



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.  
SECRETARIA DE SALUD  
SERVICIO DE HEMATOLOGIA**

**“DETECCION DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS  
PLAQUETARIOS HUMANOS HPA EN POBLACION MEXICANA”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA**

**PRESENTA**

**DRA. LUCIA ADRIANA REYNOLDS OCAMPO**

**ASESOR DE TESIS:**

**DR. CARLOS MARTINEZ MURILLO**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **Consejo evaluador de Tesis**

---

**Dr. Mario Gutierrez Romero  
PRESIDENTE**

---

**Dr. Juan Collazo Jaloma  
SECRETARIO**

---

**Dr. Carlos Martínez Murillo  
ASESOR**

---

**Dra. Etta Rozen Fuller  
VOCAL**

---

**Dra. Juan Julio Kassack Ipiña  
VOCAL**



## INDICE

<b>I. Antecedentes</b>	3
I.1 Generalidades	3
I.2 Antígenos Plaquetarios	6
I.3 Antígenos Plaquetarios no específicos	7
I.4 Antígenos Plaquetarios específicos	8
I.5 Nomenclatura HPA	10
I.6 Bases Moleculares	10
I.7 Tipificación de Antígenos Plaquetarios Humanos	14
I.8 Aloinmunización HPA	14
I.9 Implicaciones clínicas de los polimorfismos de HPA	16
<b>2. Justificación</b>	18
<b>3. Objetivos</b>	19
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Específicos	20
<b>4. Pacientes y Métodos</b>	19
4.1 Diseño del Estudio	20
4.2 Muestra	20
4.3 Criterios de Selección	20
4.4 Descripción de Variables	20
4.5 Descripción General del Estudio	20
<b>5. Aspectos Éticos</b>	22
<b>6. Análisis Estadístico</b>	22
<b>7. Resultados</b>	23
<b>8. Discusión</b>	27
<b>9. Referencias Bibliográficas</b>	31

## I ANTECEDENTES

### I.1 Generalidades

La hemostasia es un sistema biológico de defensa donde intervienen múltiples elementos, tanto celulares o plasmáticos para obturar lesiones y mantener la sangre líquida dentro de los vasos. Este sistema interacciona con otros sistemas biológicos del organismo que funcionan de manera integrada a nivel de la microvasculatura, en la inflamación con generación de cininas, activación del complemento y en la respuesta inmune.

El sistema de la hemostasia a su vez se divide en dos sistemas biológicos que funcionan dinámicamente en paralelo para lograr la obturación de las lesiones; la hemostasia primaria donde se lleva a cabo la interacción de las plaquetas con el vaso sanguíneo y la hemostasia secundaria donde fundamentalmente participan los factores de la coagulación y elementos celulares.

**Hemostasia Primaria.** La hemostasia primaria constituye un sistema fisiológico que detiene la salida de sangre, al sellar provisionalmente el sitio del daño vascular esto a través de la interacción entre las plaquetas y el vaso sanguíneo. En condiciones fisiológicas la hemostasia primaria funciona equilibradamente entre elementos celulares y proteicos, manteniendo la sangre fluida dentro de los vasos. Esto se lleva a cabo gracias a las funciones que desempeña la célula endotelial, la cual se encuentra ubicada en un sitio estratégico, y las plaquetas, pequeñas células discoides, anucleadas, procedentes de la fragmentación del megacariocito, están capacitadas para reaccionar ante una lesión del vaso sanguíneo y formar rápidamente un tapón plaquetario, mediante los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, deteniendo así la hemorragia. El proceso de interacción entre la colágena expuesta y la adhesión plaquetaria es aproximadamente de dos a cuatro segundos.

En los procesos de la hemostasia primaria la interacción entre plaquetas y células endoteliales es fundamental para el adecuado y equilibrado funcionamiento de la hemostasia. Normalmente las plaquetas no se adhieren al vaso sanguíneo; esto sólo ocurre cuando existe lesión en el vaso sanguíneo y se expone la colágena del subendotelio, permitiendo así la activación de las plaquetas.

**Plaquetas.** Las plaquetas son pequeñas células anucleadas de la sangre periférica, las cuales circulan en forma de disco y miden en promedio de 2 a 4 micras de diámetro y 0.6 a 1.3 micras de grosor y su función consiste en taponar rápidamente cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular, mediante la formación de agregados plaquetarios capaces de obturar estas lesiones. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie. Su concentración normal en la sangre es de 150 a 450 x 10<sup>9</sup>/L. Junto a los eritrocitos y leucocitos constituyen los elementos formes de la sangre. Poseen algunos elementos comunes a otras células y otros que las distinguen y caracterizan. **Tabla 1.**

### Características de las plaquetas.

- Células anucleadas.
- Tienen forma discoide.
- Miden 2 a 4 micras de diámetro y 0.6 a 1.3 de grosor.
- Vida media de 9 días.
- Tienen grupo sanguíneo ABO, P, Lewis.
- Tienen HLA-1
- Contienen su propio sistema de antígenos plaquetarios (HPA)
- Funcionan obturando lesiones endoteliales.

**Tabla 1.** En esta tabla de muestran las características generales de las plaquetas.  
HPA- Human Platelet Antigen, HLA- Human Leucocyte Antigen.

Se originan en la médula ósea a partir de fragmentos de citoplasma del megacariocito, por lo que son anucleadas y con una vida media entre 9 y 12 días, periodo en el que atraviesan miles de vasos sanguíneos, contribuyendo a mantener la integridad del endotelio vascular. **Figura 1.**



**Figura 1.** Estructura plaquetaria en la interacción con el endotelio.

Asimismo, la plaqueta cuenta en su superficie una serie de receptores que le permiten interactuar con diferentes agonistas y antagonistas con el objetivo de hacer más eficaz el proceso de la hemostasia. **Tabla 2.**

Grupos de Receptor	Integrantes
<b>Integrinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>IIb <math>\beta</math>3 (GPIIb-IIIa)</li> <li>- <math>\alpha</math><math>\beta</math>3 (receptor de la vitronectina)</li> <li>- 3 moléculas de la familia <math>\beta</math>1:               <ul style="list-style-type: none"> <li>receptor de la colágena <math>\alpha</math>2<math>\beta</math>1 (GPIa-IIa).</li> <li>receptor de fibronectina <math>\alpha</math>5<math>\beta</math>1 (GPIc-IIa).</li> <li>receptor de la laminina <math>\alpha</math>6<math>\beta</math>1(GPIc-IIa).</li> </ul> </li> </ul>
<b>Glucoproteínas ricas en leucina.</b>	GP Ib (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ )–GPIX-GPV.
<b>P-selectina</b>	P-selectina (CD-62).
<b>Familia de las Inmunoglobulinas</b>	GP- VI
<b>Receptores del ADP</b>	P2Y-1 P2Y12 P2X1
<b>Receptores de Trombina</b>	PAR-1 PAR-4

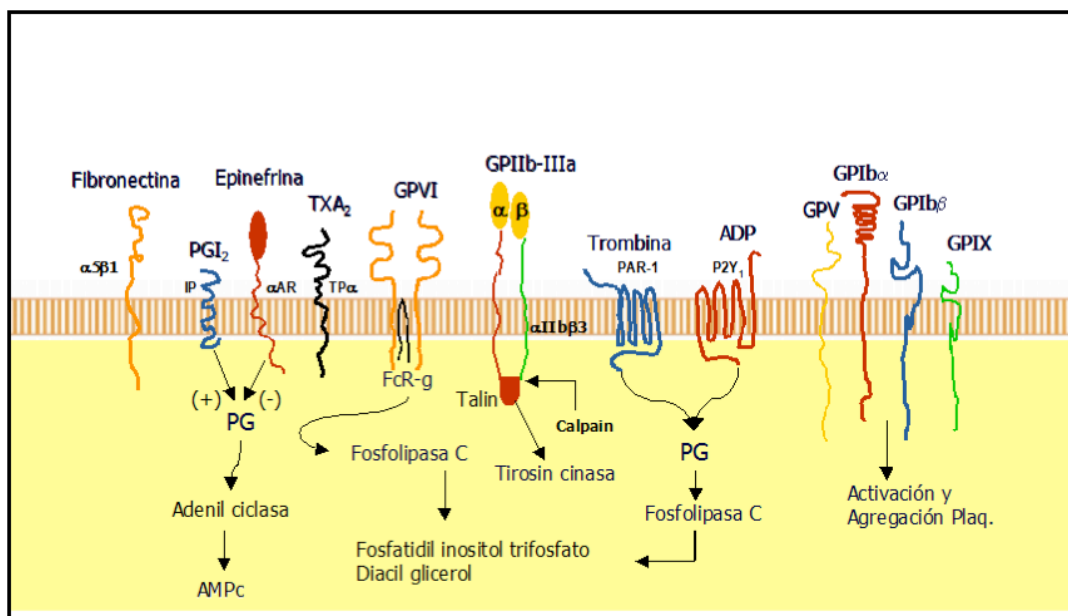
**Tabla 2. Receptores plaquetarios.**

Los receptores plaquetarios participan importantemente en las diferentes fases de la activación plaquetaria, sea adhesión o agregación plaquetaria o bien en los mecanismos que se traducen en formación de segundos mensajeros intraplaquetarios.

## 1.2 ANTÍGENOS PLAQUETARIOS.

### 1.2.1 Descripción y Clasificación

Las plaquetas humanas, al igual que el resto de los elementos formes sanguíneos, presentan en la superficie externa de su membrana estructuras polimórficas e inmunogénicas. Estas estructuras genéticamente determinadas y localizadas en las proteínas, glicoproteínas y glicolípidos, pueden causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante. **Figura 2**



**Figura 2. Receptores Plaquetarios.**

Proteína G (PG), una vez activado el receptor la PG esta asociada a una función específica, en el caso de los receptores de la trombina (PAR-1) y del ADP (P2Y<sub>1</sub>) activan fosfolipasa C para la generación de diacil glicerol y fosfatidil inositol trifosfato. Por su parte, la prosticiclina PGI<sub>2</sub> se une a su receptor (IP) y a través de la PG activa a la adenilato ciclasa que genera adenosin monofosfato cíclico (AMPc) e inhibe a la plaqueta. La epinefrina inhibe la adenilato ciclasa, disminuye los niveles de AMPc y activa la plaqueta.

Los antígenos son estructuras capaces de interactuar con receptores de linfocitos y macrófagos. Son definidos, inicialmente, a través de su capacidad para despertar una respuesta inmune (inmunogenicidad) o de su reacción con el producto de dicha respuesta (antigenicidad). Cuando pertenecen al mismo individuo respondedor se denominan autoantígenos. En cambio, si la respuesta es contra estructuras presentes en otros individuos de la misma especie se está en presencia de un aloantígeno.

Desde un inicio el interés del estudio de los antígenos y anticuerpos plaquetarios, radica



en su importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en los cuadros clínicos asociados a la aloinmunización. Los más comunes son: trombocitopenia neonatal aloinmune, Ipúrpura trombocitopénica postransfusional, trombocitopenia pasiva postransfusional y la refractariedad a la transfusión de plaquetas.

Es útil diferencia aquellos antígenos presentes en la plaqueta pero expresados en muchas otras células, conocidos como "*antígenos plaquetarios no específicos*", de aquellos con una expresión relativamente restringida a la membrana plaquetaria y a sus precursores, llamados "*antígenos plaquetarios específicos*". Los primeros, son causantes de la mayoría de los cuadros de refractariedad a la transfusión de plaquetas de causa inmunológica, y el último foco de este trabajo que intenta detectar la presencia y frecuencia de estos antígenos en pacientes con trombocitopenia inmune primaria crónica.

### 1.3 ANTÍGENOS PLAQUETARIOS NO ESPECÍFICOS.

Entre los antígenos no específicos de la plaqueta se encuentran los glicoconjugados de los sistemas de grupo sanguíneo ABH, P, I, Lewis y HLA de clase I.

- **Antígenos ABH.** Los antígenos del grupo sanguíneo ABH están presentes en prácticamente todas las células del organismo adulto. En las plaquetas se encuentran formando parte de la porción glucídica de las glicoproteínas plaquetarias intrínsecas y adsorbidos pasivamente por la fracción glucolipídica del plasma. Estas proteínas intrínsecas son, GPIb, GPIIa, GPIIb, GPIV, GPV, molécula de adhesión endotelial PECAM-1 y el CD109. Se asume generalmente que la expresión de los antígenos ABH en las plaquetas es insuficiente para que las isoaglutininas anti-A o anti-B puedan afectar significativamente la supervivencia de las plaquetas ABH incompatibles transfundidas. Sin embargo, se han descrito reacciones febriles e incrementos postransfusionales inversamente proporcionales al título de isoaglutininas.

Algunos trabajos indican casos donde se han obtenidos recuentos postransfusionales satisfactorios sólo después de la transfusión de plaquetas ABH compatibles.

- **Antígenos HLA de Clase I.** Los antígenos descritos como HLA de clase I son glicoproteínas presentes en la superficie de las plaquetas y de la mayoría de las células nucleadas. Son determinados por genes localizados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto del cromosoma 6, incluyendo varias regiones conocidas como: HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H y J. Los antígenos y anticuerpos del sistema HLA desempeñan un importante papel en varios acontecimientos relacionados con las transfusiones. Estos comprenden: aloinmunización, refractariedad a la transfusión de plaquetas, reacciones febriles no hemolíticas, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI) y la enfermedad injerto contra huésped postransfusional. Estos antígenos son altamente polimórficos. En la membrana plaquetaria se encuentran coexpresados los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C. La expresión de los antígenos HLA-A y HLA-B es al menos 10 veces mayor que los antígenos HLA-C, lo que hace innecesario el estudio de estos últimos en la búsqueda de plaquetas compatibles, salvo muy contadas excepciones.<sup>4-5</sup>

#### 1.4 ANTÍGENOS PLAQUETARIOS ESPECÍFICOS.

A pesar del gran número de glicoproteínas en la superficie plaquetaria, los antígenos descritos se encuentran localizados principalmente en los complejos glicoprotéicos: GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y en la proteína anclada por grupos glicosil-fosfatidilinositol y CD109. Estos antígenos acompañan la herencia de estas glicoproteínas y se heredan de manera autosómica co-dominante.<sup>6</sup> Actualmente se conocen 24 antígenos plaquetarios específicos definidos por sus correspondientes anticuerpos humanos, de los cuales 12 se hallan agrupados en seis sistemas compuestos por pares de antígenos, el tético y su correspondiente antitético. Para los 12 antígenos restantes, se cuenta únicamente con los anticuerpos que los definen pero no para su correspondiente antitético.<sup>3</sup>

Una razón por la que anticuerpos contra la estructura antitética aún no han sido descritos es que éstas se presentan en tan baja frecuencia que los individuos homocigotos y por lo tanto susceptibles a inmunizarse, son extremadamente raros. ( **Tabla 3** )

Pese a su denominación, muchos antígenos plaquetarios previamente considerados como específicos han sido encontrados también en otras células y tejidos. Muchos de estos antígenos son portados por las integrinas, miembros de receptores de adhesión celular, moléculas conocidas por estar involucradas en las interacciones célula-célula o célula-matriz. Los antígenos localizados inicialmente en la subunidad  $\beta 3$  (GPIIIa) plaquetaria han sido detectados en células endoteliales, células del músculo liso y en los fibroblastos. Los antígenos asociados con la subunidad  $\alpha 2$  integrina (GPIa) han sido encontrados en linfocitos T activados y en células endoteliales. Aquellos antígenos asociados al CD109 se encuentran también en los linfocitos T activados, en células endoteliales y en varias líneas celulares tumorales. Contrariamente, los antígenos localizados en la subunidad  $\alpha 1b$  y en la subunidad GPIb (miembros de la familia de Glicoproteínas ricas en leucina), parecen ser específicos del linaje megacariocítico.

Sistema	Antígeno	Sinónimos	Glicoproteína	HGNC*	CD*	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
HPA-1	HPA-1 <sup>a</sup>	Zw <sup>a</sup> , Pl <sup>A1</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	T <sup>196</sup>	Leucina <sup>73</sup>
	HPA-1b	Zw <sup>b</sup> , Pl <sup>A2</sup>				C <sup>196</sup>	Prolina <sup>53</sup>
HPA-2	HPA-2 <sup>a</sup>	Ko <sup>a</sup>	GPIIb	<i>GPIBA</i>	CD42b	C <sup>524</sup>	Treonina <sup>145</sup>
	HPA-2b	Ko <sup>b</sup> , Sib <sup>a</sup>				T <sup>524</sup>	Metionina <sup>145</sup>
HPA-3	HPA-3 <sup>a</sup>	Bak <sup>a</sup> , Lck <sup>b</sup>	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	CD41	T <sup>222</sup>	Isotoleucina <sup>843</sup>
	HPA-3b	Bak <sup>b</sup>				G <sup>222</sup>	Serina <sup>843</sup>
HPA-4	HPA-4 <sup>a</sup>	Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G <sup>526</sup>	Arginina <sup>145</sup>
	HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup>				A <sup>526</sup>	Glutamina <sup>147</sup>
HPA-5	HPA-5 <sup>a</sup>	Br <sup>a</sup> , Zav <sup>b</sup>	GPIa	<i>ITGA2</i>	CD49b	G <sup>1648</sup>	Acido Glutámico <sup>505</sup>
	HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>a</sup> , Hc <sup>a</sup>				A <sup>1648</sup>	Lisina <sup>505</sup>
HPA-6bw	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G <sup>1564</sup>	Arginina <sup>489</sup>
						A <sup>1564</sup>	Glutamina <sup>489</sup>
HPA-7bw	Mo <sup>a</sup>		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C <sup>1267</sup>	Prolina <sup>407</sup>
						G <sup>1267</sup>	Alanina <sup>407</sup>
HPA-8bw	Sp <sup>a</sup>		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C <sup>2004</sup>	Arginina <sup>536</sup>
						T <sup>2004</sup>	Cisteína <sup>536</sup>
HPA-9bw	Max <sup>a</sup>		GPIIb	<i>ITGA2B</i>	CD41	G <sup>2605</sup>	Valina <sup>857</sup>
						A <sup>2605</sup>	Metionina <sup>837</sup>
HPA-10bw	La <sup>a</sup>		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G <sup>281</sup>	Arginina <sup>62</sup>
						A <sup>281</sup>	Glutamina <sup>62</sup>
HPA-11bw	Gro <sup>a</sup>		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G <sup>1996</sup>	Arginina <sup>623</sup>
						A <sup>1996</sup>	Histidina <sup>633</sup>
HPA-12bw	Iy <sup>a</sup>		GPIIb β	<i>GPIBB</i>	CD42c	G <sup>141</sup>	Glicina <sup>15</sup>
						A <sup>141</sup>	Acido glutámico <sup>15</sup>
HPA-13bw	Sit <sup>a</sup>		GPIa	<i>ITGA2</i>	CD49b	C <sup>2531</sup>	Treonina <sup>799</sup>
						T <sup>2531</sup>	Metionina <sup>799</sup>
HPA-14bw	Oe a		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	AAG <sup>1929-31</sup>	Lisina <sup>631</sup>
						delección	Δ Lisina <sup>611</sup>
HPA-15	HPA-15a	Gov b	CD109	<i>CD109</i>	CD109	C <sup>2108</sup>	Serina <sup>703</sup>
	HPA-15b	Gov a				A <sup>2108</sup>	Tirosina <sup>703</sup>
HPA-16bw	Duv a		GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C <sup>517</sup>	Treonina <sup>140</sup>
						T <sup>517</sup>	Isotoleucina <sup>140</sup>

\*HGNC: El comité en nomenclatura genética de la organización genoma humano \*CD: agrupación de diferenciación

**Tabla 3. Sistema de Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA).**

## 1.5 NOMENCLATURA HPA

Históricamente los antígenos plaquetarios específicos fueron llamados con el nombre de los pacientes sensibilizados de quienes se obtuvieron los antisueros específicos que los definían.<sup>3</sup>

Esta nomenclatura se tornó confusa debido al descubrimiento independiente de un mismo antígeno por diferentes grupos de investigadores, sumado a cierto grado de controversia con respecto a la prioridad en la asignación de los nombres.

Para solucionar este dilema, Von Dem Borne y Decary en 1990 propusieron un sistema simplificado, al que llamaron HPA<sup>7-8-9</sup>, acrónimo del inglés Human Platelet Antigens (antígenos plaquetarios humanos), el cual fue revisado en 1998 por Santoso, Kiefel y recientemente por Metcalfe.<sup>3</sup>

Según esta nomenclatura vigente, un antígeno plaquetario específico es denominado un antígeno humano plaquetario (HPA) cuando sus bases moleculares son conocidas. Los antígenos plaquetarios humanos son agrupados en sistemas basados en la existencia de anticuerpos que definen tanto al antígeno tético como al antitético.

Los HPA y sus sistemas son designados cronológicamente (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5) siguiendo el orden de la fecha de su descubrimiento, y se designan alfabéticamente en orden según su frecuencia (de alta a baja) en la población estudiada, designando al de mayor frecuencia como “a” y al de baja frecuencia como “b”.

Una designación “w” es agregada después del nombre del antígeno si aún no se conoce un anticuerpo contra el antígeno antitético. (**Tabla 3**)

## 1.6 BASES MOLECULARES HPA

Se conocen las bases moleculares de 22 de los 24 antígenos plaquetarios definidos serológicamente. La diferencia entre lo propio y lo ajeno viene dada por la sustitución de un único aminoácido, causado por un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el gen que codifica la correspondiente glicoproteína de membrana. La única excepción a esta regla es el antígeno Oea (HPA-14bw), definido por una deleción de tres nucleótidos que se traduce en un único aminoácido faltante en la glicoproteína portadora.<sup>10-11-12</sup>

### **Glicoproteínas polimórficas e inmunogénicas de la membrana plaquetaria portadora de HPA:**

#### **A.) GPIIb/IIIa o $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub> (CD41/CD61)**

Esta integrina juega un papel muy importante en la agregación plaquetaria. Después de la activación, pasa por un cambio conformacional que le permite unirse al fibrinógeno y al Factor de von Willebrand (FvW). El fibrinógeno se une a la GPIIbIIIa en dos plaquetas adyacentes, haciendo de puente y mediando la agregación plaquetaria. Por ser esta una vía final, común y única, la deficiencia de este complejo, tiene pronunciados efectos en la

funcionalidad plaquetaria, como sucede en la Trombastenia de Glanzmann.

Hay aproximadamente 50-80.000 copias de este complejo heterodimérico y requiere  $\text{Ca}^{++}$  para su función. Este consiste en la asociación no covalente de una subunidad  $\alpha\text{IIb}$  y otra  $\beta_3$ . Los genes que codifican dichas subunidades se encuentran en el brazo largo del cromosoma 17 (q21-23) muy cerca entre sí.

La GPIIIa (CD61,  $\beta_3$ ) es una proteína glucosilada de 90 kDa que contiene tres dominios, uno grande extracelular con 28 puentes disulfuro, un dominio transmembrana y un segmento citoplasmático corto C-terminal.

La GPIIb (CD41,  $\alpha\text{IIb}$ ) tiene una cadena extracelular pesada de 116 kDa asociada covalentemente por un puente disulfuro a una cadena liviana de transmembrana de 22 k-Da.

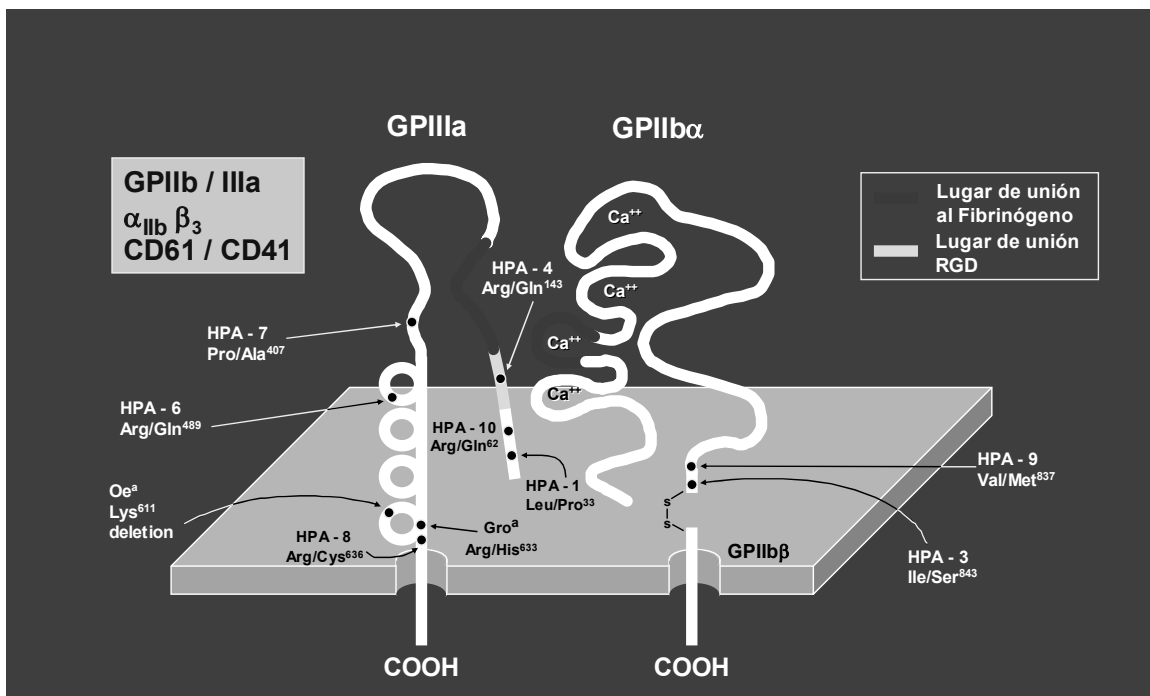
La capacidad para unirse al FvW, a la fibronectina y a la vitronectina está dada por una secuencia repetitiva del tripéptido Arg-Gly-ASP (RGD). Sin duda este complejo porta el mayor número de antígenos y sistemas. **Figura 3.**

En la cadena  $\beta_3$  se hallan los sistemas: **HPA-1** (residuo 33), **HPA-4** (residuo 143), **HPA-6** (residuo 489), **HPA-7** (residuo 407), **HPA-8** (residuo 636), **HPA-10** (residuo 62), **HPA-11** (residuo 633), **HPA-14** (611del) y **HPA-16** (residuo 140). En la cadena  $\alpha\text{IIb}$  se encuentran los sistemas **HPA-3** (residuo 843) y **HPA-9** (residuo 837).

### Figura 3. Complejo glucoproteico plaquetario GPIIb/IIIa.

Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha.

(Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)



## b. GPIb/IX/V (CD42)

Este complejo glicoproteico rico en leucina está involucrado en las etapas iniciales de la adhesión plaquetaria a la matriz sub endotelial de los vasos dañados mediado por el FvW. Este receptor del FvW está constituido por cuatro componentes transmembranales, todos miembros de la familia de proteínas ricas en repeticiones de leucina:

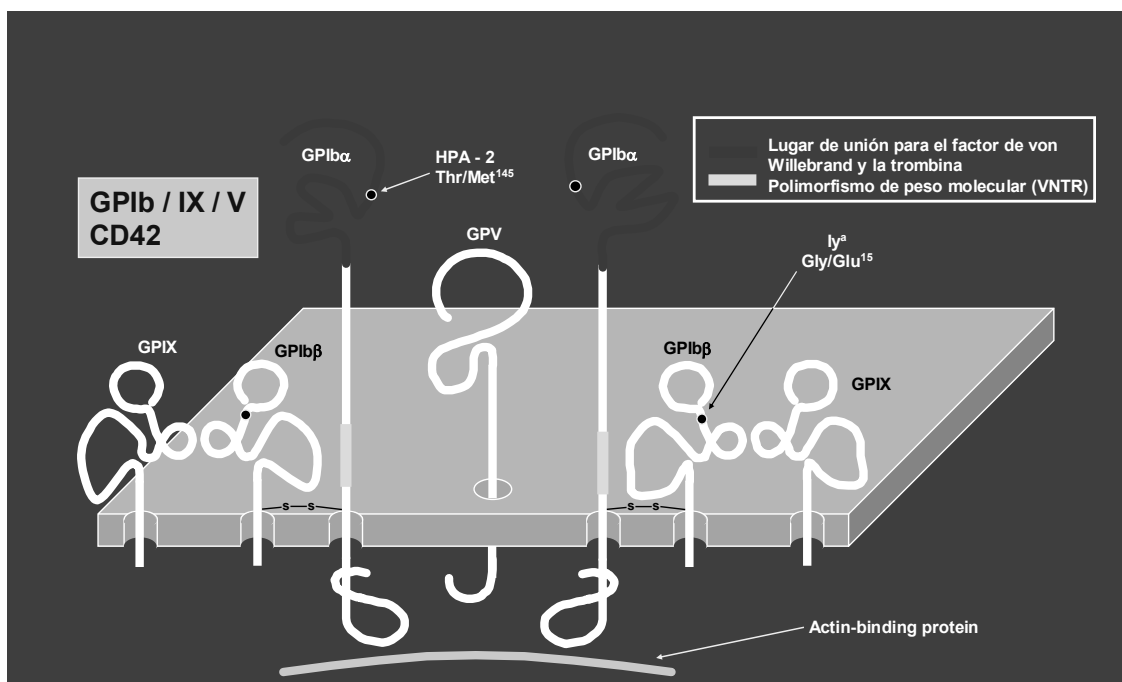
La GPIb $\alpha$  (CD42b, 143 kDa) está unida covalentemente a la GPIb $\beta$  (CD42c, 22 kDa) por un único puente disulfuro, y asociada no covalentemente con la GPIX (CD42a, 20 kDa) y GPV (CD42d, 83 kDa). Hay aproximadamente 25.000 copias del complejo GPIb/IX y 12.000 de la GPV por plaqueta y el complejo está asociado funcionalmente al Receptor Fc $\gamma$ RII (CD32).

El sitio primario de unión del complejo glicoproteico al FvW está localizado en la cadena GPIb $\alpha$ , pero el resto del complejo es necesario para dicha unión. El gen que codifica para la GPIb $\alpha$  está en el cromosoma 17, el gen de la GPIb  $\beta$  gene está en el cromosoma 22 y los genes que codifican para la GPIX y la GPV están en el cromosoma 3. La similitud estructural de todos estos genes sugiere que podrían haber evolucionado de un gen único ancestral.

En este complejo glucoprotéico se han descrito dos sistemas antigénicos hasta el momento (Figura 4): El polimorfismo **HPA-2**, situado en la GPIb $\alpha$  (residuo 142) y el **HPA-12** en la GPIb $\beta$ . Se han descritos varias mutaciones silenciosas de la GPIb  $\alpha$  pero sin capacidad de inducir una aloinmunización.

**Figura 4. Complejo glicoproteico plaquetario GPIbIXV.** Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha.

(Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)



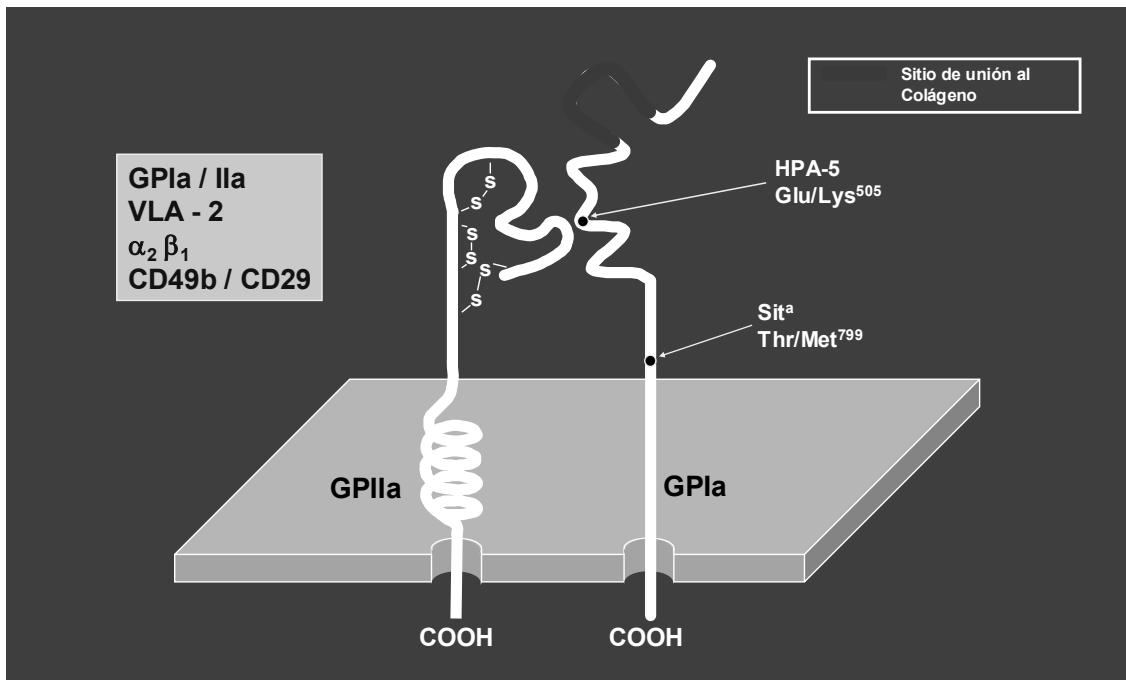
### c. GPIa/IIa (CD49/CD29)

Se trata de una integrina, constituida por la asociación no-covalente de una subunidad  $\alpha 2$  (165 kDa) y otra  $\beta 1$  (145 kDa). Hay aproximadamente 800-2.800 copias del heterodímero por plaqueta y también está presente en linfocitos T activados y otras células. Su ligando (molécula con la que interacciona específicamente) principal es el colágeno subendotelial expuesto.

Se conocen las bases genéticas para los dos sistemas antígenicos presentes en el complejo GPIa/IIa (Figura 5). Tanto el sistema **HPA-5** (residuo 505) como el **HPA-13w** (residuo 799) se hallan en la GPIa y son el resultado de la sustitución de un único nucleótido.

### Figura 5. Complejo glicoproteico plaquetario GPIIa.

Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha. (Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)



#### D.) CD109.

Se trata de una glicoproteína de 175 kDa anclada a la membrana plaquetaria por un grupo glicosil-fosfatidil-inositol. Se encuentra presente en monocitos, granulocitos, células T estimuladas y células progenitoras mieloides CD34+. Aunque la función de la molécula CD109 no se conoce, se cree que puede estar involucrada en interacciones célula-célula. La base genética de los antígenos Gov (sistema HPA-15) en el CD109 ha sido determinada recientemente.

#### E.) Otras.

La glicoproteína GPIV (CD36, GPIIb) se encuentra en la membrana de plaquetas y monocitos. Consiste en una cadena simple de aminoácidos. Existen alrededor de 12.000 a 14.000 copias y tiene función de receptor para la trombospondina actuando en la estabilización del agregado plaquetario.

### 1.7 TIPIFICACIÓN ANTIGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS.

**Fenotipificación serológica.** El valor de la fenotipificación serológica de los antígenos plaquetarios específicos es limitado debido a que a menudo no es posible obtener suficientes plaquetas en pacientes trombocitopénicos y los reactivos para su determinación no resultan fiables, con excepción de anti-HPA-1a y de anti-HPA-5b. Hasta hace poco, la fenotipificación HPA dependía de la disponibilidad de suero humano de individuos sensibilizados contra los antígenos plaquetarios específicos.

Estos sueros anti-HPA contenían con frecuencia anticuerpos dirigidos contra los antígenos HLA de clase I, limitando así su uso a los análisis "glicoproteínas- específicas" tales como el MAIPA (inmovilización del antígeno plaquetario usando un anticuerpo monoclonal). Si bien los anticuerpos monoclonales se utilizan rutinariamente para fenotipar los glóbulos rojos, a excepción de HPA-1a ningún Anticuerpo Monoclonal se ha



utilizado para tipificar los HPA.

Recientemente se han publicado varios métodos para el fenotipado rápido usando anticuerpos policlonales anti-HPA-1a de origen recombinante o producidos por tecnología “*Phage display*”. Estos análisis pueden complementar los análisis de genotipificación, acelerando la disponibilidad de paneles HPA-seleccionados.<sup>13-14</sup>

**Genotipificación.** La genotipificación HPA puede realizarse con ADN geonómico obtenido de cualquier material celular, utilizando reactivos disponibles comercialmente. Muchas técnicas se han descrito para caracterizar los SNPs: Reacción en Cadena de la Polimerasa- cebador secuencia específica (PCR-SSP), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP), hibridación con oligonucleótidos secuencia específica (SSO), reacción en cadena de la ligasa (LCR), mini-secuenciación, etc. Muchas de ellas se han aplicado a la genotipificación de los sistemas HPA, aunque solamente la técnica de PCR-SSP sola o combinada con RFLP se utiliza extensamente en los estudios poblacionales y en la práctica clínica especializada.<sup>14</sup>

## **1.8 ALOINMUNIZACIÓN HPA.**

La aloinmunización plaquetaria ocurre en respuesta a la exposición de antígenos que no posee el individuo respondedor. Por lo tanto, de no existir diferencias antigénicas entre el donante y el receptor o la gestante y su pareja, la inmunización no puede ocurrir. Esta incompatibilidad potencial, es necesaria pero no suficiente, ya que sólo una proporción de estos individuos se inmuniza. Se analizarán a continuación los factores aceptados como condicionantes de la aloinmunización HPA:

### **a. Mecanismos**

Hay dos mecanismos descritos en la formación de anticuerpos plaquetarios específicos: el primero es la “vía directa”, que ocurre cuando los receptores de las células T (TCR) en los linfocitos CD4+ interactúan directamente con el aloepitopo extraño HPA presentado en las moléculas de MHC de clase II de las células presentadoras de antígenos (CPAs) del donante.<sup>16</sup>

El segundo mecanismo es la “vía indirecta” que involucra el procesamiento de los antígenos extraños del donante (p. ej. la GP extraña que contiene en su estructura los antígenos HPA) por las células presentadoras de antígenos del individuo receptor seguido por la presentación de los péptidos alogénicos del donante en las moléculas MHC de clase II del receptor a los linfocitos T CD4+ del receptor.

En ambas vías se requiere una coestimulación para activar los linfocitos CD4+ y para que secreten citoquinas como IL-2 y IFN-gamma, que van a estimular a linfocitos B que tuvieron contacto con su antígeno para que se diferencien a células plasmáticas y secreten anticuerpos.

La respuesta por la vía directa es intensa, pudiendo activarse hasta el 5% de los receptores de las células T del receptor. En la vía indirecta, la activación de los linfocitos CD4+ es 100 veces menor, pero suficiente para generar anticuerpos con idénticos títulos a aquellos inducidos por la vía directa.

### **b. Factores del antígeno (inmunogenicidad)**

En presencia de una incompatibilidad potencial, los distintos antígenos plaquetarios varían

entre sí en su capacidad de generar una reacción inmune.

Si bien no es sencillo discriminar los factores puramente atribuibles al antígeno de aquellos dependientes del individuo respondedor, pueden citarse:

- Densidad antigénica sobre la superficie plaquetaria
- Hidrofobicidad de los residuos aminoacídicos que lo conforman
- Accesibilidad del epitopo.

### **c. Factores del individuo respondedor**

Poco se conoce sobre los factores individuales que condicionan la respuesta inmune contra los antígenos plaquetarios específicos. Actualmente resulta imposible identificar con certeza los individuos susceptibles a inmunizarse o predecir el número de exposiciones antigénicas necesarias para estimular efectivamente la producción de anticuerpos anti-HPA.

La asociación más fuerte entre un factor genético y el riesgo aumentado de aloinmunización se ha descrito para dos de los antígenos plaquetarios específicos clínicamente más importantes, el HPA-1a y el HPA-5b.

## **1.9 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS POLIMORFISMOS HPA**

**Asociadas a la aloinmunización.-** Las glicoproteínas plaquetarias humanas son el blanco frecuente del sistema inmune. Sus polimorfismos son reconocidos por linfocitos B y T alogénicos, para despertar una respuesta efectora esencialmente humoral. Los anticuerpos generados se unen a sus correspondientes antígenos en la superficie plaquetaria y conducen al secuestro de las plaquetas por los macrófagos, a través de la interacción con receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, este proceso ocurre generalmente en el bazo y resulta en trombocitopenia. Los anticuerpos están usualmente dirigidos contra las moléculas HLA de clase I y contra los aloepitopos en las glicoproteínas GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y CD109.<sup>17</sup>

Estos aloanticuerpos pueden causar cuadros clínicos como: refractariedad a la transfusión de plaquetas (PTR), trombocitopenia feto-neonatal aloinmune (TFNA), púrpura posttransfusional (PTP) y la trombocitopenia aloinmune pasiva posttransfusional.

### **I. Refractariedad a la transfusión de plaquetas**

La refractariedad a la transfusión de plaquetas, definida como un escaso incremento tras de dos transfusiones plaquetarias consecutivas, puede resultar de mecanismos inmunes y/o no inmunes.

La causa inmune más frecuente es la aloinmunización contra los antígenos HLA y en una proporción mucho menor (5-10%) a los antígenos plaquetarios específicos. Más frecuente y menos dramática es la reducción del incremento postransfusional en el caso de transfusiones de plaquetas ABH incompatibles, dependiente de la expresión de los antígenos en las plaquetas del donante y el título de las isoaglutininas en el receptor.

### **II. Trombocitopenia feto-neonatal aloinmune**

La trombocitopenia feto-neonatal aloinmune es considerada en la actualidad la causa más común de trombocitopenia en el recién nacido con una frecuencia aproximada de 1 caso cada 800-1200 recién nacidos.

Es definida por recuentos plaquetarios en el feto/neonato menores a  $150 \times 10^9/L$ , causados por anticuerpos maternos dirigidos contra antígenos plaquetarios específicos fetales heredados del padre. Es la contrapartida plaquetaria de la enfermedad hemolítica feto-neonatal pero, a diferencia de ella, alrededor de un tercio de los casos ocurre durante la primera gestación.<sup>18</sup>

Esto podría explicarse por pasajes de glicoproteína IIIa fetal a la circulación materna de manera muy temprana en la gestación (14 semanas) y su expresión en el sinciotrofoblasto del borde en cepillo (Brush border) placentario. A pesar de que la GPIIIa es una proteína transmembrana de tipo I, su aparición en la circulación puede ocurrir cuando las células entran en apoptosis, quizás durante la invasión del endometrio.<sup>19</sup>

En caucásicos el 95% de los casos son debidos a aloinmunización contra los antígenos HPA-1a y HPA-5b. Esta respuesta generalmente involucra la producción de anticuerpos IgG. En orientales es menos prevalente y ocurre principalmente asociado a HPA-4b35 y HPA-5b.<sup>20</sup>

El feto/neonato puede sufrir complicaciones hemorrágicas, la más grave es la hemorragia intracraneal. Los antígenos HLA parecen no participar en la patogenia. La terapia efectiva en TFNA consiste en la transfusión de plaquetas maternas lavadas u otras plaquetas antígeno-negativas.<sup>21</sup>

### **III. Púrpura trombocitopénica post-transfusional**

La púrpura post-transfusional es un cuadro infrecuente pero grave. Afecta fundamentalmente a mujeres (cociente mujer/hombre >20:1) de alrededor de 50 años que han sido alo-inmunizadas contra un antígeno plaquetario específico en embarazos previos o por transfusión. Se caracteriza por desarrollar trombocitopenia grave y aislada, aproximadamente una semana después de haber recibido una transfusión conteniendo plaquetas. Los pacientes sintetizan anticuerpos que dan reacción cruzada con sus propias plaquetas en la primera fase de la respuesta anamnésica.

### **IV. Trombocitopenia aloinmune postransfusional pasiva**

Los donantes de sangre mujeres pueden desarrollar anticuerpos antiplaquetarios después de un embarazo (o también al igual que los hombres luego de una transfusión). Estudios retrospectivos realizados en donantes mujeres con antecedentes obstétricos han encontrado una prevalencia entre 2,5- 4,2% de anticuerpos contra antígenos plaquetarios específicos. Estos anticuerpos pueden

persistir aún muchos años después del embarazo y provocar una trombocitopenia pasiva al receptor del hemocomponente. Es una rara pero grave complicación de la transfusión de plasma, glóbulos rojos y sangre entera. Cuando los anticuerpos son absorbidos por las plaquetas del receptor puede producirse un cuadro grave de trombocitopenia que remite con rapidez.<sup>22</sup>

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La importancia de establecer la frecuencia y detección de los Antígenos Plaquetarios Humanos radica en su correlación entre la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra glicoproteínas plaquetarias (GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V) y mayor frecuencia de variantes genóticas de los HPA, ya que estos pueden constituir un determinante antigénico de los anticuerpos dirigidos contra estas glicoproteínas.

También se ha visto el efecto de estos polimorfismos sobre la funcionalidad plaquetaria y su papel en cuadros hemorrágicos y trombóticos, asociándolos también a patologías muy prevalentes como infarto de miocardio y la enfermedad coronaria arterial.

En América Latina existen pocos estudios de las frecuencias genóticas en sujetos sanos, en México se desconoce la frecuencia genotípica de los HPA en sujetos sanos, lo anterior debido a que no existen estudios previos a este respecto. Evidentemente en otros

trastornos autoinmunes u otras enfermedades se desconoce la prevalencia de los genotipos de HPA.

El reconocimiento de la mayor frecuencia genotípica de los HPA en pacientes con TIP crónica comparada con sujetos sanos, puede tener implicaciones pronósticas en la evolución o gravedad de la enfermedad.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la prevalencia de los antígenos HPA en población mexicana.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar las frecuencias genotípicas de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA-1,2,3,4,5 y 15 en sujetos sanos

## **4. PACIENTES Y MÉTODOS**

### **4.1 Diseño del Estudio**

Estudio descriptivo

### **4.2 Muestra (universo de trabajo)**

Sujetos sanos del Banco de Sangre Centro Médico Siglo XXI y del Hospital General de México. Se obtuvo una muestra del 50 individuos.

### **4.3 Criterios de Selección.**

- Sujetos sanos
- Ambos géneros
- Edad mayor a de 18 años
- Originarios de la República Mexicana.

### **4.4 Descripción de variables.**

**A.** Población: Sujetos sanos que acudieron a donar al Banco Central de Sangre del CMN, Siglo XXI y del Hospital General México.

**B.** Antígenos plaquetarios Humanos: Son determinantes antigénicos localizados en glicoproteínas plaquetarias y que conformen el sistema HPA. Los antígenos descritos se encuentran localizados principalmente en los complejos glucoprotéicos: GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y en la proteína anclada por grupos glicosil-fosfatidil-inositol y CD109 cada uno de estos en diferentes frecuencias. De los 24 antígenos plaquetarios específicos definidos por sus correspondientes anticuerpos humanos 12 se hallan agrupados en seis sistemas compuestos por pares de antígenos, el tético y su correspondiente antitético → HPA-1,2,3,4,5 y 15 y para 6,7,8,9,10,11 se cuenta únicamente con los anticuerpos que los definen pero no para su correspondiente antitético.

### **4.5 Descripción General del Estudio.**

Se seleccionaron a donadores sanos que acudían a donar y que cumplían con los criterios de la Norma Oficial Mexicana vigente (NOM 253) y mediante firma de consentimiento informado se procedió a la toma de muestra para el estudio del genotipo y fenotipo.

**Obtención de la muestra.** A los sujetos incluidos en el estudio se les realizó toma de muestra de sangre venosa de 2 tubos de EDTA con 3cc se realizó citometría hemática para verificación que se encuentre en rangos normales y aceptados para la donación. Otro tubo se utilizó para procesar HPA. La sangre total debe transportarse entre 2-30°C. Las muestras de sangre pueden guardarse bien a temperatura ambiente hasta 8 días, o bien a 2-8 °C hasta 15 días, o bien congeladas hasta 1 mes.

**Descripción Técnica de Antígenos HPA.** El Bloodchip es un DNACHIP actualmente reconocido como el Gold Standard en genotipado de los 12 sistemas plaquetarios, útil en pacientes con riesgo de incompatibilidad a transfusiones.

Determina a los 24 antígenos plaquetarios humanos, mediante el análisis de 128 polimorfismos. Esta prueba genética se realiza con muestra de sangre o saliva.

**Extracción de DNA a partir de sangre total.** El proceso inicia mediante la producción de lisis celular , obteniendo así una porción soluble donde hay DNA más proteínas . Para que luego el DNA sea retenido en una membrana de silica, que posteriormente a través de un eluido se obtenga el DNA en un buffer libre de endonucleasas

## **5.- ASPECTOS ÉTICOS.**

El presente trabajo se realizó bajo los lineamientos que rigen y reglamentan los proyectos de investigación en humanos, mismos que están definidos en la Declaración de Helsinki por la Organización Mundial de la Salud, con su modificación posterior de Tokio.

Todos los sujetos participantes estuvieron informados del objetivo del estudio y firmaron carta de consentimiento informado, donde autorizaron emplear sus muestras de sangre para procesamiento de DNA.

## 6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Recolección de datos:

Se diseñó y evaluó la hoja de recolección de datos.

### Organización de los datos:

Se ordenaron por distribución de frecuencias simples y de intervalo.

### Presentación de los datos:

Se presentan en tablas y gráficos

### Estadística descriptiva:

El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 14.

Se determinó el tipo de distribución de las variables utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que señala el cumplimiento de las premisas de normalidad.

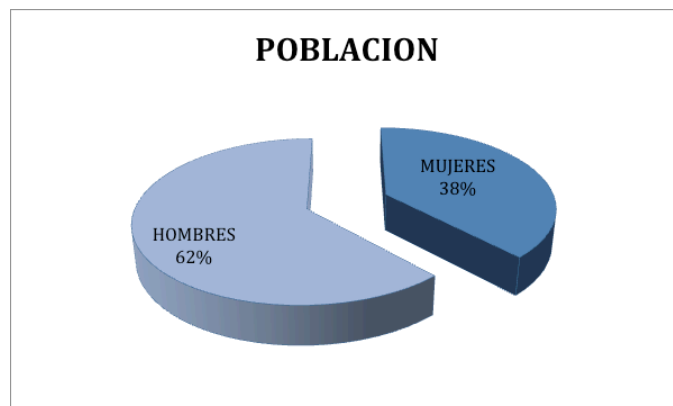
A cada variable se le efectuó medidas de tendencia central y de dispersión; media, desviación estándar, mediana y percentiles 25 y 75.

## 7. RESULTADOS

- a) **Características Generales.** Se estudiaron a 50 sujetos sanos que fueron seleccionados para el estudio y que aceptaron participar en el mismo y de los cuales 19 fueron mujeres y 31 hombres. Todos originarios de México. **Figura 6.**

**Figura 6. Distribución de género en la población estudiada para HPA.** La mayoría de los sujetos estudiados fueron hombres con el 62%, sin embargo, esta distribución no modifica el análisis genotípico.



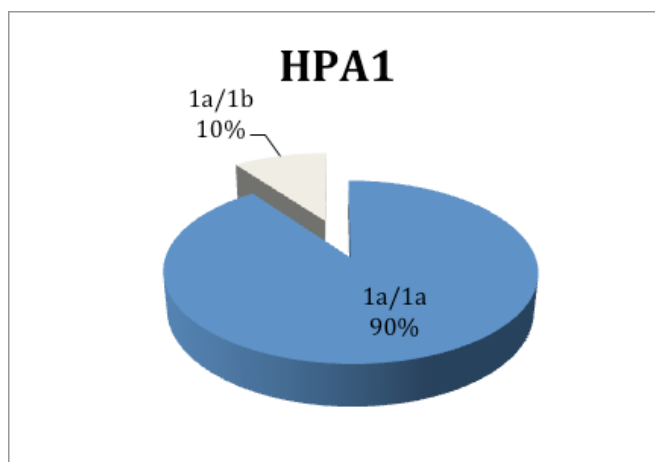


**b) Estudios de Genotipos HPA.** En la población estudiada se efectuó el análisis genotípico de sus frecuencias alélicas de los antígenos, HPA1, HPA2, HPA3, HPA4, HPA5 y HPA 15.

En el análisis descriptivo de los haplotipos de los antígenos HPA, se observa que los sistemas con frecuencia mayor al 90% son los HPA ( $1^a/1^a$ ) (90%) y HPA 4 ( $4^a/4^a$ ) (94%). **Figura 7, Tabla 4.**

**Figura 7. En esta figura se observa los genotipos del sistema HPA 1.**

El 90% de la población estudiada tuvo 90% el genotipo HPA ( $1^a/1^a$ ) y baja frecuencia alélica "b"



Antígeno Plaquetario	Haplotipo	Número	Frecuencia
HPA 1	$1^a/1^a$	50	90%
	$1^a/1^b$	5	10%
HPA 2	$2^a/2^a$	33	66%
	$2^a/2^b$	15	30%
	$2^b/2^b$	1	2%
HPA 3	$3^a/3^a$	19	38%

	3 <sup>a</sup> /3 <sup>b</sup>	25	50%
	3 <sup>b</sup> /3 <sup>b</sup>	6	12%
HPA 4	4 <sup>a</sup> /4 <sup>a</sup>	47	94%
	4 <sup>a</sup> /4 <sup>b</sup>	3	6%
HPA 5	5 <sup>a</sup> /5 <sup>a</sup>	42	84%
	5 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	8	16%
HPA 15	15 <sup>a</sup> /15 <sup>a</sup>	14	29%
	15 <sup>a</sup> /15 <sup>b</sup>	26	54%
	15 <sup>b</sup> /15 <sup>b</sup>	8	17%

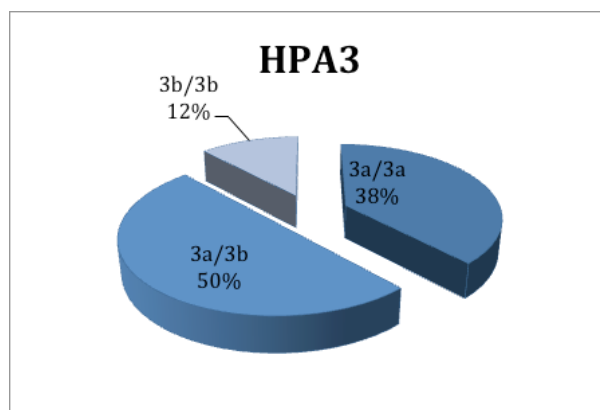
**Tabla 4. Frecuencia de los haplotipos del sistema HPA en población mexicana.**

Análisis de las frecuencias observadas en los genotipos más comunes de los sistemas HPA1-5 y 15 según su presentación en la población Mexicana, se puede observar la distribución genotípica de los diferentes sistemas HPA y sus frecuencias alélica (a/b).

Por otra parte, es de llamar la atención la baja frecuencia alélica “b”, en la mayoría de la población estudiada, excepto para los sistemas HPA-3 y HPA-15 donde la frecuencia es mayor del 50% de todos los sujetos estudiados. **Figura 7 y 8.**

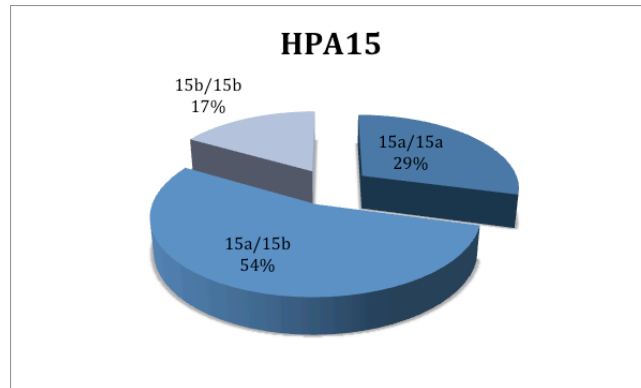
**Figura 7. Distribución alélica de los genotipos “b” en el sistema HPA 3.**

En este figura se observa que el genotipo “b” (HPA 3<sup>a</sup>/3<sup>b</sup>) se presentó en el 50% de la población estudiada.



**Figura 8. Distribución alélica de los genotipos “b” en el sistema HPA 15.**

En este figura se observa que el genotipo “b” (HPA 15<sup>a</sup>/15<sup>b</sup>) se presentó en el 52% de la población estudiada.



**c) Estudios de Fenotipos HPA.** En la población estudiada se efectuó en análisis fenotípico con base a los genotipos detectados. La baja expresión del alelo “b” en 4 sistemas, excepto el 3 y 15 donde 30% de los sujetos lo portan. **Tabla 5.**

Sistema Antigénico (HPA)	Fenotipo	Número	Frecuencia.
HPA 1	a+	50	100%
	b+	5	10%
	b-	45	90%
HPA 2	a+	48	96%
	a-	2	4%
	b+	16	32%
	b-	34	68%
HPA 3	a+	44	88%
	a-	6	12%
	b+	31	62%
	b-	19	38%
HPA 4	a+	50	100%
	b+	3	6%
	b-	47	94%
HPA 5	a+	50	100%
	b+	8	16%
	b-	42	84%
HPA 15	a+	39	78%
	a-	11	22%
	b+	34	68%
	b-	16	32%

**Tabla 5. Frecuencia de fenotipos de los sistemas HPA 1,2,3,4,5 y 15.**

Se observa la prevalencia alélica “a” en todos los genotipos de los sistemas estudiados como corresponde de acuerdo a la literatura, así mismo el alelo “b” aunque bajo esta presente de manera significativa en los sistemas HPA 3 y 15.

**d) Comparación de Genotipos HPA en diferentes poblaciones.** El estudio de genotipos del sistema antigénico HPA entre diferentes poblaciones del mundo ha permitido tener un conocimiento sobre el comportamiento genético en cada población. **Tabla 6.**

Población	HPA 3a	HPA 3b	a+ b-	a+ b+	a- b+
Americanos Indígenas	<b>0.57</b>	<b>0.43</b>	<b>34.9</b>	<b>44.4</b>	<b>20.6</b>
Negros	<b>0.65</b>	<b>0.35</b>	<b>43.3</b>	<b>43.3</b>	<b>13.4</b>
Blancos	<b>0.55</b>	<b>0.45</b>	<b>34.5</b>	<b>41.4</b>	<b>24.1</b>
Japoneses	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>25.0</b>	<b>50.0</b>	<b>25.0</b>
<b>Mexicanos (México)</b>	<b>0.88</b>	<b>0.62</b>	<b>38.0</b>	<b>50.0</b>	<b>12.0</b>

**Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas entre diferentes poblaciones Amerindias en el Brasil y la población de México investigada en este estudio.**

En esta tabla se muestra que la frecuencia del genotipo HPA 3<sup>a</sup> y 3b es mayor en población mexicana, sin embargo, las frecuencias alélicas a+ b- y a- b+ son semejantes a la población negra.

Los resultados encontrados en la población mexicana demuestran que la prevalencia alélica A al igual que otros países de América, África, así como algunos países europeos tienen una marcada diferencia con países asiáticos donde predomina la expresión del alelo B y la presencia del alelo A es considerado como raro o inexistente. **Tabla 7.**

	Mexicanos	Malaysian (This study)	AMERICA Brazilian (Amerindian)	AFRICA Cameroonian	South African (Indian)	EUROPE Austrian	EUROPE British	EUROPE Croatian	EUROPE French	EUROPE German	EUROPE Italian	EUROPE Macedonian	EUROPE Spanish	ASIA Indian	ASIA Pakistani	ASIA Indonesia	ASIA Han Chinese	ASIA Japanese	ASIA Korean
1a	1.00	0.975	1	0.907	0.893	0.852	0.84	0.854	0.848	0.84	0.85	0.865	0.81	0.9244	0.593	0.107	1.000	0.73	0.200
1b	0.10	0.025	0	0.093	0.107	0.148	0.16	0.146	0.152	0.16	0.15	0.135	0.19	0.0756	0.885	0.991	0.994	0.998	0.988
2a	0.96	0.9625	0.821	0.763	0.9305	0	0.925	0.89	0	0	0.89	0	0	0.9979	0.115	0.009	0.006	0.002	0.012
2b	0.32	0.0375	0.179	0.237	0.0695	0	0.075	0.11	0	0	0.11	0	0	0.0021	0.92	0.939	0.9515	0.9	0.923
3a	0.88	0.5025	0.757	0.614	0.6695	0	0.627	0.575	0.62	0	0.61	0	0	0.01	0.08	0.061	0.0485	0.1	0.077
3b	0.62	0.4975	0.243	0.386	0.3305	0	0.373	0.425	0.38	0	0.39	0	0	0.99	0.69	0.505	0.5945	0.718	0.555
4a	1.00	0.995	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0.9953	0.31	0.495	0.4055	0.282	0.445
4b	0.06	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0047	1	1	0.9955	0.989	0.99
5a	1.00	0.95	1	0.746	0.937	0	0.914	0.895	0.874	0	0.9	0	0	0.9562	0	0	0.0045	0.011	0.01
5b	0.16	0.05	0	0.254	0.063	0	0.086	0.105	0.126	0	0.1	0	0	0.0438	0.9	0.995	0.986	0.973	0.978
6a	1.00	0.9925	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0.9923	0.1	0.005	0.014	0.027	0.022
6b	-	0.0075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0077	0	0.967	0.9865	0.973	0.98
15a	0.78	0.515	0	0.691	0.4395	0	0.524	0	0	0	0	0	0	0	0	0.033	0.0135	0.027	0.02
15b	0.68	0.485	0	0.309	0.5605	0	0.476	0	0	0	0	0	0	0	0.59	0	0.532	0	0

**Tabla 7. Tabla de comparación en varias poblaciones de la prevalencia de alelos A y B.** La población Mexicana muestra la baja frecuencia “b “ en comparación con otras poblaciones, así como la alta frecuencia alélica “a” en comparación con poblaciones de América y África.

## 8. DISCUSIÓN

Los antígenos plaquetarios humanos HPA son las porciones polimórficas de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria, capaces de generar una respuesta inmune. Históricamente los antígenos plaquetarios específicos fueron llamados con el nombre de los pacientes sensibilizados de quienes se obtuvieron los antisueros específicos que los definían. Esta nomenclatura se tornó confusa debido al descubrimiento independiente de un mismo antígeno por diferentes grupos de investigadores, sumado a cierto grado de controversia con respecto a la prioridad en la asignación de los nombres. Ahora para facilitar su comprensión se los agrupa en 6 sistemas principales aun siendo 24 antígenos plaquetarios humanos específicos.

El interés principal de investigarlos surgió de la observación de los cuadros clínicos secundarios a la aloinmunización: la trombocitopenia feto-neonatal aloinmune, la púrpura trombocitopénica post-transfusional, la trombocitopenia pasiva postransfusional, la trombocitopenia asociada al trasplante y la refractariedad a la transfusión de plaquetas y actualmente la relación de estos polimorfismos asociados a cuadros hemorrágicos y trombóticos (infarto de miocardio, enfermedad coronaria arterial, Trombocitopenia inmune, etc).

Dentro de los sistemas HPA coexisten más de 12 polimorfismos bi-alelicos y debido a estos polimorfismos, las glicoproteínas de la membrana plaquetaria pueden ser reconocida como aloantígenos causando ciertas patologías aloinmunes ya descritas. Por otra parte, la presencia de estos haplotipos tiene diferencias con población mexicana en comparación con algunas poblaciones estudiadas en el mundo, especialmente en población asiática.

En estudios europeos como; Finlandia se analizaron antígenos plaquetarios humanos HPA 1, 2, 3, 5 y 6b en 200 sujetos sanos y la frecuencia del alelo HPA-5B fue del 10 % lo que es inferior en finlandeses de áreas centrales o que en poblaciones de Europa de Sur que es del 20-30 %. El HPA-6b fue observada en 3 de 127 individuos de Finlandia del sureste (el 2.4 %), que sugiere que la frecuencia de este alelo en Finlandia sea más alta de lo que se pensaba ya que en la mayoría de las poblaciones del mundo no ha sido descrito por su total ausencia. Por otra parte, en Macedonia<sup>25</sup> Las frecuencias alélicas fueron 0.865 para HPA-1A, 0.135 para HPA-1B, 0.852 para HPA-2A, 0.148 para HPA-2B, 0.578 para HPA-3A, 0.422 para HPA-3B, 0.909 para HPA-5A, y 0.091 para HPA-5B. La población macedonia mostró la frecuencia más alta para el alelo HPA-2B (0.148) entre la población europea ya estudiada.

Un estudio asiático reciente, en población de Malasia<sup>28</sup> efectuó un análisis de diferentes poblaciones asiáticas y mostró que sólo HPA-4 tuvo una diferencia significativa y fue limitada a la población de malayos. Sin embargo, no es relevante porque el alelo HPA-4B está presente en una frecuencia sumamente baja, resulta interesante que el alelo HPA-4B, comúnmente asociado a japonés y coreanos, haya sido encontrado en la región continental de China e India, pero no ha sido observado en otras poblaciones Asiáticas "Sureste de Asia" como en Indonesia, Vietnam, y Tailandia. Probablemente el HPA-4B ha sido introducido genéticamente a la población malaya por la adición con otros grupos étnicos, por lo que todavía no se halla en frecuencias significativas altas.

La mayor parte de los casos de aloinmunización plaquetaria contra HPA-4 han sido informados en Japón debido a anti-HPA-4b. Aparte de HPA-4B, el HPA-6b ha sido reportado como alelo exclusivo de la población asiática.

El alelo "b" generalmente ocurría en frecuencias bajas (<0.1) en todos los sistemas HPA registrados, excepto HPA-1, 3 y 15. La frecuencia del alelo HPA-1b en indios era

considerablemente más alta que en malayos y chinos. Las frecuencias alélicas de los sistemas HPA-2 y -5 en las poblaciones de origen africano muestran que el alelo "b" de estos dos sistemas es más alto en comparación con otras poblaciones en el mundo entero. Las frecuencias inferiores de estos alelos han sido relatadas en europeos y Asiáticos. Por lo que se concluye en este estudio que las frecuencias de las poblaciones ya no son exclusivas de cada raza o poblaciones puras gracias a la intensa mezcla por la migración poblacional. El análisis de este estudio mostró resultados sorprendentes que no fueron descritos para HPA-6 ya que no se dispone información suficiente para muchas de las poblaciones estudiadas. La descripción de los sistemas HPA revela la gran utilidad del conocimiento de los polimorfismos HPA para marcar identidades y características demográficas.

Otro estudio en 593 individuos que pertenecen a todos los grupos étnicos de Paquistán<sup>26</sup>, los resultados del análisis de HPA-1, 2, 3, 4, 5 y 15 fueron así: HPA-1A/B, 0.885/0.115, HPA-2A/B, 0.92/0.08, HPA-3A/B, 0.69/0.31, HPA-4A/B, 1/0, HPA-5A/B, 0.9/0.1, HPA-15A/B, 0.59/0.41. Excepto la diferencia significativa en cuanto a la frecuencia génica de HPA-3 entre Pathans y Sindhis, no había ninguna diferencia significativa de HPA1 a 5 y 15 entre los grupos principales étnicos de Paquistán.

En otro estudio realizado en India<sup>27</sup> con 1164 personas que pertenecen a diversos grupos de población fueron estudiados para la distribución de frecuencias. Se encontró que el genotipo HPA-1b/1b era significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo de población Parsi y Vatalia grupo de población Prajapati, en comparación con Maharashtrians. Distribución de frecuencias de HPA-1b en estas poblaciones resultó ser ligeramente inferior a la registrada en algunas poblaciones occidentales.

En el medio oriente, se estudió población libanesa<sup>29</sup> para identificar las frecuencias genotípicas de HPA-1 por primera vez y evaluar la prevalencia del alelo 1a y 1b en individuos sanos libaneses y compararlo con la literatura internacional. De varios sistemas clasificados los sistemas HPA, (HPA-1) específicamente han sido considerados como el sistema antigénico más importante implicado en la población caucásica. Este gen específico nunca ha sido investigado en nuestra población hasta la realización de este artículo. Se observó que el genotipo 1a/1a fue la más frecuente (65,85%), seguido de 1a/1b (30,24%) y 1b/1b (3,91%), con frecuencias alélicas para 1a y 1b de 0,81 y 0,19, respectivamente. En comparación con otros grupos étnicos, la población libanesa muestra alta prevalencia de la HPA-1b, que puede predisponer a un mayor riesgo de aloinmunización.

En Australia<sup>30</sup> un estudio efectuado en 185 aborígenes australianos y 1000 donantes de sangre de Australia Occidental se compararon las frecuencias de los alelos de HPA-1, -2, -3 y -5 mostraron diferencias significativas entre los aborígenes y occidentales australianos ( $P < 0,001$ ). En particular, la frecuencia de HPA-3b (0,068) en los aborígenes australianos, a partir de este estudio, fue uno de los más bajos reportados, mientras que la frecuencia de HPA-5b (0,246) fue uno de los más altos para este alelo. Este estudio confirma diferencias significativas en la distribución de HPA entre los aborígenes australianos, los donantes de sangre australianos y de otros grupos raciales. Estos resultados indican un mayor riesgo de aloinmunización a HPA-1, -2 y -3 en los aborígenes australianos que reciben una transfusión de una población de donantes de sangre caucásica, lo que tiene implicaciones prácticas para los riesgos de la transfusión y el embarazo, en personas de origen indígena.

En Francia<sup>31</sup> una revisión describe las frecuencias de HPA-1 y HPA-5 en 800 donantes de

plaquetas en una y 350 para los sistemas HPA HPA-2 y 3. Los resultados son muy similares a los que actualmente se publica en las frecuencias de la población de raza blanca. Las bajas prevalencias se observan para el HPA-1b, (2%), HPA-2b (0,6%) y HPA-5b (2%) .

Las frecuencias de los alelos de los sistemas HPA-3 y HPA-5 se determinaron para cinco poblaciones amerindias de América del Sur<sup>32</sup> y se compararon con los obtenidos para los afro-americanos, japoneses y blancos de Brasil<sup>23</sup>. La frecuencia del alelo HPA-3a entre los amerindios como un grupo no difieren de los valores obtenidos para las otras poblaciones. Sin embargo, se observaron diferencias entre los amerindios, que van desde 0,27 hasta 0,75, la frecuencia más alta hasta ahora observada en una población de origen asiático. Sólo el alelo HPA-5a se encontró entre los 130 cromosomas amerindias.

En varias poblaciones estudiadas alrededor del mundo se han encontrado diferencias importantes en las frecuencias de algunos antígenos plaquetarios específicos. En el caso de México, cuya población es un mosaico debido a la existencia de múltiples etnias indígenas, así como un gran mestizaje, esto aunado a la migración población de las regiones rurales a las urbanas. Estas poblaciones pueden presentar diferencias en las frecuencias HPA, por lo cual hay una particularidad de HPA por cada población estudiada, como en el caso de los sistemas 3 y 15 que prevalecen en nuestra población mexicana, comparada con europeos y más con orientales donde el HPA 4 y 6 son casi exclusivos de su población. Así mismo no hay gran diferencia con negros, amerindios y otras poblaciones europeas donde los alelos "b" son menos frecuentes para los demás sistemas HPA 1,2,4 y 5.

En conclusión la frecuencia de alelos "b" en todos los sujetos analizados en este estudio es **baja** en comparación con los Asiaticos en especial Japoneses ya que el sistema HPA 1b y HPA 4b son casi exclusivos de su población con diferencia a chinos, indios y coreanos que la presentación alélica "b" es rara. También se encontró una baja proporción de alelos "b" en los sistemas HPA 1, 2, y 5 en franceses, no así en australianos y macedonios con alta frecuencias de HPA2b y HPA 5b.

En Mexico hay diferencia significativa entre los sistemas HPA1,2,4,5 en comparación con HPA 3 y 15 en relación a la frecuencia de alelos "b" ya que este esta fuertemente expresado en mas del 30 % de la población estudiada y marcando la diferencia con población Australiana que tiene el índice mas bajo de presentación del sistema HPA3 b en el mundo hasta ahora descrito.

Una relación importante entre caucásicos y Mexicanos es la similitud que se encuentra en la expresión de los alelos en los sistemas HPA1a y en HPA15 a/15b en la mayoría de las poblaciones estudiadas y además tiene importancia clínica ya que el HPA1a esta fuertemente relacionado con la Trombocitopenia neonatal aloinmune.

La relación con estudios Sudamericanos en poblaciones Amerindias nos muestra que la presencia de HPA2b es realmente baja casi ausente ya que en nuestra población de estudio en 50 sujetos solo 1 expreso este alelo, por lo que la correlación con la literatura es acertada. Y la afirmación de la presencia de HPA 5 con prevalencia de casi el 100% del alelo "a" es aplicada a toda la población. Los resultados hallados para los sistemas HPA en la población Mexicana son coherentes con los estudios realizados sobre otras poblaciones amerindias. La ausencia de los alelos "b" en HPA 1, 2, 4, 5 es una característica de esta población así como la mayor frecuencia de genotipo 3<sup>a</sup>/3b y 15<sup>a</sup>/15b

en 50% de la población estudiada.

Finalmente la frecuencia que se presenta con respecto a ciertos antígenos es la esperada en comparación con poblaciones similares y gracias a estas determinaciones se podría construir una base para búsqueda de productos sanguíneos compatibles en individuos sensibilizados o con genotipos raros.

Para prevenir la aloinmunización de plaquetas humanas, los Centros de Transfusión Sanguínea tiene que desarrollar una estrategia una de estas es la tipificación HPA de los donantes con un método preciso. Además, este estudio confirma la necesidad de registrar a los donantes y receptores en el sistema HPA-1 al menos, en el caso de púrpura después de la transfusión de plaquetas y la refractariedad al tratamiento con transfusión de plaquetas, en México HPA1 (1b) representa el 10% de los sujetos estudiados.

Esta información puede servir como inicio para la futura investigación clínica asociada con alteración de las plaquetas y también formar la base de un banco de datos sobre polimorfismos.

## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- 1.- Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet- vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6 (3): 653-90.
- 2.- Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol* 2002;10:165-81.
- 3.- Metcalfe, P., Watkins, N. A., Ouwehand, W. H., Kaplan, C., Newman, P., Kekomaki, R., De Haas, M., Aster, R., Shibata, Y., Smith, J., Kiefel, V. and Santoso, S. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003;85:240–245.
- 4.-Mueller-Eckhardt G, Hauck M, Kayser W, Mueller-Eckhardt C. HLA–C antigens on platelets. *Tissue Antigens* 1980;16(1):91-4.
- 5.-Saito S, Ota S, Seshimo H, et al. Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion* 2002;42 (3): 302-8.
- 6.-Halle L. Platelet alloantigenic systems. *Transfus Clin Biol* 1998; 5 (5): 362-5.
- 7.-Von dem Borne AE, Decary F. ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang* 1990; 58 (2): 176.
- 8.-Von dem Borne AE, Decary F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Hum Immunol* 1990;29(1):1-2.
- 9.-Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang* 1998;74 (Suppl 2):249-53.
- 10.-Lucas GF, Metcalfe P. Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms. *Transfus Med* 2000;10 (3):157-74.
- 11.-Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, et al. A tyrosine 703 serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99 (5):1692-8.
- 12.-National Institute for Biological Standards and Control: [http:// www.nibsc.ac.uk](http://www.nibsc.ac.uk) (under Haematology Division).
- 13.-Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang*. 2004;87:1 (82-6).
- 14.-Garner SF, Smethurst PA, Merieux Y, et al. A rapid one-stage whole-blood HPA-1a phenotyping assay using a recombinant monoclonal IgG1 anti-HPA-1a. *Br J Haematol* 2000; 108 (2): 440-7.
- 15.-Garner SF, Smethurst PA, Merieux Y, et al. A rapid one-stage whole-blood HPA-1a phenotyping assay using a recombinant monoclonal IgG1 anti-HPA-1a. *Br J Haematol* 2000; 108 (2):440-7.

- 16.-Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet- vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol* 1993;6(3):653-90.
- 17.-Stratton J, Ballem P, Gernsheimer T, et al. Platelet destruction in autoimmune thrombocytopenic purpura: kinetics and clearance of indium-111-labeled autologous platelets. *J Nucl Med* 1989;30(5):629 -37.
- 18.-Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, et al. Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. *Immune Thrombocytopenia Working Group. Blood* 1997; 89(12): 4402-6.
- 19.-Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363-6.
- 20.-Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, et al. HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol* 1991;78(3):425-9.
- 21.-Vanderpuye OA, Labarrere CA, McIntyre JA. A vitronectin-receptor-related molecule in human placental brush border membranes. *Biochem J* 1991;280:9-17.
- 22.-Warkentin TE, Smith JW, Hayward CP, et al. Thrombocytopenia caused by passive transfusion of anti-glycoprotein Ia/IIa alloantibody (anti-HPA-5b). *Blood* 1992;79(9):2480-4.
- 23.- Covas DT , Biscaro TA , Nasciutti DC , Guerreiro JF , SE Santos , MA Zago . Las frecuencias génicas de la HPA-3 y HPA-5 alelos de antígenos plaquetarios entre los amerindios. *Vox Sang* 2000;65(2):128-31.
- 24.- S. Kekomäki, J. Partanen, R. Kekomäki\* Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Tissue Antigens* 2008;5(3)193-198.
- 25.-Pavkovic M, Petlichkovski A, Strezova A, Arsov T, Trajkov D, Spiroski M. Gene frequencies of human platelet antigens in the Macedonian population. *Tissue Antigens*. 2006;67(3):241-6.
- 26.-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*. 2010;20(2):78-87.
- 27.-Kulkarni B , Mohanty D , K Ghosh . Distribution of frequencies of the antigens plaquetarios in Indian population *Transfusión* 2010;17859:178- 83.
- 28.-Tan JY, Lian LH, Nadarajan VS.Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population. *Blood Transfus*. 2012;10(3):368-76.
- 29.-Sabbagh , Taher AT , Zaatari GS , Mahfouz RA . The frecuencias génicas of the alelos of antigens HPA-1 platelets in the Lebanese population *Blood Transfus* 2007; 17 (6) :473-8.

30.-Bennett JA , Palmer LJ , Musk AW , WN Erber . The genetic frequencies of human antigens plaquetarios 1-5 in the Australian aborigens in Western Australia. Spanish company of blood transfusión 2002;12(3):199-203.

31.-Y Mérieux , Debost M , Bernaud J , A Raffin , Meyer F , D Rigal Human frequencies of antigens plaquetarios of the donors of platelets in the French population it determined by means of the chain reaction of polymerase with specific powder-horns of sequence. Pathol Biol 1997;45(9):697-700.

32.-Castro V, AF Origa, JM Annichino-Bizzacchi, M Soares, RC Menezes, MS Gonçalves, FF Costa, VR Arruda. The frequencies of the platelets specific aloantígeno systems of 1-5 in three ethnic groups in Brazil. Vox Sang 1999;26(5):355-60.