genotipo HPA-5 reveló que solo el 45 % de las muestras resultó ser positiva; el 26 % de estas fueron homocigóticas para el fenotipo *a*, mientras que el 19 % resultó ser homocigótica para el fenotipo *b*, se observó una mayor prevalencia del fenotipo *a*.

Durante el estudio de correspondiente al genotipo HPA-15 se observó amplificación en el 100 % de las muestras siendo el 4 % de estas homocigóticas para el fenotipo *b* mientras que el 96 % de las muestras resultó ser heterocigótica.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran diferencias significativas para los genotipos HPA 1,2,3 a/b con respecto a lo planteado en la literatura, no así, para el genotipo HPA 5. Al ser nuestro estudio preliminar y nuestra muestra pequeña no podemos dar un resultado concluyente. Por otra parte, al no ser conocida las frecuencias de estos genotipos en la población cubana no podemos realizar una comparación efectiva con nuestros resultados y lo planteado en la literatura.

RECOMENDACIONES

Llevar a cabo la realización de este estudio con un número de muestra mayor para conocer la frecuencia de estos genotipos en la población cubana

BIBLIOGRAFÍA

1. Peterson JA, Pechauer S, Gitter M, Kanack A, Curtis BR, Reese J, et al. Aster. New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune

- thrombocytopenia. Transfusion. 2012 May;52(5):1117-24. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03428.x.
2. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens. Vox Sang. 2014 Feb;106(2):93-102. doi: 10.1111/vox.12085.
 3. Liew M, Margraf L, Mitchell S, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of Human Platelet Antigens 1 to 6 and 15 by High-Resolution Amplicon Melting and Conventional Hybridization Probes. J Mol Diagn. 2006 Feb;8(1):97-104.
 4. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. Transfusion. 2011 Mar;51(3):558-69. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02862.x.
 5. Metcalf P. Platelet antigens and antibody detection. Vox Sang. 2004 Jul;87 Suppl 1:82-6.