

Regiones antigénicas de variantes D débil

Trueba Gómez Rocío,* Estrada Juárez Higinio*

Los antígenos proteicos pueden ser de dos tipos: lineales (continuos) que se componen de una secuencia de seis a 10 aminoácidos (AA) en la estructura primaria, y conformacionales, compuestos de 10 a 20 AA que están muy cerca en la estructura 3D, pero no en la secuencia lineal;¹ estos representan el 90% de los epítomos conocidos.²

Debido a que los anticuerpos comerciales anti-D están diseñados para tener patrones intensos de aglutinación con D normales, un fenotipo serológico D débil se define como la reactividad débil ($\leq 2+$) en la prueba inicial; pero aglutina moderada o fuertemente con la globulina antihumana. Por otra parte, los D parciales tendrán patrones de aglutinación que van de intenso a negativo dependiendo del reactivo utilizado.

Los cambios en la secuencia del gen RHD producen variaciones en la estructura de la proteína que resultan en variantes antigénicas, la ISBT reporta más de 370 variantes entre D parcial, D débil y Del, además de 88 variantes D negativo.³ Tradicionalmente se han dividido en cuantitativas, con menos sitios antigénicos y sin variaciones estructurales (débiles y Del) y cualitativas si la cantidad de sitios antigénicos es normal, pero tienen diferencias estructurales de la proteína (D parciales).^{4,5}

El análisis teórico de las interacciones entre la estructura de la proteína D y los anticuerpos anti-D

se realizó por primera vez en 1989.⁶ Lomas y colaboradores clasificaron nueve patrones de reacción y siete epítomos del antígeno D. En 1994, el grupo de trabajo sobre reactivos de grupos sanguíneos de ICSH/ISBT describieron 30 patrones de reacción anti-D con fenotipos D parciales. Concluyeron que el antígeno Rh D completo consta de un mosaico de 30 o más epítomos asignados de manera arbitraria sobre los loops exofaciales.^{7,8}

Existen tres modelos que describen la estructura secundaria de RhD. El modelo más aceptado es el propuesto por Wagner.⁹ En medicina transfusional se considera que sólo los cambios aminoácidos sobre los loops exofaciales tienen efecto en la estructura terciaria y, por tanto, sólo éstos alteran el reconocimiento de anticuerpos.

La estructura de una proteína se debe a los enlaces covalentes de la secuencia de AA y a los innumerables pliegues que son resultado de los contactos no covalentes dentro y entre las cadenas.¹⁰ La estructura secundaria estable y la estructura terciaria de cada proteína están dadas por las interacciones de los AA, la fuerza hidrofóbica, así como la interacción con el medio circundante.¹¹ El resultado de la sustitución de AA puede tener distinto impacto en las propiedades fisicoquímicas y consecuentemente sobre la funcionalidad de la proteína.¹²

* Coordinación de Hematología Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinoza de los Reyes».



La biología computacional analiza la construcción teórica de las estructuras proteicas terciarias y permite reconocer las diferencias «topológicas» entre las variantes RhD. En múltiples ocasiones nos hemos cuestionado si existen diferencias estructurales o de expresión genética entre RhD normal y los D débiles, porque en el modelo de Wagner¹³ la sustitución de AA de estas variantes está en la región transmembrana, lo que disminuye la densidad antigénica, sin alterar la estructura.

Sin embargo, sabemos que cualquier cambio en la secuencia aminoacídica provocará cambios en las características fisicoquímicas que dará como resultado una estructura distinta. Además, no hemos encontrado alteración en la región promotora que ocasione disminución en la expresión de la proteína.

En nuestro grupo, hemos utilizado biología computacional para analizar los marcos de lectura y secuencia genética, y analizar las estructuras de RhD y RhCcEe. No encontramos alteraciones en los marcos de lectura que causen modificaciones en la expresión genética. Sin embargo, en el análisis estructural de las proteínas encontramos diferencias fisicoquímicas que las modifican, ocasionadas

por cambios de AA que no están necesariamente en regiones exofaciales.¹⁴

En un trabajo posterior determinamos las diferencias antigénicas teóricas entre variantes RhD débil y RhD normal.¹⁵ Para elegir las variantes nos basamos en los reportes de la literatura. Incluimos RHD*01W.1, W2 y W3 que son comunes, pero no están asociadas a la formación de anti-D. Las variantes RHD*09.03.01 (W4.0) y RHD*09.04 (W4.1) tienen reportes de probable aloanticuerpos anti-D. La ISBT marca con reporte de aloanticuerpos anti-D a RHD*11, RHD*15 y RHD*21. Analizamos la hidrofobicidad y la similitud de las estructuras secundarias. Construimos las estructuras terciarias teóricas, calculamos el potencial electrostático, la distribución de las proteínas en la bicapa lipídica (espesor hidrofóbico, pasos transmembrana y asas exofaciales), las interacciones intraproteína y la predicción de probables regiones antigénicas.

La secuencia aminoacídica de RhD y las ocho variantes son similares entre 99.76 a 92.067%. El patrón de hidrofobicidad es similar en todas las proteínas, con cambios en las regiones de sustitución de los aminoácidos. La conformación de estructuras secundarias muestra similitud de entre

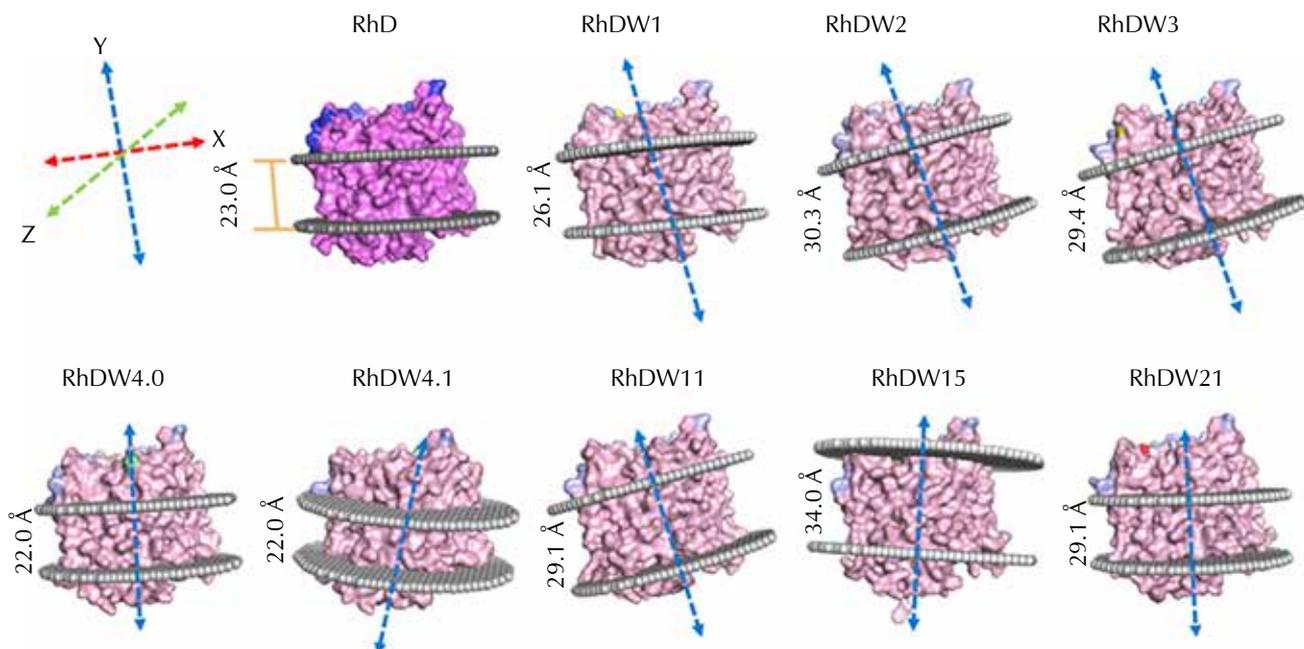


Figura 1: Vista lateral en un plano XYZ de la proteína RhD y sus variantes débiles. La flecha azul punteada indica la inclinación en la membrana con relación a RhD. A un costado de cada una se indica el espesor hidrofóbico (Å).

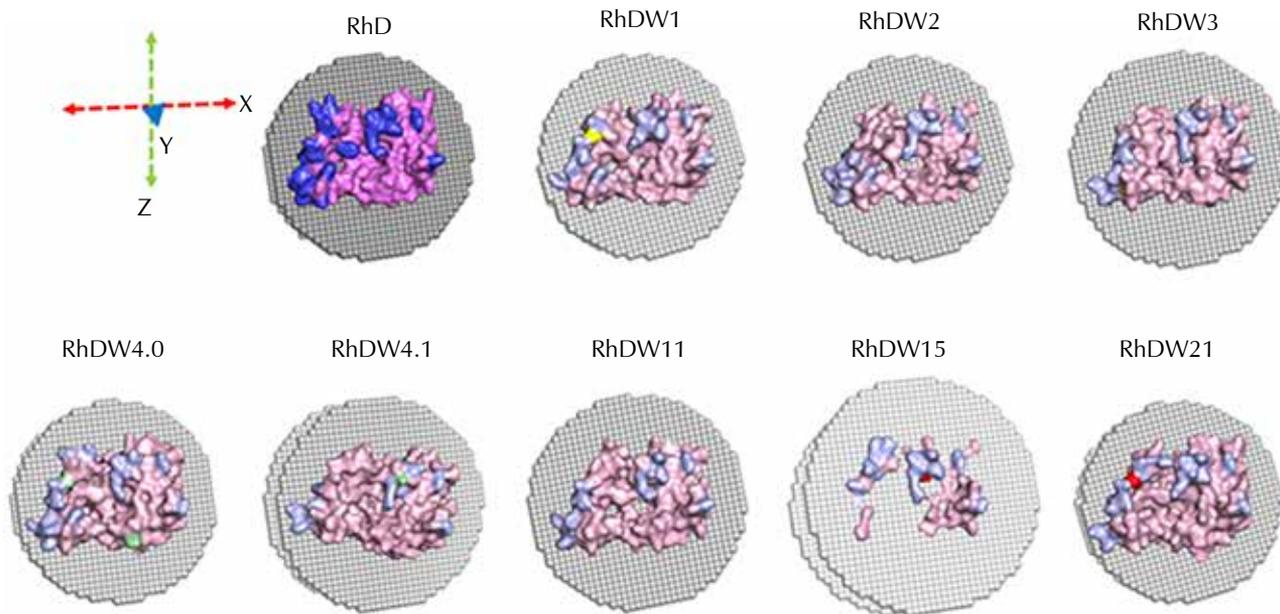


Figura 2: Vista superior en un plano XYZ de la proteína RhD y sus variantes débiles. Se indican en azul oscuro las regiones antigénicas de RhD y en azul claro las regiones conservadas de RhD pero modificadas en las variantes. Los antígenos particulares de las variantes se indican en: amarillo las que no producen anti-D, verde con probable formación de anti-D y rojo los de las variantes que producen anti-D. Los probables epítomos disminuyen conforme disminuyen los aminoácidos exofaciales.

94.712 a 97.596%, las estructuras terciarias muestran una similitud de entre 89.784 a 97.236%.

Encontramos diferencias en las regiones citoplásmica, transmembrana y exofacial, la ubicación de los extremos terminales, espesor hidrofóbico y la inclinación de la membrana son distintos en relación con RhD normal (Figura 1).

Identificamos los posibles sitios antigénicos sobre las estructuras 3D, considerando tres criterios: los valores de probabilidad antigénica, las diferencias estructurales y asociamos con las interacciones intraproteína (Figura 2).

Concluimos que las variantes RhD débil tienen cambios estructurales que podrían modificar las regiones antigénicas, la aglutinación débil podría deberse a que tienen menos sitios similares a RhD y no porque tengan una menor concentración de proteínas en la membrana.

Consideramos que los escasos reportes de aloinmunización podrían deberse a la baja frecuencia de sujetos RhD débiles que son transfundidos, además, de que no hay seguimiento en aquellos que lo han sido, más allá de la capacidad intrínseca de aloinmunización de estas variantes.

Referencias

1. Tahir S, Bourquard T, Musnier A, Jullian Y, Corde Y, Omahdi Z et al. Accurate determination of epitope for antibodies with unknown 3D structures. *MABs*. 2021; 13 (1): 1961349.
2. Hu YJ, Lin SC, Lin YL, Lin KH, You SN. A meta-learning approach for B-cell conformational epitope prediction. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15 (1): 378.
3. ISBT. RHD blood group alleles. 2022 [Cited 2022, 31 March] Available in: <https://www.isbtweb.org/resource/004rhd.html>
4. Kulkarni S, Mohanty D, Gupte S, Vasantha K, Joshi S. Flow cytometric quantification of antigen D sites on red blood cells of partial D and weak D variants in India. *Transfus Med*. 2006; 16 (4): 285-289.
5. Faas BHW, Beckers EAM, Maaskant-van-Wijk PA, Overbeeke MAM, Van Rhenen DJ. Molecular characterization of quantitative Rh variants. *Biotest Bulletin*. 1997; 5: 439-449.
6. Lomas C, Tippett P, Thompson KM, Melamed MD, Hughes-Jones NC. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*. 1989; 57 (4): 261-264.
7. Scott M. Rh serology—coordinator's report. *Transfus Clin Biol*. 1996; 3 (6): 333-337.
8. Scott ML, Voak D, Jones JW, Avent ND, Liu W, Hughes-Jones N et al. A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol*. 1996; 3 (6): 391-396.
9. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004; 20 (1): 23-36.
10. George KL, Horne WS. Foldamer tertiary structure through sequence-guided protein backbone alteration. *Acc Chem Res*. 2018; 51 (5): 1220-1228.
11. Gromiha MM, Selvaraj S. Inter-residue interactions in protein folding and stability. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004; 86 (2): 235-277.

12. Meireles MR, Stelmach LH, Bandinelli E, Vieira GF. Unveiling the influence of factor VIII physicochemical properties on hemophilia A phenotype through an in silico methodology. *Comput Methods Programs Biomed.* 2022; 219: 106768.
13. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999; 93 (1): 385-393.
14. Trueba-Gómez R, Rosenfeld-Mann F, Baptista-González HA, Domínguez-López ML, Estrada-Juárez H. Use of computational biology to compare the theoretical tertiary structures of the most common forms of RhCE and RhD. *Vox Sang.* 2023; 118 (10): 881-890.
15. Trueba-Gómez R, Rosenfeld-Mann F, Estrada-Juárez H. Prediction of the antigenic regions in eight RhD variants identified by