

Caracterización de los antígenos específicos del neutrófilo NA1, NA2 y SH en la población argentina

De La Vega Elena, Carlos Daniel^{*,***,****}; Nogués, Nuria^{****};
Fernández Montoya, Antonio^{****}; Oyonarte, Salvador^{****};
Solís, Edita^{*}; Muñiz-Díaz, Eduardo^{****}

Resumen

Los antígenos específicos de neutrófilos NA1 (HNA-1a), NA2 (HNA-1b) y SH (HNA-1c) son formas alotípicas del FcγRIIIb y los blancos más frecuentes de los aloanticuerpos antigranulocitarios. El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas de los antígenos específicos de neutrófilos pertenecientes al sistema HNA-1 en donantes de sangre y amerindios de la etnia Toba de la ciudad de Rosario, Argentina. Se genotipificaron doscientos dieciocho individuos no relacionados para HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c mediante reacción en cadena de polimerasa con cebadores secuencia específica (PCR-SSP). Las frecuencias alélicas en los donantes de sangre para HNA-1a y HNA-1b fueron 0,44 y 0,56 respectivamente y en la población amerindia Toba fueron 0,77 y 0,23 respectivamente. El alelo HNA-1c presentó una frecuencia de 0,023 en los donantes de sangre, pero no se detectó en ninguno de los individuos amerindios estudiados. Los presentes datos mostraron que las frecuencias de los alelos que codifican al sistema HNA-1 en la población mayoritaria de Rosario y en la minoritaria amerindia Toba son similares a las descritas en europeos y otras poblaciones amerindias distantes, respectivamente.

Palabras Clave: Frecuencias alélicas - HNA - Población Argentina

Summary

The neutrophil-specific antigens NA1 (HNA-1a), NA2 (HNA-1b) and SH (HNA-1c) are allotypic forms of FcγRIIIb and the most frequent targets of neutrophil alloantibodies. The aim of this study was to determine the gene frequencies of the neutrophil-specific antigens belonging to the HNA-1 system in blood donors and Toba Amerindians from Rosario, Argentina. Two hundred and eighteen unrelated individual from Rosario were typed for HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c, using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). For the Argentinean blood donors, the HNA-1a and HNA-1b gene frequencies were 0.44 and 0.56 and for the Amerindians Toba were 0.77 and 0.23 respectively. The HNA-1c gene frequency in blood donors was 0.023 but the allele was absent within the Amerindian individuals.

The present data showed that the HNA-1 allele frequencies in the major population and the Toba Amerindians from Rosario are similar to those described in European and others distant Amerindians populations, respectively.

Key words: Alelic frecuencias - HNA - Argentine population

*Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi. Rosario, Argentina. daniel.delavega@yahoo.com

**Instituto Universitario Italiano de Rosario (I.U.N.I.R.). Rosario, Argentina.

***Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral (U.N.L.). Santa Fe, Argentina.

****Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.

*****Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada-Almería. Granada, España.

Introducción

Los aloantígenos de neutrófilos humanos (HNA) son polimorfismos en las glicoproteínas (GPs) de la membrana granulocitaria, capaces de generar una respuesta inmune en individuos susceptibles al ser expuestos durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante.

Los antígenos HNA-1a (NA1), HNA-1b (NA2) y HNA-1c (SH) se localizan en el receptor FcγRIIIb (CD16)¹⁻⁴ que se expresa únicamente en los neutrófilos. Estos antígenos son los blancos más frecuentes de los anticuerpos antigranulocitarios. La aloinmunización contra estos polimorfismos puede resultar en neutropenia aloinmune neonatal (NAN), lesión pulmonar aguda por transfusión (TRALI) y en reacciones febriles no hemolíticas, mientras que los autoanticuerpos contra el FcγRIIIb están asociados muy frecuentemente a la neutropenia autoinmune (NAI).

El FcγRIIIb¹⁻⁴ es una glicoproteína con 233 aminoácidos anclada a la membrana a través de un grupo fosfatidil-inositol (GPI). El FcγRIIIb y los antígenos que porta son codificados por el gen FCGR3B localizado en el cromosoma 1q23-24 en un *cluster* de dos familias de genes FcγR: FCGR2 y FCGR3. La familia FCGR3 está constituida por FCGR3A y FCGR3B. El gen FCGR3B es altamente homólogo al FCGR3A, que codifica al receptor FcγRIIIa. La diferencia más importante entre ambos genes es un cambio de una C por una T en el nucleótido 733 del FCGR3B que crea un codón stop en el FcγRIIIb. Como resultado, FcγRIIIa tiene 21 aminoácidos más que FcγRIIIb y esto hace que el FcγRIIIa codifique para una glicoproteína transmembranal en lugar de una anclada por GPI.

La variante FcγRIIIb_{HNA-1b} (que porta al antígeno HNA-1b) presenta dos sitios adicionales de glicosilación con respecto a la variante FcγRIIIb_{HNA-1a} (que porta al antígeno HNA-1a) en las posiciones 65 y 82.²

A nivel del ADN, el alelo FCGR3B_{HNA-1a} (FCGR3B*1) difiere del FCGR3B_{HNA-1b} (FCGR3B*2), en sólo cinco nucleótidos, en las posiciones 141, 147, 227, 277 y 349.¹⁻⁴ Cuatro de los cambios nucleotídicos resultan en cambios de aminoácidos entre los antígenos HNA-1a y HNA-1b. El quinto polimorfismo en la posición 147 es silencioso.

La secuencia nucleotídica del alelo FCGR3B_{HNA-1c} (FCGR3B*3) que codifica para la forma del FcγRIIIb que porta el antígeno HNA-1c es idéntica al del FCGR3B_{HNA-1b} excepto por la sustitución de una adenina por una citosina en la posición 266 (Figura 1). Esta sustitución de nucleótido resulta en un cambio de una alanina por una ácido aspártico en el residuo 78 del FcγRIIIb.⁵

La duplicación génica parece ser la causa de los tres genes FCGR3B encontrados en muchos individuos HNA-1c(+) en lugar de dos.⁶ Normalmente hay entre 100.000 y 200.000 copias del FcγRIIIb por neutrófilo⁴ pero los individuos con tres copias del gen FCGR3B expresan mayores cantidades del receptor en su superficie.

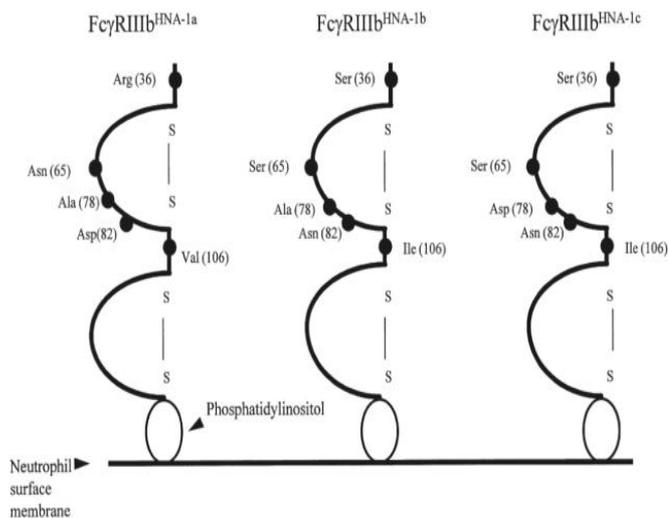


Figura 1. Representación esquemática de la sustitución de aminoácidos que resultan en las formas HNA-1a, -1b y -1c del FcγRIIIb. Reproducido con autorización del Dr. Paul Metcalfe.

La inmunotipificación de los antígenos granulocitarios (serología) ha sido reemplazada progresivamente por la genotipificación para aquellos antígenos HNA cuyas bases moleculares son conocidas. Ésta se realiza con ADN genómico obtenido de cualquier material celular, utilizando reactivos disponibles comercialmente.

Numerosas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han aplicado a la caracterización de los tres alelos del sistema HNA-1, aunque la variante cebador-secuencia-específica (PCR-SSP), empleada en el presente trabajo es, por su simpleza y bajo costo, la más utilizada en la práctica clínica y en estudios poblacionales.⁷

Las frecuencias de los tres alelos que codifican a los antígenos que conforman el sistema HNA-1, varían ampliamente en las poblaciones caracterizadas hasta la fecha (Tabla 1). Entre los caucásicos, la frecuencia del alelo FCGR3B_{HNA-1a} (FCGR3B*1) varía entre 0,30 y 0,37 y la frecuencia para el alelo FCGR3B_{HNA-1b} (FCGR3B*2) varía entre 0,63 a 0,70. Contrariamente, en poblaciones japonesas, chinas y amerindias, la frecuencia alélica de FCGR3B_{HNA-1a} es de 0,60 a 0,76 y para FCGR3B_{HNA-1b} de 0,30 a 0,20. La frecuencia alélica de FCGR3B_{HNA-1c} es de 0,02 a 0,03 en caucásicos, de 0,12 a 0,19 en poblaciones afroamericanas y mucho menor en amerindios.

Rosario, la ciudad de acogida de ambas poblaciones caracterizadas en el presente trabajo, está situada en el centro-este de Argentina y junto a otras localidades forma el área metropolitana del Gran Rosario, la tercera aglomeración del país. De manera similar al resto de la Argentina, una gran parte de sus 1.120.000 habitantes son descendientes de inmigrantes de origen italiano y español. Desde hace unos pocos años la ciudad ha sumado un importante flujo de migración proveniente del noreste del país (principalmente de la provincia de Chaco) entre quienes encontramos al gru-

Tabla 1. Frecuencias alélicas FCGR3B en varias poblaciones				
Población	n	FCGR3B*1	FCGR3B*2	FCGR3B*3
Italianos	200	0.282	0.692	SD
Españoles	345	0.290	0.710	0.011
Tunecinos	98	0.311	0.668	SD
Berebere	101	0.342	0.658	SD
Daneses	200	0.365	0.635	0.030
Caucásicos USA	90	0.367	0.633	0.022
Alemanes	260	0.373	0.627	0.025
Ugandeses	43	0.395	0.558	0.174
Argentinos (Rosario)	192	0.443	0.557	0.023
Amerindios USA	171	0.551	0.449	0,005
Chinos	413	0.565	0.430	0.000
Brasileña	85	0.58	0.42	0.053
Japoneses	400	0.622	0.378	0.000
Amerindios Tobas (Rosario)	26	0.769	0.231	0.000
Amerindios (Xikrin- Kayapo Indians)	92	0.670	0.210	0,000
Kayapo	16	0.75	0.25	0.00
Wayampi	11	0.83	0.18	0.00
Arara	4	0.88	0.12	0.00
Wayana-Apalai	10	0.90	0.10	0.00
Yanomama	9	0.94	0.06	0.00
Awá-Guajá	10	0.95	0.05	0.00
*Este trabajo. n=individuos caracterizados. SD: Sin describir				

po amerindio originario Toba. A pesar de lo reducido de este grupo, su alta endogamia, justifica su caracterización como una medida de la heterogeneidad genética de los habitantes de la ciudad de Rosario.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron estimar, en la población mayoritaria y en el grupo minoritario aborigen Toba de la ciudad de Rosario, Argentina, las frecuencias de los aloantígenos específicos de granulocitos NA1, NA2 y SH (sistema HNA-1) y compararlas entre sí y con otras poblaciones estudiadas.

Materiales y métodos

Se reclutaron 192 individuos pertenecientes a la población mayoritaria (149 donantes de sangre y 43 profesionales y administrativos del Hospital Italiano Garibaldi) y 26 individuos pertenecientes a la etnia Toba. Todos los individuos refirieron no estar relacionados entre sí, vivir en la ciudad de Rosario y gozar de buena salud al momento del estudio. Todos los individuos del grupo amerindio Toba habían nacido en la Provincia de Chaco, habitaban al momento del estudio los barrios "Los Pumitas" y "la Travesía" de la ciudad de Rosario y referían tener a sus cuatro abuelos Tobas y hablar la lengua Toba.

En concordancia con los datos censales⁸, la población general de rosario refirió ancestros provenientes de Italia y España y sólo 2 de los 192 individuos (1%) incluidos en el estudio refirieron tener un pariente cosanguíneo aborigen.

En todos los casos, la muestra de sangre entera anticoagulada con EDTA fue obtenida luego de la entrevista explicativa de los estudios a realizar y la obtención del consentimiento informado. Para preservar el anonimato de los individuos estudiados las muestras fueron codificadas.

Para la amplificación de los alelos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c se utilizó la técnica de PCR-SSP descrita por Bux et al^{5,9} con ligeras modificaciones.

Por las particularidades descritas en el sistema HNA-1, las frecuencias alélicas fueron calculadas usando la fórmula de Steffensen *et al.*¹⁰

La significación estadística del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg y las diferencias en la distribución de las frecuencias genotípicas del sistema HNA-1 entre las distintas poblaciones se calculó con el test χ^2 (Chi-cuadrado) de Pearson. Se realizó el análisis del componente principal para las frecuencias de los tres alelos del sistema HNA y se graficaron los dos primeros componentes, para obtener una imagen en dos dimensiones (similar a los dendrogramas) de un espacio pluridimensional. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete STATA versión 9,1 (*College Station, Texas, EUA.*).

Resultados

El sistema HNA-1 en ambas poblaciones estudiadas tuvo un buen ajuste a la ley de Hardy-Weinberg (Tabla 2).

En la población mayoritaria de Rosario, la frecuencia del alelo HNA-1a es menor que la del alelo HNA-1b. El caso opuesto se observa en el grupo amerindio Toba (Tabla 3). Las diferencias entre ambas poblaciones fueron estadísticamente significativas (Tabla 2).

La frecuencia de los alelos HNA-1a y HNA-1b en la población mayoritaria (0,44 y 0,56 respectivamente) fueron diferentes ($p < 0,001$) de las observadas en poblaciones italianas (0,282 y 0,692) y españolas (0,290 y 0,710)^{11,12}, pero similares a las descritas en otras poblaciones caucásicas como las danesas (0,365 y 0,635), norteamérica (0,367 y 0,633) y alemana (0,373 y 0,627)^{10,13,14}.

En el grupo amerindio Toba, las frecuencias de los alelos HNA-1a y HNA-1b (0,77 y 0,23 respectivamente) fueron similares a las reportadas en Japoneses (0,622 y 0,378) y otras poblaciones amerindias emplazadas en áreas geográficamente alejadas.¹⁵⁻¹⁷

El alelo HNA-1c estuvo presente en el 4,7% de los individuos de la población mayoritaria pero en ninguno de los individuos amerindios estudiados, en concordancia con estudios publicados anteriormente.

El análisis del componente principal (Figura 2) muestra a través de las distancias, muy fidedignamente la

variabilidad HNA-1 entre las poblaciones descritas en la Tabla 1 (99,7% cuando se grafican los primeros dos componentes). En este gráfico se repite la observación previa: La cercanía de la población mayoritaria de la ciudad de Rosario al "cluster" o "bloque de ascendencia europeo" constituido por las poblaciones alemana, danesa, norteamericana y algo alejada de las poblaciones italiana y española.

Conclusiones

Las frecuencias de los antígenos HNA-1a, -1b y -1c estimadas para la población mayoritaria de la ciudad de Rosario son similares a las descritas en poblaciones europeas. Notablemente con respecto a las poblaciones que más aportaron con su inmigración como la italiana y española, la frecuencia del alelo HNA-1a es algo mayor, probablemente por influencia de grupos amerindios y africanos.¹⁸

Las frecuencias estimadas para los aborígenes Tobas son homologables a las encontradas en grupos amerindios del Amazonas y en menor grado, en poblaciones orientales.

Como era de esperar, existen diferencias significativas en la distribución de los aloantígenos de neutrófilos HNA-1a, -1b y -1c entre ambos grupos. Esta situación establece diferencias en la probabilidad de incompatibilidad a priori para los antígenos HNA-1 asociada a la transfusión y al embarazo entre ambas poblaciones. Desde el punto de vista de la seguridad transfusional y obstétrica, se debe hacer hincapié en la detección y caracterización de la aloinmunización independientemente del grupo étnico del paciente.

Los pocos casos diagnosticados de neutropenia aloinmune neonatal, sugieren que se halla subdiagnosticada en nuestro medio, al igual que el resto de los cuadros asociados a la aloinmunización HNA.

El estudio de estos polimorfismos en nuestra población es el primer paso para establecer un panel de donantes caracterizados para los antígenos HNA-1a (NA1), HNA-1b (NA2) y HNA-1c (SH), que permitirá el correcto diagnóstico serológico en gestantes y pacientes y de ser necesario, proveer neutrófilos compatibles a los pacientes sensibilizados.

Agradecimientos

Los autores agradecemos a la Antropóloga Claudia Cisneros. Esta investigación fue financiada parcialmente por la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS). Parte del contenido del presente trabajo fue publicado en *Tissue Antigens*. 71(5):475-7 y presentado en el Panel S6 del XVII Congreso Regional de la ISBT en Madrid.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas HNA-1 en la población mayoritaria y la población Amerindia Toba de Rosario							
Genotipo HNA-1	Población mayoritaria (n=192)*			Amerindios Toba (n=26)†			Test de Homogeneidad
	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Análisis H-W	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Análisis H-W	p
1a/1a	0.203	0.198	$\chi^2=0.161$ p=0.689	0.577	0.615	$\chi^2=0.181$ p=0.671	$\chi^2=19.6$ p<0.001
1a/1b	0.479	0.490		0.385	0.346		
1b/1b	0.318	0.312		0.038	0.038		

*Se genotificaron 192 individuos de la población mayoritaria y 26 de la población amerindia Toba

Tabla 3. Frecuencias fenotípicas y alélicas HNA-1 en las poblaciones mayoritaria de Rosario y la Amerindia Toba					
Alelo	Sinónimo	Frecuencia Fenotípica %		Frecuencia Alélica [CI 95%]	
		Población mayoritaria	Amerindios Toba	Población mayoritaria n=384*	Amerindios Toba n=52†
HNA-1a	NA1	68.2	96.2	0.443 ± [0.393-0.492]	0.769 ± [0.655-0.884]
HNA-1b	NA2	76.0	42.3	0.557 ± [0.508-0.607]	0.231 ± [0.116-0.345]
HNA-1c	SH	4.7	0.0	0.023 ± [0.008-0.038]	0.000 ± [0.000-0.056]

*Los cromosomas analizados fueron 384 en individuos de la población mayoritaria y 52 en amerindios Toba.

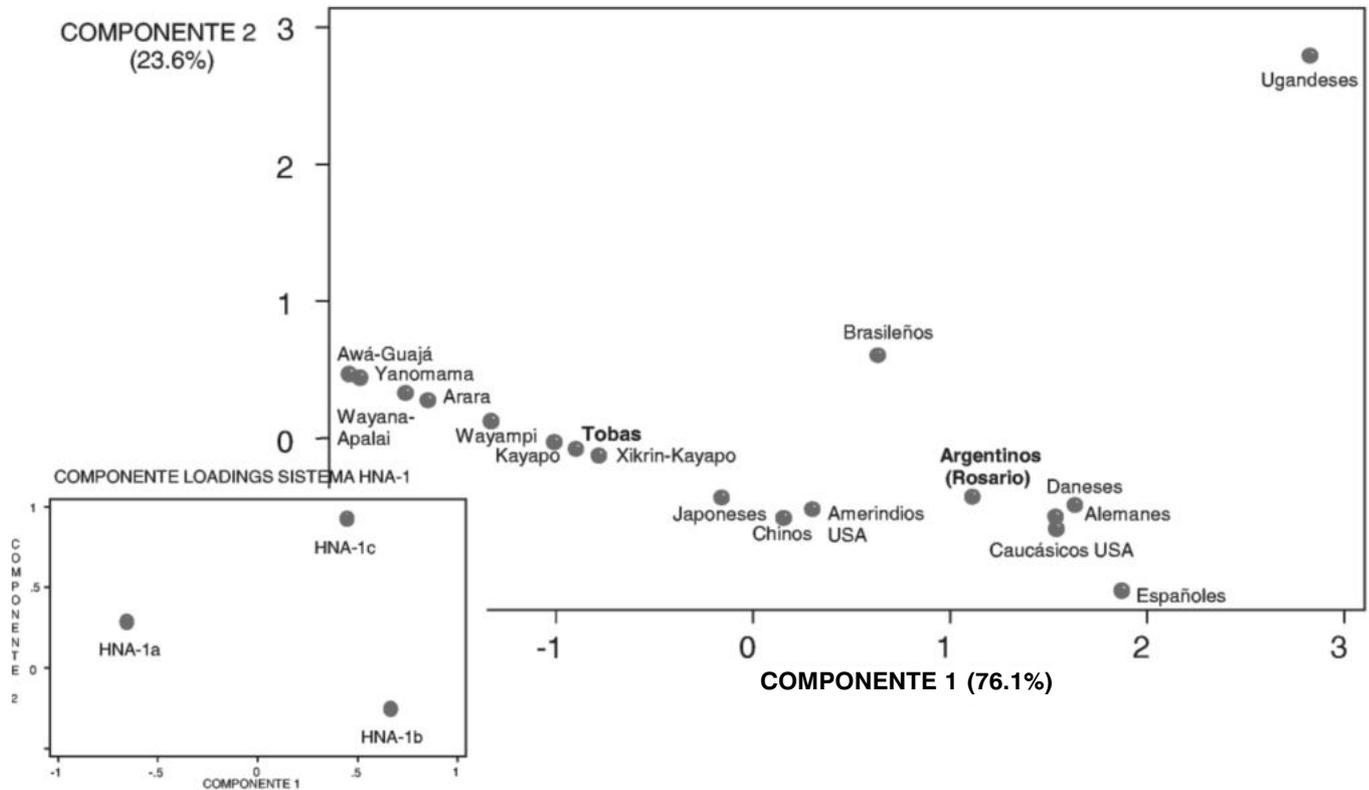


Figura 2. Frecuencias génicas HNA-1 en distintas poblaciones. Análisis del componente principal.

Referencias

1. Trounstine ML, Peltz GA, Yssel H, et al. Reactivity of cloned, expressed human Fc gamma RIII isoforms with monoclonal antibodies which distinguish cell-type-specific and allelic forms of Fc gamma RIII. *Int Immunol* 1990; 2: 303-10.
2. Ory PA, Clark MR, Kwok EE, et al. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1688-91.
3. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989; 170: 481-97.
4. Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, et al. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood* 1990; 75: 213-7.
5. Bux J, Stein EL, Bierling P, et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood* 1997; 89: 1027-34.
6. Koene HR, Kleijer M, Roos D, et al. Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood* 1998; 91: 673-9.
7. Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, et al. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens* 2000; 56: 143-8.
8. Hernández I. "Los indios y la antropología en la Argentina". Los indios y la antropología en América Latina. Buenos Aires: Yuchán, 1984.
9. Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1995; 35: 54-7.
10. Steffensen R, Gulen T, Varming K, Jersild C. FcgammaRIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. *Transfusion* 1999; 39: 593-8.
11. Bontadini A, Tazzari PL, Manfroi S, et al. Human-platelet-antigen and neutrophil-antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica* 2000; 85: 430-1.
12. Torio A, Marin L, Muro M, et al. Determination of NA gene frequencies in the Spanish population by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 393-4.
13. Hessner MJ, Curtis BR, Edean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1996; 36: 895-9.
14. Flesch BK, Doose S, Siebert R, et al. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transfusion* 2002; 42: 469-75.
15. Fujiwara K, Watanabe Y, Mitsunaga S, et al. Determination of granulocyte-specific antigens on neutrophil FcA receptor IIIb by PCR-preferential homoduplex formation assay, and gene frequencies in the Japanese population. *Vox Sang* 1999; 77: 218-22.
16. Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK, et al. Allelic polymorphisms of human fcgamma receptor IIa and Fcgamma receptor IIIb among distinct groups in Brazil. *Transfusion* 2000; 40: 1388-92.
17. Covas DT, Kashima S, Guerreiro JF, et al. Variation in the FcgammaR3B gene among distinct Brazilian populations. *Tissue Antigens* 2005; 65: 178-82.
18. Avena SA, Goicoechea AS, Rey J, et al. [Gene mixture in a population sample from Buenos Aires City]. *Medicina (B Aires)* 2006; 66: 113-8.