

Anticuerpos antiplaquetarios en pacientes en espera de trasplante renal: resultados preliminares



Soler-Noda G, Suarez-Fajardo Y, Adams-Villalón Y, Aquino-Rojas S, Romero-Díaz Y, González-Díaz I, Blanco-Ponce O, Bencomo-Hernández A.
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba
Email: gsolern@infomed.sld.cu

RESUMEN

En pacientes politransfundidos, las múltiples transfusiones pueden inducir la producción de los anticuerpos antiplaquetarios. Los antígenos plaquetarios capaces de inducir la producción de estos anticuerpos son principalmente los antígenos del sistema antígeno leucocitario humano (HLA) y los antígenos específicos de plaquetas (HPA). Estos anticuerpos pueden llevar a desarrollar refractariedad plaquetaria, un fenómeno se traduce en una falta de respuesta a la transfusión y como consecuencia en una incapacidad para obtener una homeostasia normal y que puede llevar al fracaso del tratamiento transfusional del paciente. El objetivo fue identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos específicos de plaquetas (HPA) en pacientes en espera de trasplante renal. La detección de la especificidad e isotipo de los anticuerpos antiplaquetas se realizó por técnica de MAIPA (monoclonal antibodies immobilized platelets antigens) en 901 pacientes en espera de trasplante renal. Se detectaron anticuerpos anti-HPA en 78 pacientes (8,6 %), 24 femeninos y 54 masculinos. la mayoría de los anticuerpos reconocían a antígenos presentes en la glicoproteína CD41a (69,23 %) y en menor medida al HPA 15 (24,35 %). La mayoría de los anticuerpos anti-HPA fueron de la clase IgG y en menor frecuencia de las clases IgA e IgM. La presencia de anticuerpos anti-HPA en pacientes en espera de trasplante renal es poco frecuente; la mayoría de la clase IgG dirigidos contra los antígenos de las glucoproteínas IIb/IIIa pertenecientes al CD41.

Palabras clave: aloinmunización; anticuerpos antiplaquetarios; HPA; MAIPA

INTRODUCCIÓN

En pacientes politransfundidos, las múltiples transfusiones pueden inducir la producción de anticuerpos antiplaquetarios. Los antígenos plaquetarios capaces de inducir la producción de estos son principalmente los antígenos del sistema antígeno leucocitario humano (HLA) y los antígenos específicos de plaquetas (HPA). Estos anticuerpos pueden inducir refractariedad plaquetaria, un fenómeno que se traduce en una falta de respuesta a la transfusión de concentrados de plaquetas y como consecuencia en una incapacidad para obtener una homeostasia normal y que puede llevar al fracaso el tratamiento transfusional del paciente.

Los pacientes con enfermedad renal crónica constituyen un grupo de riesgo de aloinmunización al ser receptores potenciales de la transfusión. Otros estudios demuestran también el papel de los anticuerpos contra los antígenos HPA en el rechazo de trasplante, considerándolos dentro del espectro de antígenos de histocompatibilidad no-HLA. Hasta donde conocemos, no se han realizado estudios en nuestro país en este grupo de pacientes que demuestren la frecuencia de anticuerpos contra antígenos específicos de plaquetas.

Teniendo en cuenta que los pacientes con enfermedad renal crónica constituyen un grupo de riesgo de aloinmunización por transfusión y el trasplante de riñón es la opción más adecuada de tratamiento, la presencia de anticuerpos anti-plaquetarios puede también mediar rechazo de trasplante y no se han realizado investigaciones en nuestro medio en este campo y que la detección de estos anticuerpos previos al trasplante aporta una nueva herramienta para la evaluación del significado clínico postrasplante se propone investigar la presencia de anticuerpos anti-plaquetarios en pacientes en espera de trasplante renal.

OBJETIVOS

Identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos específicos de plaquetas (HPA) en pacientes en espera de trasplante renal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Procesamiento de las muestras

Se estudiaron 901 pacientes con enfermedad crónica renal en espera de trasplante, procedentes de los centros de diálisis de todo el país. La recolección de la muestra se realizó en cada uno de estos centros antes de que el paciente recibiera heparina y fuera conectado al riñón artificial. Se extrajeron 4 mL de sangre periférica en tubos con EDTA y 10 ml de sangre periférica en tubos secos.

Los laboratorios de inmunología regionales recibieron las muestras. Los tubos secos fueron centrifugados a 2 500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y el suero se distribuyó en alícuotas de 2 mL que se guardaron a -20°C hasta su envío. La transportación se realizó en recipientes adecuados que garantizaran el mantenimiento de la temperatura de congelación de las muestras. El estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunoematología del Instituto de Hematología e Inmunología, de La Habana.

Los datos demográficos e inmunológicos de los pacientes, se recogieron en planillas que incluyeron nombre y apellidos, edad, sexo, color de la piel, número de identidad personal, dirección, número de transfusiones, trasplantes anteriores, embarazos y enfermedades asociadas. Toda la información recogida se digitalizó en una base de datos de Microsoft Access.

Se respetaron los principios éticos relacionados con las investigaciones médicas como: la utilización solamente de la muestra biológica necesaria acorde con los requerimientos científicos. La aprobación por el Comité de Ética de la Investigación de la institución para la realización del estudio y el consentimiento informado de los pacientes para participar en la investigación.

Principios y metodología del ensayo de inmovilización de antígenos plaquetarios con anticuerpos monoclonales (MAIPA, por sus siglas en idioma inglés): La técnica se realizó de acuerdo a lo propuesto por Hayashi y Hirayama. Se utilizó una mezcla de plaquetas provenientes de 10 donantes de grupo sanguíneo O. En placas de fondo U se agregaron 130 µL de suspensión

de plaquetas a una concentración de 2×10^8 células/mL que después de centrifugadas durante 3 min a 2500 rpm y decantar el sobrenadante, se agregaron 65 μ L de los suero a investigar, y los sueros controles negativos y positivos que se incubaron 30 min a 37° C. Como control negativo se utilizó suero humano de donante masculino no transfundido y como suero control positivo se utilizaron muestras con anticuerpos anti-HPA-1, HPA-5 y HPA-15 provenientes del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona, España. Después de este tiempo los pocillos se lavaron 3 veces con 200 μ l de PBS-EDTA-BSA al 0,2 % en las mismas condiciones ex-puestas anteriormente y se decantó el sobrenadante. Al botón de plaquetas se le agregó en diferentes pocillos 1,5 μ l del anticuerpo monoclonal contra las glucoproteínas plaquetarias anti-CD41,-CD42a,-CD42b,-CD49b y anti- CD109 (Dako, Denmark AS) que se incubó 30 min a 37°C. Se realizaron tres lavados posteriores a los pocillos en las mismas condiciones descritas previamente y después de decantar el sobrenadante del último lavado se añadió a cada pocillo 160 μ L de buffer de solubilización compuesto por una solución de Tris-fosfato salina con NP-40 al 0,1 %. La solubilización se completó en una hora a 4°C. El solubilizado se recuperó después de la centrifugación y se diluyeron 1:2 con solución de lavado PBS-EDTA-BSA al 0,2 %. De la dilución del lisado se transfirieron 100 μ L a pocillos de placas de fondo plano (Nunc, Immunoplates) que previamente fueron recubiertas con 100 μ l de la dilución 1:500 de anticuerpos antirratón obtenido en conejos en solución de carbonato bicarbonato pH 9,6 (Dako, Denmark AS). La placa se incubó a 37°C durante 60 min. Después de los lavados habituales se le agregó a cada pocillo correspondiente 100 μ L de la dilución 1:5 000 en buffer de anticuerpos de conejo anti-IgG y anti-IgM conjugado con peroxidasa o de la dilución 1:2 000 de conejo anti-IgA-peroxidasa. Después de incubar a 37°C durante 60 min las placas se lavaron 5 veces con buffer de lavado y se les añadió 100 μ L del cromógeno OPD al 0,06 % en buffer de ácido cítrico que contiene peróxido de hidrógeno al 0,001 %. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiente en cámara oscura. La reacción se detuvo con la adición de 100 μ L de ácido sulfúrico 4N y la lectura de la densidad óptica (DO) se realizó a 490 nm en equipo automático de ELISA (Chemwel). Se consideró como un resultado positivo un valor de discriminación (K) superior a 2:1 determinado por la razón entre los valores de DO de las muestras estudiadas y el del control negativo.

RESULTADOS

De los 901 pacientes estudiados, 331 (36,7 %) correspondían al sexo femenino y 570 (63,3 %) al masculino. el rango de edad fue de 39 a 53 años, con un promedio de 44.6 años. Se detectaron anticuerpos anti-HPA en 78 pacientes (8,6 %), 24 femeninos y 54 masculinos. La aloinmunización anti-HPA se consideraba infrecuente, sin embargo, los estudios más recientes en pacientes politransfundidos informan tasas entre un 5-8 % similares a la obtenida en el grupo analizado. Hasta donde conocemos no se han comunicado estudios en la literatura consultada de identificación de anticuerpos anti-HPA en pacientes en espera de trasplante renal para comparar los resultados de esta serie.

La técnica MAIPA reveló que la mayoría de los anticuerpos reconocían a antígenos presentes en la glucoproteína CD41a y en menor medida al HPA 15 que es el único antígeno anclado en la glucoproteína CD109. De acuerdo a la distribución de los antígenos HPA en las diferentes glucoproteínas plaquetarias podría predecirse que los anticuerpos preferentemente estarían dirigidos contra los sistemas HPA-1, -3,-4, -9.

La mayoría de los anticuerpos anti-HPA fueron de la clase IgG y en menor frecuencia de la clases IgA e IgM, excepto para los anticuerpos dirigidos contra las glucoproteínas Ib (CD 42b) y Ia/IIa (CD 49b) donde se observa una alta frecuencia de anticuerpos de la clase IgA.

CONCLUSIONES

1. La presencia de anticuerpos anti-HPA en pacientes en espera de trasplante renal no es infrecuente.
2. Los anticuerpos anti-HPA en su mayoría están dirigidos contra los antígenos de las glucoproteínas IIb/IIIa pertenecientes al CD41.
3. La mayoría de los anticuerpos anti-HPA son de la clase IgG seguido de una respuesta dependiente de IgA preferiblemente contra las glucoproteínas Ib y Ia/IIa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood Transfus.* 2015;13 (3): 380–90
2. Jia Y, Li W, Liu N, Zhang K, Gong Z, Li D, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfus Med.* 2014; 24 (6):406 – 10
3. Younesi MR, Louni S, Bigdeli R, Lashgari M, Mazaheri H, Asgary V. Alloimmunization against platelets, granulocytes and erythrocytes in multi-transfused patients in Iranian population. *Transfus Apher Sci.* 2016; 14 (16):64-7.
4. Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine.* 12th ed. London: Wiley-Blackwell; 2014
5. Puga I, Cerutti A, Montserrat C. Modulación del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas por señales del sistema inmunitario innato. *Semin Fund Esp Reumatol* 2014;15:11-8 -