

Frequência dos antígenos plaquetários humanos (HPA) em pacientes trombocitopênicos e predisposição à incompatibilidade transfusional

Juliana Vieira dos Santos Bianchi¹
 Maria Regina Andrade de Azevedo²
 Eduardo Jens¹
 Youko Nukui¹
 Dalton Alencar Ficher Chamone¹

¹Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil

²Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: Esse estudo tem o objetivo de avaliar a frequência dos HPAs em pacientes onco-hematológicos trombocitopênicos e analisar a probabilidade de incompatibilidade associada à transfusão de plaquetas.

Métodos: A genotipagem plaquetária foi realizada para os alelos HPA-1a, HPA-1b; HPA-2a, HPA-2b; HPA-3a, HPA-3b; HPA-4a, HPA-4b; HPA-5a, HPA-5b; HPA-15a, HPA-15b por PCR-SSP em 150 pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Resultados: As frequências alélicas encontradas foram: HPA-1a: 0,837; HPA-1b: 0,163; HPA-2a: 0,830; HPA-2b: 0,170; HPA-3a: 0,700; HPA-3b: 0,300; HPA-4a: 1; HPA-4b: 0; HPA-5a: 0,887; HPA-5b: 0,113; HPA-15a: 0,457; HPA-15b: 0,543.

Conclusão: A análise dos HPAs neste estudo demonstrou que os alelos A são mais frequentes na população do que os alelos B, com exceção do HPA-15, sugerindo que pacientes homocigotos para os alelos B apresentam maior predisposição à aloimunização e refratariedade às transfusões de plaquetas por causa imune. A genotipagem plaquetária pode ser de grande valia para o diagnóstico de trombocitopenia aloimune e para prover concentrados de plaquetas compatíveis a esses pacientes.

Descritores: Antígenos de plaquetas humanas; Transfusão de plaquetas; Plaquetas

Introdução

Os antígenos plaquetários humanos (HPAs) resultam do polimorfismo dos genes que codificam os aminoácidos das glicoproteínas da membrana plaquetária. Atualmente são definidos sorologicamente 24 antígenos plaquetários, cujo polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), caracterizado pela substituição de um aminoácido, está presente em 23 destes antígenos, exceto para o HPA14b. Observa-se que 12 HPAs são agrupados em seis sistemas bialélicos (HPA 1 a 5 e 15), em que a presença de aloanticorpos ocorre tanto para o alelo A (comum) quanto para o alelo B (raro). Para os demais antígenos, apenas anticorpos contra o alelo B (raro) foram detectados⁽¹⁻⁵⁾.

Os HPAs estão localizados em sua maioria nos receptores da membrana plaquetária, sendo os mais frequentemente envolvidos na aloimunização os HLA de classe I e os HPA-1, -2, -3, -4, -5 e -15, respectivamente presentes nas glicoproteínas GPIIIa, GPIIb, GPIIIa, GPIa e CD109. Segundo Ghevaert et al. (2009) 95% dos anticorpos antiplaquetários têm especificidade contra HPA-1a ou 5b e em 5% dos casos envolvem aloanticorpos contra o HPA-2, -3 e -15^(5,6).

A presença de anticorpos antiplaquetários, em decorrência da incompatibilidade entre doador e receptor de plaquetas ou entre mãe e feto durante a gestação, está associada à destruição plaquetária e consequente plaquetopenia, resultando em doenças hemorrágicas graves como a Púrpura Trombocitopênica Aloimune Neonatal (PTAN), Púrpura Pós-Transfusional (PPT) e refratariedade plaquetária, condição clínica em que o paciente não apresenta um incremento na contagem de plaquetas após a transfusão, podendo ocorrer por causas não imunes ou imunes⁽⁷⁻¹¹⁾.

A plaquetopenia constitui um achado relativamente comum e muitas vezes fatal em doenças onco-hematológicas. A transfusão profilática de concentrado de plaquetas ocorre geralmente com contagens inferiores a 10.000/μl e constitui a principal terapia utilizada para prevenção da hemorragia, justificando o estudo da frequência dos HPAs em pacientes onco-hematológicos trombocitopênicos no sentido de contribuir para análise da probabilidade de aloimunização diante da terapia transfusional^(12,13).

Materiais e Métodos

Foram selecionadas do banco de DNA do Laboratório de Imuno-hematologia 150 amostras de pacientes atendidos no Ambulatório Transfusional do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de 2004 a 2010. Utilizou-se como critério de inclusão

Conflito de interesse:

Os autores declaram não haver conflito de interesse

Submissão: 25/10/2011

Aceito: 20/2/2012

Autor correspondente:

Juliana Vieira dos Santos Bianchi
 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina,
 Universidade de São Paulo - USP
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 - Prédio
 dos Ambulatórios - 1º andar - bloco 7 - sala 141
 05403-900 São Paulo, SP, Brasil
 julianavds@hotmail.com

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20120050

para estas amostras pacientes portadores de doenças onco-hematológicas apresentando trombocitopenia com contagem inferior a 20.000 plaquetas/ μ l e indicação de transfusão de concentrado de plaquetas (CP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Santo Amaro (UNISA) com registro CEP UNISA nº 043/09.

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue total congeladas a -80°C , utilizando um *kit* de isolamento de DNA (Wisard SV genomic, Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A genotipagem plaquetária para os alelos HPA-1a, HPA-1b; HPA-2a, HPA-2b; HPA-3a, HPA-3b; HPA-4a, HPA-4b; HPA-5a, HPA-5b; HPA-15a, HPA-15b foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase *primer* sequência específica (PCR-SSP). Os polimorfismos analisados localizam-se nas regiões q21-q32 do cromossomo 17, que caracteriza os alelos HPA-1, -3 e -4, região pter-p12 do cromossomo 5, que caracteriza o alelo HPA-2, região q23-q31 do cromossomo 5, que caracteriza o alelo HPA-5 e região q13 do cromossomo 6, que caracteriza o alelo HPA-15. Os iniciadores (Operon Biotechnologies GmbH, Colônia, Alemanha) foram desenhados de forma a flanquear essas regiões, e a padronização técnica da PCR-SSP foi realizada de acordo com os princípios descritos por Castro et al, 1999, e Meyer et al, 1999^(10,14).

As reações de PCR para a amplificação dos HPA-1, -2, -4, -5, e -15 foram realizadas a um volume final de 20 μ l e para o HPA-3 o volume final de 30 μ l [150 ng do DNA genômico, mistura de dNTP 10 mM, MgCl₂ 50 mM, Tampão 10X, 5U de Taq polimerase (Platinum, Invitrogen, Brasil) e 10mM dos iniciadores senso e antisenso específicos para cada alelo]. A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Alemanha) e o segmento amplificado a uma temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 10 minutos para ativação da Taq, seguido de desnaturação por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 65°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas por contagem direta e o resultado obtido foi comparado ao de estudos preexistentes em indivíduos saudáveis da população brasileira^(15,16). Para a estimativa das probabilidades de incompatibilidade foi utilizado o Cálculo de Probabilidades Condicionais. Para a verificação de equivalência com outros estudos foi utilizado o teste para uma proporção. O IC (intervalo de confiança) utilizado nos cálculos estatísticos foi de 95% e para a análise inferencial foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), sendo que os testes tiveram conclusão sob hipótese bicaudal.

Resultados

População: Características Clínicas

Dos 150 pacientes trombocitopênicos onco-hematológicos incluídos no estudo, 65 pacientes (44%) eram do gênero masculino e 85 (56%) do gênero feminino. A idade variou de 13 a 80 anos, com média de 46 anos. De acordo com a patologia onco-hematológica observada, 28 apresentavam diagnóstico de Anemia Aplástica (18,7%), 64 apresentavam diagnóstico de Leucemias

Agudas, mieloides e linfoides (42,7%), 19 pacientes apresentaram diagnóstico de Leucemias Crônicas, mieloides e linfoides (12,7%) e 39 pacientes apresentaram diagnóstico de Linfoma, Hodgkin e não Hodgkin (26%).

Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas dos antígenos plaquetários humanos estão demonstradas na Tabela 1.

O resultado da frequência alélica A para os HPA-1, -2, -3, -4, -5 e -15, quando comparado aos resultados obtidos nos estudos de Medeiros (2009) para os HPAs 1, 2, 3, 4 e 5 e no estudo de Cardone (2004) para o HPA-15, não mostrou diferenças estatisticamente significativas, conforme apresentado na Tabela 2.

Probabilidade de incompatibilidade dos antígenos HPA

Para determinação da probabilidade de incompatibilidade transfusional na população, foi necessária a análise de cada grupo de genótipo (AA, AB e BB). Para os pacientes que possuem genótipo AB, ou seja, com presença de ambos os alelos, a probabilidade de incompatibilidade é mínima ou igual a 0 (zero). As probabilidades de incompatibilidade para os pacientes com genótipo homocigoto para A (IN_{AA}) e para os pacientes com genótipo homocigoto para B (IN_{BB}) foram observadas em função das probabilidades genotípicas dos doadores que, no caso, foram estimadas pelo estudo de Medeiros (2009) e Cardone (2004), sendo o último apenas para o antígeno HPA 15. Os resultados estão demonstrados na tabela 3.

Discussão

O estudo da frequência dos HPAs tem se tornado cada vez mais relevante devido ao aumento da demanda para transfusões de plaquetas. Pacientes em tratamento para doenças onco-hematológicas constituem um grupo vulnerável à refratariedade plaquetária. A aplasia medular e o dano endotelial causados pelo tratamento quimioterápico acarretam trombocitopenia intensa e persistente, levando à necessidade de repetidas transfusões de CPs. Neste estudo, a análise genotípica dos HPAs se dá em pacientes portadores de doenças onco-hematológicas plaquetopênicas com indicação de transfusão de CP.

Os resultados da frequência alélica e genotípica deste estudo foram comparados ao estudo de Medeiros (2009), que determinou a frequência alélica dos HPAs -1 a -13 utilizando a técnica de PCR-SSP em 150 indivíduos de uma população saudável composta por doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo e ao estudo de Cardone et al. (2004) que determinou a frequência do HPA-15 em 139 indivíduos, sendo 94 destes doadores de sangue. Os dados encontrados no grupo de plaquetopênicos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os estudos já realizados no Brasil, corroborando o fato de que o alelo A apresenta maior frequência nos HPA-1, -2, -3, -4 e -5 e o alelo B é mais frequente somente no HPA-15. Embora Castro et al. (1999), em um estudo na população brasileira, classificada em caucasóide, negra e indígena, demonstrou que os

Tabela 1 - Frequências genotípicas e alélicas

	GP	NT	AA	Frequência Genotípica						Frequência Alélica	
				AA		AB		BB		Alelo A	Alelo B
				n	%	n	%	n	%		
HPA-1	GPIIIa	176T>C	Leu59Pro	107	71,3	37	24,7	6	4,0	0,837	0,163
HPA-2	GPIIba	482C>T	Thr161Met	105	70,0	39	26,0	6	4,0	0,830	0,170
HPA-3	GPIIb	2621T>G	Ile874Ser	77	51,3	56	37,3	17	11,3	0,700	0,300
HPA-4	GPIIIa	506G>A	Arg169Gln	150	100,0	0	0,0	0	0,0	1	0
HPA-5	GPIa	1600G>A	Glu534Lys	119	79,3	28	18,7	3	2,0	0,887	0,113
HPA-15	CD109	2108C>A	Tyr703Ser	37	24,7	63	42,0	50	33,3	0,457	0,543

GP = Glicoproteína; NT = Nucleotídeo substituído; AA = Aminoácido substituído; n = Número absoluto de pacientes; % = Frequência genotípica em porcentagem

indígenas foram o único grupo com diferença genotípica significativa, neste estudo não foi possível a classificação dos pacientes de acordo com a etnia^(10,15,16).

A aloimunização e a refratariedade plaquetária constituem um problema clínico comum e relevante que depende de fatores como o tipo de produto plaquetário transfundido, número de transfusões recebidas e estado imunológico do paciente⁽¹⁷⁾. Segundo Ferreira (2011), aproximadamente em 20% dos casos a refratariedade plaquetária ocorre por causas imunológicas com o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos presentes na membrana plaquetária, como: ABO, HPA e HLA (antígenos leucocitários humanos). Apesar da relevância clínica, a pesquisa de anticorpos antiplaquetários ainda não é realizada rotineiramente devido à complexidade dos procedimentos⁽¹²⁾.

Anticorpos HPA ocorrem em uma frequência de 8% a 25%, podendo levar à refratariedade imune. A maioria dos pacientes aloimunizados e refratários possui anticorpos anti-HPA associados a anticorpos anti-HLA. Estudos recentes evidenciaram aloimunização em 8% dos pacientes onco-hematológicos que receberam transfusões de CP, sendo o anti-HPA-5b o mais frequente (50%), seguido pelo anti-HPA-1b e anti-HPA-5a, ambos com importância clínica associada à refratariedade plaquetária⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Por se tratar de um estudo utilizando amostras congeladas de DNA, não foi possível realizar a pesquisa de anticorpos antiplaquetários nestes pacientes; no entanto, com a análise da frequência genotípica foi possível verificar a probabilidade de incompatibilidade dos antígenos HPAs.

A análise da probabilidade de incompatibilidade para os diferentes HPAs mostrou que nos HPA-1, -2, -4 e -5 mais de 70% dos indivíduos são homocigotos para o alelo A; portanto, esses indivíduos apresentam uma probabilidade de aloimunização inferior a 30%; já os indivíduos homocigotos para o alelo B estão mais predispostos à aloimunização, pois a probabilidade de entrar em contato com antígenos incompatíveis nestes casos chega a 100%.

Em indivíduos heterocigotos a probabilidade de aloimunização é zero, já que os dois alelos estão presentes. A frequência e homogeneidade do HPA-4 na população tornam a probabilidade de incompatibilidade praticamente nula para este antígeno.

Com relação aos HPA-3 e -15, a análise deve ser criteriosa, uma vez que seus alelos aparecem de modo heterogêneo na população⁽²¹⁾. Neste caso, indivíduos homocigotos têm maior predisposição à aloimunização devido à maior probabilidade de incompatibilidade observada neste estudo, apesar do aspecto po-

Tabela 2 - Análise comparativa da frequência do alelo A

	Amostra	População de referência	P
HPA 1	0,837	0,883 Medeiros, 2009	0,080
HPA 2	0,830	0,850 Medeiros, 2009	0,493
HPA 3	0,700	0,673 Medeiros, 2009	0,481
HPA 4	1,000	0,990 Medeiros, 2009	0,218
HPA 5	0,887	0,910 Medeiros, 2009	0,325
HPA 15	0,457	0,515 Cardone et al., 2004	0,155

Tabela 3 - Probabilidade de incompatibilidade para AA e BB

	Doadores			IN _{AA} (P _{AB} + P _{BB})	IC 95%		IN _{BB} (P _{AB} + P _{BB})	IC 95%	
	P _{AA}	P _{AB}	P _{BB}		LI	LS		LI	LS
HPA-1	0,767	0,233	0,000	0,233 (23%)	0,196	0,271	1,000 (100%)	0,861	1,000
HPA-2	0,707	0,287	0,007	0,293 (29%)	0,246	0,340	0,993 (99%)	0,841	1,000
HPA-3	0,473	0,400	0,093	0,493 (49%)	0,412	0,575	0,873 (87%)	0,773	0,989
HPA-4	0,980	0,020	0,000	0,020 (2%)	0,017	0,023	1,000 (100%)	0,840	1,000
HPA-5	0,820	0,180	0,000	0,180 (18%)	0,151	0,209	1,000 (100%)	0,871	1,000
HPA-15	0,280	0,470	0,250	0,720 (72%)	0,605	0,835	0,750 (75%)	0,649	0,851

IC – Intervalo de 95% confiança; LI – Limite inferior; LS – Limite superior; PAB – Probabilidade do genótipo AB; PAA – Probabilidade do genótipo AA; PBB – Probabilidade do genótipo BB; INAA – Probabilidade de incompatibilidade em indivíduos homocigotos para A (AA); INBB – Probabilidade de incompatibilidade em indivíduos homocigotos para B (BB)

sitivo dos HPA-3 e HPA-15 apresentarem-se em alta frequência em heterozigose, 37,3% e 42% respectivamente.

O HPA-15 merece ainda atenção especial pois é responsável por 6,2% dos casos de aloimunização e apresenta limitações para detecção de anticorpos devido à variação da expressão do antígeno e instabilidade da molécula CD109⁽²²⁾.

Ainda que a refratariedade plaquetária não seja decorrente apenas de fatores imunológicos, existe grande probabilidade de exposição a antígenos plaquetários humanos incompatíveis nas transfusões de concentrados de plaquetas. Pacientes onco-hematológicos plaquetopênicos refratários ou aloimunizados poderiam beneficiar-se da genotipagem plaquetária em doadores de CPs como uma ferramenta adicional, compatibilizando a transfusão. A genotipagem plaquetária, associada ao uso de hemocomponentes desleucocitados e ABO compatíveis, poderia eliminar as possibilidades de resultar em refratariedade de causa imunológica.

Agradecimentos

À equipe do Ambulatório Transfusional do Serviço de Hematologia pela disponibilização dos dados utilizados.

Referências

- Kaplan C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: a 50-year story. *Immunohematology*. 2007;23(1):9-13.
- Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang*. 2002;83(1):1-12.
- Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003;85(3):240-5.
- 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.
- Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, Liu Y, Hong X, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sang*. 2009;97(4):330-7.
- Ghevaert C, Rankin A, Huiskes E, Porcelijn L, Javela K, Kekomaki R, et al. Alloantibodies against low-frequency human platelet antigens do not account for a significant proportion of cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: evidence from 1054 cases. *Transfusion*. 2009;49(10):2084-9.
- Bertrand G, Kaplan C. [Genotyping applied to platelet immunology: when? How? Limits]. *Transfus Clin Biol*. 2009;16(2):164-9. French.
- Bhatti FA, Uddin M, Ahmed A, Bugert P. Human platelet antigen polymorphisms (HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15) in major ethnic groups of Pakistan. *Transfus Med*. 2009;20(2):78-87.
- Bres JC, Merieux Y, Dugas V, Broutin J, Vnuk E, Jaber M, et al. New method for DNA microarrays development: applied to human platelet antigens polymorphisms. *Biomed Microdevices*. 2005;7(2):137-41.
- Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Goncalves MS, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet*. 1999;26(5):355-60.
- Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD. Technical manual. Bethesda, MD.:American Association of Blood Banks; 2008.
- Ferreira AA, Zulli R, Soares S, Castro V, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(1):35-40.
- Blumberg N, Heal JM, Phillips GL. Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks. *F1000 Med Rep*. 2010;2:5.
- Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B, Blasczyk R, Salama A. Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Transfusion*. 1999;39(11-12):1256-8.
- Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, Vieira-Filho JP, Bordin JO. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med*. 2004;14(6):433-7.
- Medeiros N. Frequência dos antígenos plaquetários humanos (HPA) 1 ao 13 em uma amostra de população saudável. [Internet] 2009 [cited 2012 Apr 12]. Available from: <https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=274&numeroEdicao=17>
- Bajpai M, Kaura B, Marwaha N, Kumari S, Sharma RR, Agnihotri SK. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. *Natl Med J India*. 2005;18(3):134-6.
- Fontao-Wendel R, Silva LC, Saviolo CB, Primavera B, Wendel S. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang*. 2007;93(3):241-9.
- Norton A, Allen DL, Murphy MF. Review: platelet alloantigens and antibodies and their clinical significance. *Immunohematology*. 2004;20(2):89-102.
- Rinder H, Tomer A. Platelet production, kinetics, and hemostasis. In: Simon TL, Snyder EL, Solheim BJ, Stowell CP, Strauss RG, Petrides M. Rossi's principles of transfusion. 4 ed. London: Oxford; 2009. p. 149-67.
- Socher I, Zwingel C, Santoso S, Kroll H. Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. 2008;48(3):463-72.
- Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. 2005;45(3):366-73.