

## Introducción del genotipaje molecular de los antígenos plaquetarios

### Introduction of molecular genotyping of platelet antigens

Yisenia Romero Díaz<sup>1</sup> \*<http://orcid.org/0000-0002-1156-2143>

Gilberto Soler Noda<sup>1</sup> <http://orcid.org/0000-0002-1156-2143>

Antonio Bencomo Hernández<sup>1</sup> <http://orcid.org/0000-0002-6209-0393>

<sup>1</sup>Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

\*Lic. Yisenia Romero Díaz ([rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu))

#### RESUMEN

**Introducción:** Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) se expresan en 6 glucoproteínas plaquetarias diferentes. Se ha descrito que estos antígenos pueden estimular la producción de autoanticuerpos una vez expuestos a plaquetas humanas con diferentes HPA, lo que provoca complicaciones clínicas como la trombocitopenia neonatal autoinmune y la púrpura postransfusional. **Métodos:** Se realizó el estudio a 11 muestras de pacientes en espera de trasplante renal de genotipo de los antígenos HPA-1,2,3 a/b 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 electroforesis capilar. **Resultados:** El análisis de los fragmentos de ADN amplificados revelaron resultados similares por ambos métodos. Para los antígenos HPA-1,-2, el 63 % de las muestras fueron homocigóticas para el fenotipo (a) mientras que se observó heterocigocidad en todos los casos para el genotipo HPA-3. En el sistema HPA-5, el 54 % fueron homocigóticas para el fenotipo (a) y el 46 %, heterocigóticas. Para el genotipo del HPA-15, el 4 % fueron homocigóticas para el fenotipo (b) mientras que el 96 % resultaron ser heterocigóticas. **Conclusiones:** Estos resultados muestran similitudes para los genotipos HPA 1,

2,3 a/b, HPA 5a/b y HPA15 a/b respecto a lo planteado en la literatura.

**Palabras clave:** antígeno; genotipo; fenotipo, HPA 1, 2,3 a/b; HPA 5a/b; HPA15 a/b.

2

## ABSTRACT

**Introduction:** Human platelet antigens (HPA) are expressed in 6 different platelet glycoproteins. It has been described that these antigens can stimulate the production of alloantibodies once exposed to human platelets with different HPA, which causes clinical complications such as neonatal alloimmune thrombocytopenia and postransfusional purpura. **Methods:** The study was performed on 11 samples of patients awaiting kidney transplantation of genotype of the HPA-1,2,3 a/b antigens by multiplex PCR, while for the genotype study of the HPA-5a/b antigens was used the PCR technique with primer-specific sequence. The amplified DNA products were visualized by agarose gel electrophoresis and by capillary electrophoresis. **Results:** The analysis of DNA fragments amplified by agarose electrophoresis and capillary electrophoresis revealed similar results in both methods. For the HPA-1, -2 antigens, 63% of the samples were homozygous for phenotype (a) while heterozygosity was observed in all cases for the HPA-3 genotype. In the HPA-5 system, 54% were homozygous for the phenotype (a) and 46% were heterozygous. For the genotype of HPA-15, 4% were homozygous for phenotype (b) while 96% proved heterozygous. **Conclusions:** These results show similarities for the genotypes HPA 1, 2,3 a/b, HPA 5a/b and HPA15 a/b with respect to report in literature.

**Keywords:** antigen; genotype; phenotype; HPA 1, 2,3 a/b; HPA 5a/b; HPA15 a/b.

Recibido: 31/10/2018

Aceptado: 04/06/2019

## INTRODUCCIÓN

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA, por sus siglas en inglés) se expresan en 6 glucoproteínas (GP) plaquetarias diferentes. Se ha descrito que estos antígenos (Ag) pueden estimular la producción de aloanticuerpos en individuos que se exponen a plaquetas humanas

incompatibles, lo que provoca trombocitopenia neonatal aloinmune (TNAI), púrpura postransfusional (PPT) y refractariedad plaquetaria (RP). En algunos casos la RP ocurre por la respuesta inmunológica contra antígenos no exclusivos de estas células como antígenos ABO y HLA de clase I.<sup>(1,2,3,4,5,6,7)</sup> Hasta la fecha han sido reportados alrededor de 29 antígenos HPA, 12 de los cuales se han agrupado en los sistemas bialélicos HPA-1;2;3;4;5y15; de los que se conoce la frecuencia alélica en diferentes poblaciones.<sup>(3)</sup> Sin embargo, su frecuencia es aún desconocida en la población cubana.

La determinación del genotipo HPA permite corroborar las especificidades de los anticuerpos anti-HPA del paciente y proveer a este de unidades de concentrado de plaquetas de donantes HPA compatibles.<sup>(7,8,9,10,11,12,13,14)</sup>

Basado en lo antes expuesto el objetivo de este trabajo fue introducir y normalizar la determinación del genotipo HPA por técnica de PCR-SSP y PCR-multiplex en una muestra de pacientes con enfermedad renal crónica en espera de trasplante renal, comparar la lectura de los genotipos amplificados en electroforesis en gel de agarosa y capilar.

## MÉTODOS

### Obtención de la muestra

A partir de una muestra de sangre total de 11 pacientes se procedió a la centrifugación para separar el plasma de los eritrocitos. Se tomó la capa intermedia de *buffy coat* para realizar la extracción del material genético en el equipo de extracción de ADN Qiacube, según las instrucciones del fabricante.

### Reacción de amplificación

Una vez realizada la extracción del material genético, se procedió la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los cebadores diseñados para el estudio de genotipo HPA1,2,3 a/b y HPA5a/b.<sup>(7,8)</sup> El estudio molecular correspondiente al genotipo HPA15 a/b se realizó con los cebadores correspondientes para el estudio de este genotipo; con una ligera modificación de la temperatura de alineamiento del segundo ciclo del programa a 58°C.

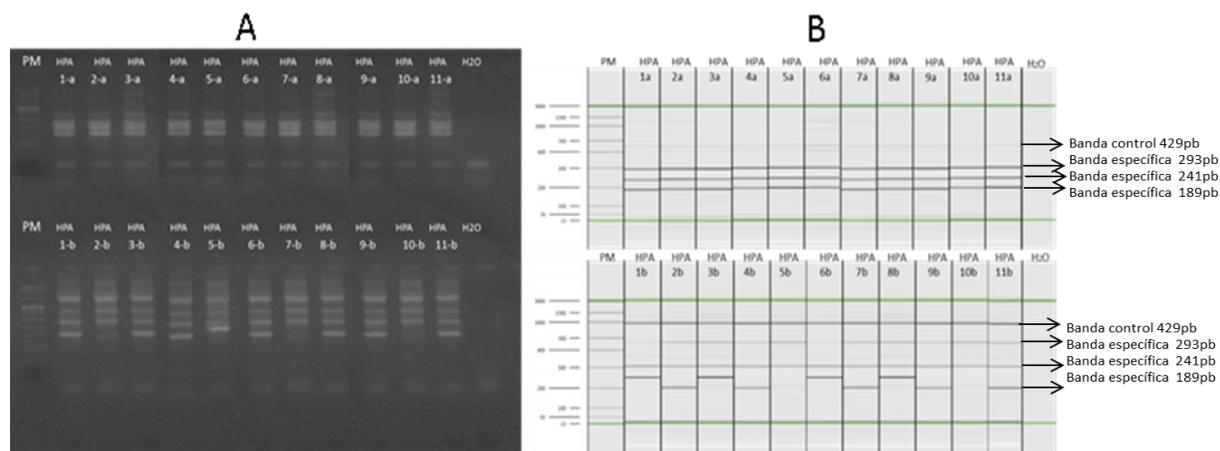
El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y electroforesis capilar.

En todo momento se respetaron los principios básicos de la investigación biomédica en seres humanos.<sup>(9)</sup>

## RESULTADOS

El análisis de los fragmentos de ADN amplificados, mediante electroforesis de agarosa y electroforesis capilar, reveló resultados similares en ambos métodos para todos los genotipos HPA investigados.

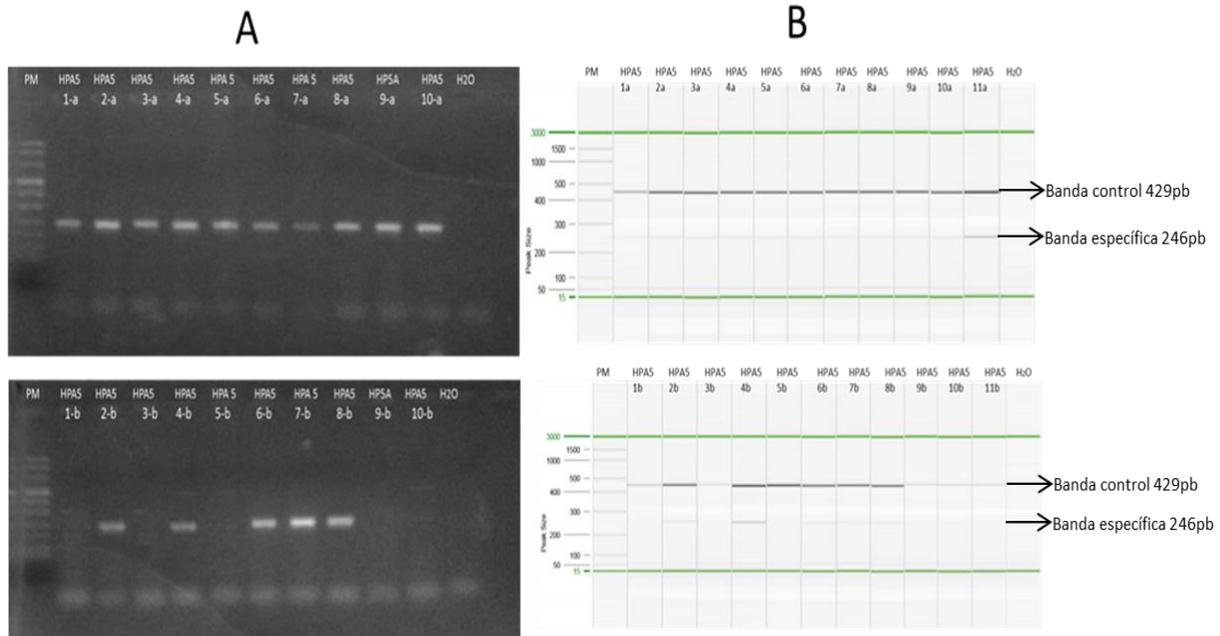
Para los antígenos HPA-1,-2, el 63 % de las muestras fueron homocigóticas para el fenotipo (a) mientras que se observó heterociguidad en todos los casos para el genotipo HPA-3 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Amplificación del genotipo HPA1,2,3 a/b en electroforesis en gel de agarosa al 2%. (A) y en electroforesis capilar (B)

Línea 1: patrón de peso molecular, línea 2-11 productos de amplificación del genotipo HPA1,2,3a/b, línea 12 H<sub>2</sub>O.

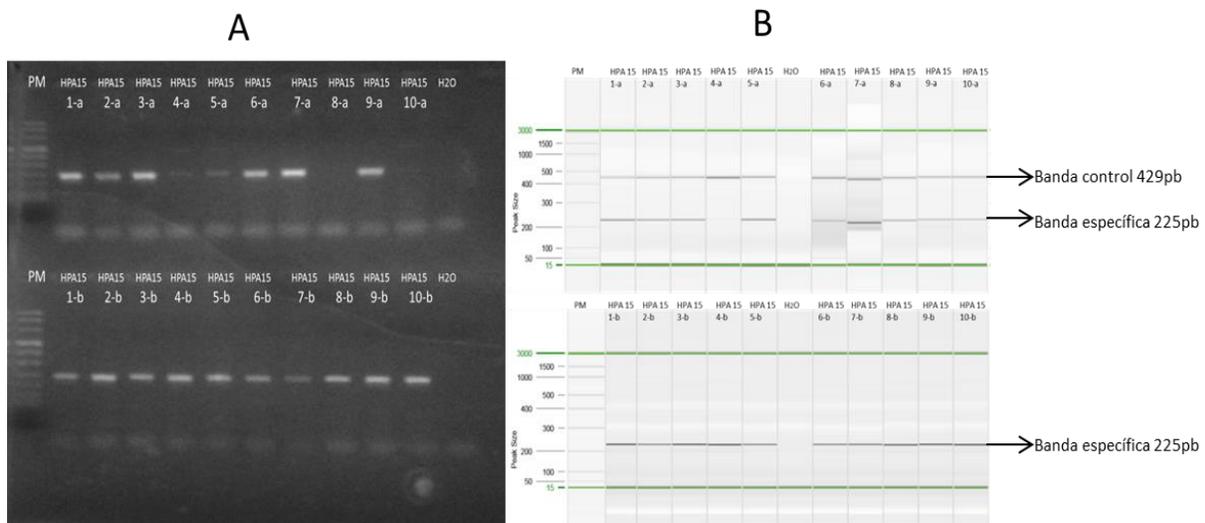
En el sistema HPA-5, el 54 % fueron homocigóticas para el fenotipo (a) y el 46 %, heterocigóticas (Fig. 2).



**Fig.2.** Amplificación del genotipo HPA5 a/b en electroforesis en gel de agarosa al 2% (A) y en electroforesis capilar (B)

Línea 1: patrón de peso molecular, línea 2-11 productos de Amplificación del genotipo HPA5 a/b, línea 12 H<sub>2</sub>O

Para el genotipo del HPA-15, el 4 % fue homocigótica para el fenotipo (b) mientras que el 96 % resultó ser heterocigótica (Fig. 3).



**Fig. 3.** Amplificación del genotipo HPA15 a/b en electroforesis en gel de agarosa al 2%(A) y electroforesis capilar (B)

Línea 1: patrón de peso molecular, línea 2-11 productos de amplificación del genotipo HPA15 a/b, línea 12 H<sub>2</sub>O.



## DISCUSIÓN

Las GP plaquetarias expresan múltiples estructuras polimórficas determinadas genéticamente, como los antígenos HPA que pueden inducir a sensibilización por embarazos y reacciones postransfusionales.<sup>(3-6,10)</sup>

Aunque la investigación se realizó con vistas a introducir y normalizar el protocolo de estudio del genotipaje HPA, tiene como limitación que sus resultados no son representativos de los pacientes estudiados, ni para inferir frecuencias poblacionales. No obstante, los resultados en este estudio para los fenotipos HPA1, 2,3 (a/b) son similares a los reportados en una muestra de población asiática, en la que observó mayor prevalencia del fenotipo HPA1a y HPA2a.<sup>(11)</sup> Estudios recientes han demostrado que diversos procesos de aloinmunización se encuentran fuertemente asociados a la presencia del fenotipo HPA 1b,<sup>(12-14)</sup> por lo que el mayor riesgo de aloinmunización y de desarrollar de RP lo pueden presentar aquellos pacientes homocigóticos para el genotipo a. Sin embargo, en estudios realizados en una población caucásica se detectó heterocigocidad para estos genotipos,<sup>(15)</sup> resultado similar al del presente estudio para el fenotipo HPA3 a/b. No obstante, el número de casos estudiados es demasiado pequeño y por tanto no es significativo de la población cubana.

En el caso del fenotipo HPA5 a/b los resultados fueron similares a lo reportado en la literatura,<sup>(16)</sup> por lo que se espera que estos pacientes presenten una mayor probabilidad de aloinmunización al enfrentarse a plaquetas que presenten el fenotipo b; mientras que para aquellos pacientes que resultaron heterocigotos el evento de aloinmunización no es posible, pues muchos autores han reportado que estos eventos están mayormente asociados al fenotipo a del sistema HPA 5.<sup>(17)</sup>

El genotipo HPA-15 mostró un predominio de heterocigocidad, similar a lo reportado por otros autores,<sup>(18,19)</sup> por lo que se espera un menor riesgo de aloinmunización para este sistema.

El análisis de los productos amplificados mediante electroforesis capilar permitió una mejor visualización, precisión, resolución y disminución en el tiempo de análisis con respecto a lo observado en electroforesis convencional.

Sin embargo, la frecuencia de estos fenotipos en la población cubana no se conoce, por lo que realizar una comparación entre estos resultados y lo planteado en la literatura resulta complejo. Por tanto, la normalización de la técnica permitirá realizar posteriores investigaciones para determinar la frecuencia de los genotipos HPA en la población cubana.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens. *Vox Sang*. 2014;106(2):93-102.
2. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*. 2011;51(3):558-69.
3. Sullivan MJ, Peterson J, McFarland JG, Bougie D, Aster RH, Curtis BR. A New Low Frequency Alloantigen (Khab) Located on Platelet Glycoprotein IIIa as a Cause of Maternal Sensitization Leading to Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Transfusion*. 2015;55(6Pt2):1584-5.
4. Yangsook K, Taniue H, Ishii N, Matsuyama E, Amakishi T, Hayashi R, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by an antibody specific for a newly identified allele of human platelet antigen-7. *Transfusion*. 2010;50(6):1276-84.
5. Peterson A, Pechauer S, Gitter M, Kanack A, Curtis BR, Reese J, et al. New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2012;52(5):1117-24.
6. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA-1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*. 2008;93(6):870-7.
7. Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid Typing for Human Platelet Antigen Systems -1, -2, -3 and -5 by PCR Amplification with Sequence-Specific Primers. *Vox Sanguinis*, 1996;71: 121-5.
8. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigen. *Blood*. 2002, 99(5):1692-8.

9. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*.2013;310(20):2191-4.
10. Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies and genotyping. *Blood Trans*.2015;13:380-90
11. Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, Liu Y, Hong X, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17wb and polymerase chain reaction sequence-based typing. *VoxSang*.2009; 97: 330-7.
12. Davey S, Navarrete C, Brown C. Simultaneous human platelet antigen genotyping and detection of novel single nucleotide polymorphisms by targeted next generation sequencing. *Transfusion*.2017; 57:1497-1504.
13. Orzińska A, Guz K, Mikula M, Kulecka M, Kluska A, Balabas A, et al. A preliminary evaluation of next-generation sequencing as a screening tool for targeted genotyping of erythrocyte and platelet antigens in blood donors. *Blood Transfusion*. 2018; 16(3):285-92. DOI:10.2450/2017.0253-16.
14. Brouk H, Ouelaa H. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Advances in Laboratory Diagnosis and Management. *Int J Blood Res Disord*. 2015;2:1.
15. Lane WJ, Westhoff MC, Gleadall NS, Aguad M, Smeland-Wagman R, Vege S, et al. Automated typing of red blood cell and platelet antigens: a whole-genome sequencing study. *Lancet Haematol*.2018; 5(6):e241-51.
16. Liew M, Margraf L, Mitchell S, 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;8(1):97-104.
17. Mette K, Tiller H, Heide G, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B, Husebekk A. Fetal exposure to maternal human platelet antigen-1a does not induce tolerance. An analytical observational study. *PlosOne*. 2017;24;12(8)e018295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182957>.
18. Londero D, Miani M, Rinaldi C, Totis V, Angelis VD. Extensive human platelet specific antigens typing of blood donors of different geographical origin to manage platelet transfusion in alloimmunized patients: Experience from a transfusion center in Northeastern Italy. *Int J Blood Transfus Immunoematol*. 2018;8: 4-11.

19. Merzoni J, FagundesI, Lunardi L W, Lindenau JR, Gil B C, JobimM, et al. Human platelet antigen genotyping of platelet donors in southern Brazil. Int J Immunogenetics. 2015; 42:329-35.

### **Conflicto de intereses**

No se declara ningún conflicto

### **Contribución de autoría**

Yisenia Romero Díaz: realizó contribuciones sustanciales a la concepción y diseño del trabajo, la obtención, análisis e interpretación de datos, la redacción y la corrección del manuscrito y aprobó la última versión presentada.

Gilberto Soler Noda: participó en la concepción y diseño del trabajo, el análisis e interpretación de datos, la redacción, corrección del manuscrito y probación la versión final presentada.

Antonio Bencomo Hernández: participó en la concepción y el diseño del trabajo, el análisis e interpretación de datos, la redacción y la corrección del manuscrito. Aprobó la versión final presentada.