



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA "ISIDRO ESPINOSA
DE LOS REYES"

*"GENOTIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS EN
PAREJAS CON PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE"*

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P R E S E N T A:

IBT. ISIDRO ALEMÁN ÁVILA

ASESOR:
DR. HÉCTOR ALFREDO BAPTISTA GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado asignado:

Presidente EBC. Lina Romero Guzmán (INP)

Vocal MASS. Eva Calderón Garcidueñas (FQ)

Secretario Dr. Héctor Alfredo Baptista González (INPer)

1^{er} Suplente Dra. Rocío Trueba Gómez (INPer)

2^o Suplente Dra. Fany Rosenfeld Mann (INPer)

Este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer), en la Coordinación de Hematología Perinatal

Asesor del Tema: _____

Dr. Héctor Alfredo Baptista González.

Sustentante: _____

IBT. Isidro Alemán Ávila.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes participaron junto conmigo en diversas formas en la realización de este proyecto, mi mayor agradecimiento a Dr. Héctor Alfredo Baptista González, Dra. Fany Rosenfeld Mann, Dra. Rocío Trueba Gómez, Dra. Patricia Bouchan, Dr. Octavio Martínez, Biol. Georgina Coeto y Dr. Higinio Estrada por darme la oportunidad de trabajar con ellos y haber cumplido con el objetivo primordial de este proyecto.

Mi infinita gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de desarrollarme académica y personalmente

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) por ser el canal importante en el desarrollo de este proyecto

DEDICATORIAS

“El universo dentro de ti”

Isidro Alemán

A mis padres (Luis e Inés), a los cuales los recuerdo con mucho amor, a mis hermanas: Sara, Juana, Teresa, Guadalupe, así como también a mis sobrinos que a pesar de las circunstancias hemos salido adelante

A mis amigos: Daniel Jiménez, Luis Soltero, Antonio Soto, Alma Pérez, Rogelio Guzmán; quienes han estado conmigo durante el camino para perseguir el éxito y el siguiente objetivo personal

ÍNDICE

I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
Pérdida Gestacional Recurrente.....	10
Plaquetas	10
Antígenos plaquetarios.....	11
Antígenos plaquetarios no específicos.....	13
Antígenos plaquetarios específicos.....	13
Aloinmunización	15
Factores del antígeno (Inmunogenicidad).....	16
Factores del individuo respondedor	16
Implicaciones clínicas de los polimorfismos HPA	17
Asociadas a la aloinmunización.....	17
Trombocitopenia Feto-Neonatal Aloinmune	17
Tipificación antígenos plaquetarios humanos HPA.....	19
Fenotipificación serológica	19
Genotipificación.....	19
PCR – Cebador Secuencia Específica (SSP)	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS EXPLORATORIA	21
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Materiales	23
6.2 Métodos	24
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
IX. CONCLUSIONES	39
X. BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas clave en la megacariopoesis.	11
Figura 2. Receptores plaquetarios.	12
Figura 3. Espectrofotómetro ACTGene ASP-3700.	24
Figura 4. Equipo de electroforesis Horizon 58, Whatman.	25
Figura 5. Fuente de poder para electroforesis Bio Rad.	25
Figura 6. Analizador de Imágenes Alpha Innotech.	25
Figura 7. Diagrama de flujo del trabajo.	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de Antígenos Plaquetarios Humanos HPA.	15
Tabla 2. Alelos involucrados en cuadros clínicos de aloinmunización.	18
Tabla 3. Condiciones de amplificación.	26
Tabla 4. Frecuencia genotípica y alélica de los sistemas HPA y equilibrio de Hardy-Weinber en población estudiada.	30
Tabla 5. Frecuencias alélicas para los sistemas HPA entre Mujeres y su Cónyuge.	31
Tabla 6. Alelos de riesgo presentados en la población del INPer y su nivel de riesgo.	32
Tabla 7. Frecuencias alélicas HPA en la población estudiada del INPer, comparada con algunas otras poblaciones	37

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
bp	Par de bases (base pair)
GP	Glicoproteína
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos (Human Leukocyte Antigen)
HPA	Antígenos Plaquetarios Humanos (Human Platelet Antigen)
kDa	Kilodalton
ml	Mililitros
μl	Microlitro
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCR-SSP	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Cebador Secuencia Específica
PGR	Pérdida Gestacional Recurrente
TFNA	Trombocitopenia Feto-Neonatal Aloinmune
PTP	Púrpura Trombocitopénica Post-Transfusional
TPP	Trombocitopenia Pasiva Post-Transfusional
RTP	Refractariedad a la Transfusión de Plaquetas

I. RESUMEN

Introducción. La etiología no reconocible de la pérdida gestacional recurrente (PGR) afecta al 41-59 % de las parejas. Se ha propuesto como posible factor etiológico a la aloinmunización materna por incompatibilidad entre antígenos plaquetarios humanos (HPA). No existe información disponible sobre la distribución de los alelos de HPA en parejas con PGR. **Objetivo.** Determinar la incompatibilidad existente en los alelos de los antígenos plaquetarios de alto riesgo en parejas con Pérdida Gestacional Recurrente. **Material y Métodos.** Estudio transversal exploratorio de muestras biológicas de parejas con antecedente de PGR de causa no identificada. Se analizaron 16 alelos de los antígenos plaquetarios mediante PCR-SSP. **Resultados** Se incluyeron 15 parejas con PGR, las frecuencias genotípicas encontradas fueron HPA-1, 2, 5 y 6 homocigotos para el alelo “a”, 0.933, 0.800, 0.766 y 0.833, respectivamente. HPA-3, 4, 9 y 15 heterocigotos 0.500, 0.533, 0.433 y 0.466. HPA-3 y 15 homocigotos para el alelo “b” 0.200 y 0.166. El alelo “a” se presentó con mayor frecuencia para HPA-1, 2, 5 y 6, 0.967, 0.900, 0.883 y 0.917, respectivamente. La menor frecuencia para el alelo “b” fue HPA-1 y HPA-6 0.033 y 0.083. Se encontraron tres parejas de nulo riesgo, seis de bajo riesgo y seis de alto riesgo. **Conclusiones:** Las frecuencias de los antígenos HPA en la población estudiada son similares a las reportadas con excepción de HPA 4, HPA 9 y HPA 15. El 0.8 de las parejas estudiadas presentó incompatibilidad para los antígenos HPA. **Palabras clave:** Pérdida Gestacional Recurrente, Trombocitopenia Feto-Neonatal Aloinmune, Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA), PCR-SSP.

II. INTRODUCCIÓN

Pérdida Gestacional Recurrente

La pérdida gestacional recurrente (PGR) se define como tres o más pérdidas consecutivas del embarazo, incluye pérdidas pre-embrionaria, embrionaria, fetal y neonatal temprana, afecta aproximadamente al 2% de las mujeres en edad reproductiva y representa un problema clínico difícil en la práctica obstétrica.¹

Algunas de las teorías propuestas para explicar la PGR son anomalías en la vasculatura placentaria^{2, 3} y algunos desordenes hemostáticos que causan disfunción placentaria.^{4, 5}

Entre el 41 y 59 % de las parejas con PGR se desconoce la causa y se piensa que la causa del rechazo al feto sea de origen inmunológico y se ha propuesto como factor etiológico la aloinmunización materna por incompatibilidad entre antígenos plaquetarios humanos (HPA), los cuales se pueden detectar a partir de la semana 6 de gestación^{6, 7} y están totalmente expresados en la semana 18 de gestación^{8, 9}.

Plaquetas

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas derivados de la fragmentación de sus precursores: los megacariocitos (**Figura 1**). Las plaquetas no tienen DNA genómico, pero contienen RNA mensajero (RNAm) derivado de los megacariocitos, tienen una forma de disco biconvexo de 2–3 µm de diámetro, normalmente dos tercios de la masa plaquetaria circulan en sangre periférica con recuentos entre 150 a 450 x 10⁹ / L y en grupos pediátricos los valores normales son entre 100 a 450 x 10⁹ / L. El

tercio restante se encuentra en el bazo y el hígado, los cuales se encargan de retirar a la mayoría de las plaquetas después de su senescencia, aunque una pequeña fracción se elimina constantemente como resultado de su participación en el mantenimiento de la integridad vascular, la vida media de las plaquetas es entre 7 y 10 días.¹⁰

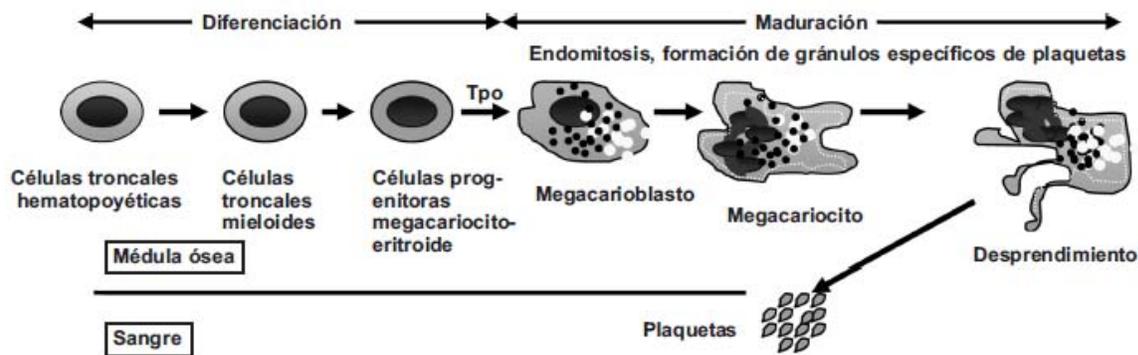


Figura 1. Etapas clave en la megacariopoesis.¹¹

Las células troncales hematopoyéticas se diferencian en megacariocitos mediante la acción de la trombopoyetina (Tpo). En la maduración de los megacariocitos tiene lugar un proceso de endomitosis, duplicación nuclear sin división celular, que genera DNA ploide. En la médula, los megacariocitos desprenden grandes segmentos de citoplasma a la circulación.

Antígenos plaquetarios

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) son las porciones polimórficas de las glicoproteínas (GP) de la membrana plaquetaria, capaces de generar una respuesta inmune en individuos susceptibles al ser expuestos durante el embarazo, transfusión y trasplante. A pesar del gran número de glicoproteínas descritas en la membrana

plaquetaria, los HPA se localizan en algunas de ellas, principalmente en los complejos GP IIb/IIIa, GP Ib/IX/V, GP Ia/IIa y en el CD109 (**Figura 2**).

Los antígenos plaquetarios son estructuras capaces de interactuar con receptores de linfocitos y macrófagos para despertar una respuesta inmune (immunogenicidad) 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 son aloantígenos.

El interés del estudio de los antígenos plaquetarios, radica en su importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en los cuadros clínicos asociados a la aloinmunización. Estos son, la trombocitopenia feto-neonatal aloinmune (TFNA), la púrpura trombocitopénica postransfusional (PTP), la trombocitopenia pasiva postransfusional (TPP), y la refractariedad a la transfusión de plaquetas (RTP).

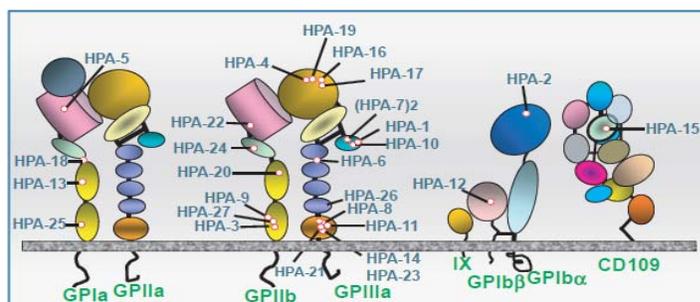


Figura 2. Receptores plaquetarios

Representación de los complejos glicoprotéicos plaquetarios GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP Ib/IX y CD 109, y los lugares previstos de los 27 diferentes HPA'S¹²

Es útil diferenciar 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 los últimos, son responsables casi excluyentes del resto de los cuadros.^{12, 13}

Antígenos plaquetarios no específicos

Entre los antígenos no específicos de la plaqueta se encuentran los glicoconjugados de los sistemas de grupo sanguíneo ABO, H, P, I, Lewis y los de HLA clase I.^{12, 14}

Antígenos plaquetarios específicos

Se conocen 24 antígenos plaquetarios específicos definidos por sus correspondientes anticuerpos humanos, de los cuales 12 se hallan agrupados en seis sistemas bialélicos. Para los 12 antígenos restantes, se cuenta únicamente con los anticuerpos que los definen pero no para su correspondiente antitético. Estos antígenos se heredan de manera autosómica co-dominante.^{15, 13} 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.¹⁶

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. 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, acrónimo del inglés Human Platelet Antigens (antígenos plaquetarios humanos), el cual fue revisado en 1998 por Santoso, Kiefel y recientemente por Metcalfe.

Los sistemas HPA han sido designados cronológicamente (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5....) siguiendo el orden de la fecha de su descubrimiento, y se ordenan en “a” de alta frecuencia y “b” de baja frecuencia. Una designación “w” es agregada después del nombre del antígeno si aún no se conoce un anticuerpo contra el antígeno antitético¹⁷ (**Tabla 1**).

Tabla 1. Sistema de Antígenos Plaquetarios Humanos . 24

Sistema	Antígeno	Sinónimos	Glicoproteína	HGNC*	CD*	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw ^a , P1 ^{A1} Zw ^b , P1 ^{A2}	GPIIIa	ITGB3	CD61	T ¹⁹⁶ C ¹⁹⁶	Leucina ³³ Prolina ³³
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko ^b , Ko ^a , Sib ^a	GPIIb	GP1BA	CD42b	C ⁵²⁴ T ⁵²⁴	Treonina ¹⁴⁵ Metionina ¹⁴⁵
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak ^a , Lek ^a Bak ^b	GPIIb	ITGA2B	CD41	T ²⁶²² G ²⁶²²	Isoleucina ⁸⁴³ Serina ⁸⁴³
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b , Pen ^a Yuk ^a , Pen ^b	GPIIIa	ITGB3	CD61	G ⁵²⁶ A ⁵²⁶	Arginina ¹⁴³ Glutamina ¹⁴³
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br ^b , Zav ^b Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	GPIa	ITGA2	CD49b	G ¹⁶⁴⁸ A ¹⁶⁴⁸	Acido glutámico ⁵⁰⁵ Lisina ⁵⁰⁵
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	G ¹⁵⁶⁴ A ¹⁵⁶⁴	Arginina ⁴⁸⁹ Glutamina ⁴⁸⁹
	HPA-7bw	Mo ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	C ¹²⁶⁷ G ¹²⁶⁷	Prolina ⁴⁰⁷ Alanina ⁴⁰⁷
	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	C ²⁰⁰⁴ T ²⁰⁰⁴	Arginina ⁶³⁶ Cisteína ⁶³⁶
	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	ITGA2B	CD41	G ²⁶⁰³ A ²⁶⁰³	Valina ⁸³⁷ Metionina ⁸³⁷
	HPA-10bw	La ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	G ²⁸¹ A ²⁸¹	Arginina ⁶² Glutamina ⁶²
	HPA-11bw	Gro ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	G ¹⁹⁹⁶ A ¹⁹⁹⁶	Arginina ⁶³³ Histidina ⁶³³
	HPA-12bw	Iy ^a	GPIIb β	GP1BB	CD42c	G ¹⁴¹ A ¹⁴¹	Glicina ¹⁵ Acido glutámico ¹⁵
	HPA-13bw	Sit ^a	GPIa	ITGA2	CD49b	C ²⁵³¹ T ²⁵³¹	Treonina ⁷⁹⁹ Metionina ⁷⁹⁹
	HPA-14bw	Oe ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	AAG ¹⁹²⁹⁻³¹ delección	Lisina ⁶¹¹ Δ Lisina ⁶¹¹
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	Gov ^b Gov ^a	CD109	CD109	CD109	C ²¹⁰⁸ A ²¹⁰⁸	Serina ⁷⁰³ Tirosina ⁷⁰³
	HPA-16bw	Duv ^a	GPIIIa	ITGB3	CD61	C ⁵¹⁷ T ⁵¹⁷	Treonina ¹⁴⁰ Isoleucina ¹⁴⁰

*HGNC: El comité en nomenclatura génica de la organización genoma humano, por sus siglas en inglés The Human Genome Organization (HUGO), *CD: Agrupación de Diferenciación

Aloinmunización

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 los individuos, la aloinmunización no puede ocurrir. Esta incompatibilidad potencial, es necesaria pero no suficiente, ya que sólo una proporción de estos

individuos se aloinmuniza.¹⁸ los factores condicionantes que intervienen en la aloinmunización son:

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.

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 aloinmunizarse o predecir el número de exposiciones antigénicas necesarias para estimular efectivamente la producción de anticuerpos anti-HPA.

En la fase de aloinmunización, la embarazada genera anticuerpos contra antígenos heredados del padre, presentes en las células sanguíneas fetales. Los anticuerpos maternos de la clase IgG atraviesan la barrera placentaria, por pinocitosis de las

células del sincitiotrofoblasto, opsonizan las células fetales poseedoras del antígeno, facilitando así su destrucción por fagocitosis o lisis por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por los macrófagos esplénicos del feto.¹⁹

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 GP IIb/IIIa, GP Ib/IX/V, GP Ia/IIa y CD 109.

Trombocitopenia Feto-Neonatal Aloinmune

La trombocitopenia feto-neonatal aloinmune (TFNA), es considerada en la actualidad la causa más común de trombocitopenia grave en el feto y neonato con una frecuencia aproximada 1 caso por 1000 recién nacidos. El diagnóstico suele hacerse después del nacimiento y del descubrimiento inesperado de trombocitopenia neonatal grave, que generalmente se identifica por los signos de sangrado, tales como petequias y

equimosis, o más grave, hemorragia intracraneal. Es definida por recuentos plaquetarios en el feto/neonato menores a $100 \times 10^9/L$ y los casos severos con recuentos de menos de $50 \times 10^9/L$.²⁸

Muchos tipos de antígenos plaquetarios humanos se han descrito, pero más del 80% de los casos de Trombocitopenia feto-neonatal aloinmune tienen especificidad contra HPA-1a, seguida de HPA-5b (10%) y otros menos frecuentes.²⁰

En caucásicos el 95% de los casos son debidos a aloinmunización contra los antígenos HPA-1a y HPA-5b, estos son menos prevalentes en orientales y la aloinmunización ocurre principalmente asociada a HPA-4b y HPA-5b. 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

Entre los pacientes con refractariedad a la transfusión de plaquetas se han asociado los anti-HPA-1a y anti-HPA-5b, mientras que en pacientes con púrpura post-transfusional los más comunes son anti-HPA-1a, HPA-3a, y HPA-3b^{21, 26, 27} (**Tabla 2**).

Tabla 2. Alelos involucrados en cuadros clínicos de aloinmunización.²⁶

Cuadros clínicos	Alelos involucrados
Trombocitopenia feto-neonatal aloinmune	HPA-1a, HPA-5b, HPA-15 a/b
Refractariedad a la transfusión de plaquetas	HPA-1a, HPA-5b
Púrpura post-transfusional	HPA-1a, HPA-3a y HPA-3b

Tipificación antígenos plaquetarios humanos HPA

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 con trombocitopenia. 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”^{22, 23, 24}

Genotipificación

La genotipificación HPA se realiza con DNA genómico obtenido de cualquier material celular, utilizando reactivos disponibles comercialmente. Esta se realiza por caracterización de los SNPs.²⁴

PCR – Cebador Secuencia Específica (SSP)

La reacción en cadena de la polimerasa cebador secuencia específica (PCR-SSP), se basa en la capacidad de la *Taq* DNA polimerasa en amplificar regiones específicas de los alelos presentes. Sin embargo, cuando el nucleótido del extremo 3' del cebador no se aparee, la amplificación no ocurrirá o lo hará con una eficiencia muy baja.²⁵

III. JUSTIFICACIÓN

Este estudio permitirá explorar si existen incompatibilidades de alto riesgo que pudieran explicar la pérdida gestacional recurrente y poder proponer futuras intervenciones diagnósticas y terapéuticas a estas parejas.

IV. HIPÓTESIS EXPLORATORIA

Las parejas con Pérdida Gestacional Recurrente tienen mayor frecuencia de incompatibilidad en los alelos plaquetarios de alto riesgo.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la incompatibilidad existente en los alelos de los antígenos plaquetarios de alto riesgo en parejas con pérdida gestacional recurrente.

5.2 Objetivos particulares

Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los antígenos plaquetarios en mujeres con pérdida gestacional recurrente y su cónyuge.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Observacional y estudio piloto

Tipo de diseño

Transversal exploratorio

Presentación de los resultados

Se presenta en tablas

6.1 Materiales

Aspectos éticos y obtención de muestras biológicas

Las muestras de DNA se obtuvieron de un repositorio existente en el laboratorio de hematología perinatal del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), de pacientes mujeres con pérdida gestacional recurrente (PGR) y su cónyuge. Que derivan del protocolo número, 212250-07211, “Estudio molecular y fenotípico del grupo sanguíneo RhD en parejas con mujeres RhD negativas rama clínica”.

Criterios de selección

Inclusión Muestras de DNA de mujeres con PGR sin causa identificada, que se cuente con muestra de DNA de su cónyuge y que acudieron al servicio de Hematología Perinatal del INPer.

Exclusión Muestras de DNA de mujeres con PGR con causa identificada. Muestras de DNA de mujeres con PGR que NO se cuente con muestra de DNA de su cónyuge.

Eliminación Muestras de DNA que no cumplieron los criterios analíticos necesarios para realizar PCR-SSP. Muestras de DNA no trazables.

6.2 Métodos

Cuantificación de DNA

La concentración de DNA se determinó mediante espectrofotometría en el equipo ACTGene ASP-3700 (**Figura 3**) a una longitud de 260 nm, la pureza se determinó con el uso de la relación 260/280 nm y 260/230 nm, considerando los valores de 1.8 y 1.5 respectivamente, la recolección de datos se hizo mediante el uso del programa ASP-3700.



Figura 3. Espectrofotómetro ACTGene ASP-3700

Evaluación de la integridad del DNA

Se realizó un corrimiento electroforético de las muestras del DNA en gel de agarosa al 2% revelado con Midori Green Advanced DNA Stain con un marcador de peso molecular de Roche XVI (100-2600 pb) (**Figuras 4 y 5**). Los geles se observaron en el analizado de imágenes Alpha Innotech a 320 nm (**Figura 6**).



Figura 4. Equipo de electroforesis Horizon 58 Whatman



Figura 5. Fuente de poder para electroforesis Bio Rad



Figura 6. Analizador de Imágenes Alpha Innotech

Genotipificación de antígenos plaquetarios

Se utilizó el ensayo comercial HPA-Ready Gene Plus inno-train Diagnostik GMBH, que permite la detección de los alelos HPA-1 a/b, HPA-2 a/b, HPA-3 a/b, HPA-4 a/b, HPA-5 a/b, HPA-6 a/b, HPA-9 a/b y HPA-15 a/b mediante PCR-SSP.

En cada tubo de reacción se incluyen un par de cebadores alelo específico y cebador para el gen de la hormona de crecimiento como control interno (434 pb).

- La preparación de la mezcla de reacción lleva:
 - 120 µl de agua grado PCR,
 - 60 µl de Ready PCR
 - 1.6 µl de Taq polimerasa
 - 20 µl de muestra de DNA
- Mezclar perfectamente
- Dispensar 10 µl de DNA de cada paciente y colocarlos en los pozos.

Las condiciones de amplificación se muestran en la **(Tabla 3)**.

Tabla 3. Condiciones de amplificación.

Activación	5 ciclos	10 ciclos	20 ciclos	Extensión	Enfriamiento
94°C 2 min	94°C 20 sec 70°C 60 sec	94°C 20 sec 65°C 60 sec 72°C 45 sec	94°C 20 sec 61°C 50 sec 72°C 45 sec	72°C 5 min	10°C -

Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con Midori Green Advanced DNA Stain. Se utilizó el marcador de peso molecular DNA E-Ladder GTi Diagnostics cat. # ELADDER (50-600 pb)

Los productos se fotodocumentaron en el Analizador de Imágenes Alpha Innotech **(Figura 6)**.

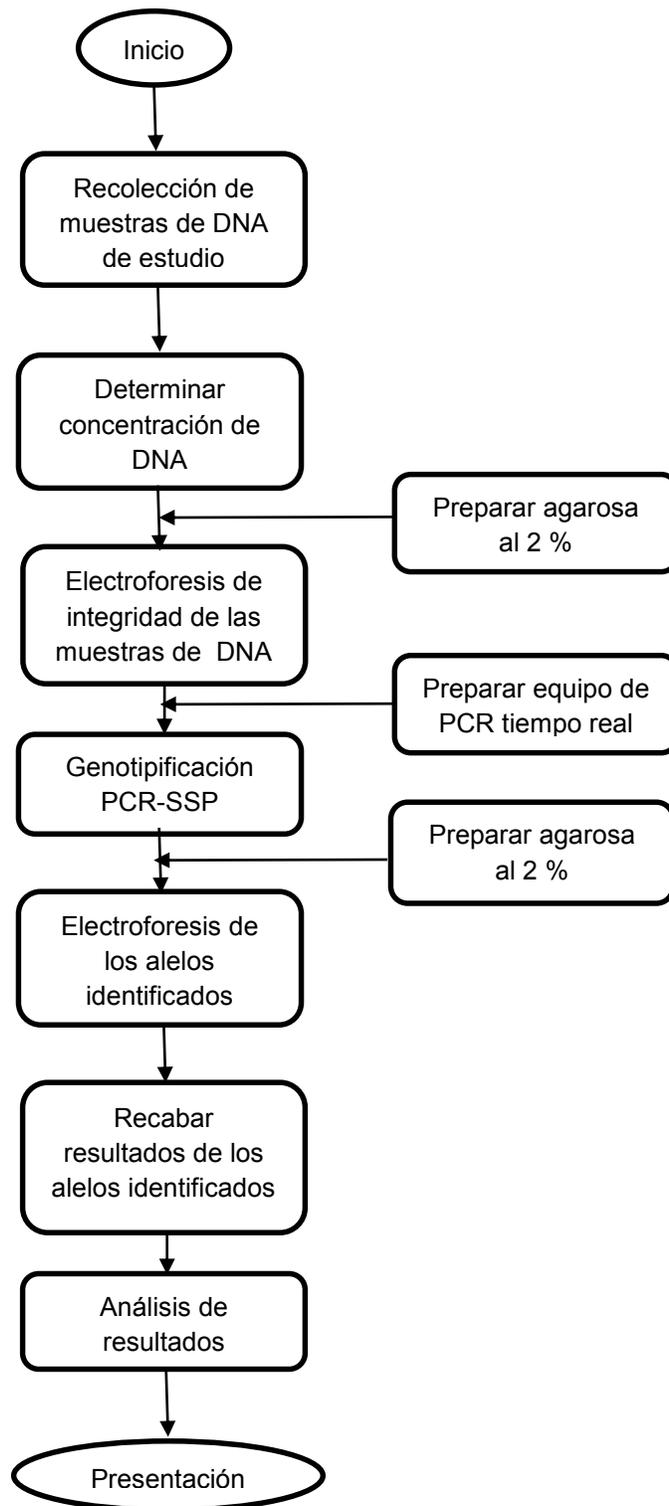


Figura 7. Diagrama de flujo del trabajo

Las parejas se estratificaron en tres grupos, según el riesgo de desarrollar aloinmunización y trombocitopenia feto-neonatal aloinmune, de acuerdo a la presencia o ausencia de los alelos de los antígenos plaquetarios. Los grupos se definieron de la siguiente manera:

- Grupo 1. Nivel de riesgo nulo. Son aquellas parejas donde no presentaron ningún alelo incompatible. Es decir, la mujer y su cónyuge tienen el mismo alelo o bien ella tiene el alelo positivo y su cónyuge el alelo negativo, por lo que supondría el no riesgo de aloinminización plaquetaria.
- Grupo 2. Nivel de riesgo bajo. Existen diferencias entre las parejas en uno o más alelos excepto HPA-1a, HPA-5b, HPA-15 a/b. es decir la mujer es negativa para un alelo pero su cónyuge es positivo.
- Grupo 3. Nivel de riesgo alto. El cónyuge presenta al menos uno de los alelos HPA-1a, HPA-5b, HPA-15 a/b y la mujer carece de ellos. Estos alelos se han reportado en asociación con trombocitopenia feto-neonatal aloinmune.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de frecuencias y determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg

Decisión para el equilibrio de Hardy-Weinberg

Chi² calculada aumenta, al aumentar las diferencias entre valores observados y esperados.

Chi² Cal \geq Chi² Tab: Se acepta H1 y rechaza Ho

Chi² Cal < Chi² Tab: Se acepta Ho y rechaza H1

H1 = La población no se encuentra en equilibrio

Ho = La población se encuentra en equilibrio

VII. RESULTADOS

Se incluyeron 30 muestras de 15 mujeres con PGR y su cónyuge, las frecuencias genotípicas y alélicas de los antígenos plaquetarios en la población evaluada se resumen en la **(Tabla 4)**.

En el análisis de Hardy-Weinberg utilizando X^2 , (grados de libertad = 1) para evaluar el ajuste entre lo observado/esperado. Número de individuos estudiados $n=30$. X^2 Cal= χ^2 calculada y X^2 Tab = χ^2 tabulada el cual es de 3,84, este último valor ya no se calcula se toma de tablas en cualquier libro de estadística, por lo que la población se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4. Frecuencia genotípica y alélica de los sistemas HPA y equilibrio de Hardy-Weinberg en población estudiada.

Sistema HPA	GP	n observado			n esperado			Equilibrio de Hardy-Weinberg	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		aa	ab	bb	aa	ab	bb	X ²	aa	ab	bb	a	b
HPA-1	GPIIIa	28	2	0	27,65	2,30	0,05	0,0925	0,9333	0,0666	0,0000	0,967	0,033
HPA-2	GPIIba	24	6	0	24,3	5,4	0,3	0,3703	0,8000	0,2000	0,0000	0,900	0,100
HPA-3	GPIIb	9	15	6	9,08	14,85	6,07	0,0027	0,3000	0,5000	0,2000	0,550	0,450
HPA-4	GPIIIa	13	16	1	14,7	12,6	2,7	2,1842	0,4333	0,5333	0,0333	0,700	0,300
HPA-5	GPIa	23	7	0	23,23	6,34	0,43	0,5038	0,7666	0,2333	0,0000	0,883	0,117
HPA-6	GPIIIa	25	5	0	25,39	4,42	0,19	0,2753	0,8333	0,1666	0,0000	0,917	0,083
HPA-9	GPIIb	17	13	0	18,25	10,30	1,45	2,2479	0,5666	0,4333	0,0000	0,783	0,217
HPA-15	CD109	11	14	5	10,8	14,4	4,8	0,0231	0,3666	0,4666	0,1666	0,600	0,300

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre mujeres y su cónyuge en la población evaluada, mostró que con respecto al alelo “a” una mayor frecuencia alélica en HPA-2, HPA-3, HPA-6, HPA-9 y HPA-15, en mujeres en relación a los hombres, sin diferencia estadística. En los sistemas para HPA-1 y HPA-4, sin diferencia en frecuencia iguales. En el sistema HPA-5, los hombres presentaron mayor frecuencia con respecto a las mujeres. Para el sistema HPA-15, en sus alelos a y b, se distribuyó por igual en el grupo de varones (0.500), mientras que para las mujeres se observaron diferencias entre la frecuencia del alelo a y el alelo b (proporción 0.700 y 0.300, respectivamente) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Frecuencias alélicas para los sistemas HPA entre Mujeres y su Cónyuge.

Sistema	Frecuencias alélica Mujeres (n 30)	Frecuencias alélica Hombres (n 30)
HPA-1 a	0,967	0,967
HPA-1 b	0,033	0,033
HPA-2 a	0,933	0,867
HPA-2 b	0,067	0,133
HPA-3 a	0,667	0,433
HPA-3 b	0,333	0,567
HPA-4 a	0,700	0,700
HPA-4 b	0,300	0,300
HPA-5 a	0,867	0,900
HPA-5 b	0,133	0,100
HPA-6 a	0,933	0,900
HPA-6 b	0,067	0,100
HPA-9 a	0,800	0,767
HPA-9 b	0,200	0,233
HPA-15 a	0,700	0,500
HPA-15 b	0,300	0,500

Las parejas se estratificaron según el riesgo de desarrollar aloinmunización, los cuales presentaron los siguientes resultados, para el grupo I se encontraron tres parejas, en los grupos II y grupo III, se obtuvieron seis parejas en cada uno, con proporción de (0.200, 0.400 y 0.400 respectivamente) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Alelos de riesgo presentados en la población del INPer y su nivel de riesgo.

Grupo	Número de pareja	Alelos del cónyuge	Nivel de riesgo (proporción)
I	Pareja 4	No presentaron alelos de incompatibilidad	Nulo (0.200)
	Pareja 6		
	Pareja 12		
II	Pareja 5	HPA-2b	Bajo (0.400)
	Pareja 7	HPA-1b y HPA-3b	
	Pareja 8	HPA-2b y HPA-3a	
	Pareja 11	HPA-3b y HPA-9b	
	Pareja 14	HPA-2b	
	Pareja 15	HPA-3b	
III	Pareja 1	HPA 3b, HPA 5b	Alto (0.400)
	Pareja 2	HPA 6b, HPA 9b, HPA 15b	
	Pareja 3	HPA 4b, HPA 15b	
	Pareja 9	HPA 6b, HPA 9b, HPA 15b	
	Pareja 10	HPA 3b, HPA 5b, HPA 15b	
	Pareja 13	HPA 6b, HPA 9b, HPA 15b	

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Frecuencia alélica y genotípica.

La distribución genotípica es característica en cada una de las poblaciones, esto genera identidad y permite identificar el origen étnico y comparar nuestro estudio con aquellas reportadas en las poblaciones.

Al comparar las frecuencias alélicas con otras poblaciones, se puede observar que el alelo HPA-1a, ocurre con frecuencia similar en los estudios reportados.

El alelo HPA-1b, que en nuestros resultados se presenta en proporción 0.033, tiene una ocurrencia similar a la reportada en poblacionales asiáticas y amerindias, que igualmente tienen frecuencia menor a 0.050. Esto pudiera explicarse por la influencia oriental que tiene la mezcla genética en la población del altiplano americano.

Los alelos HPA-2 a/b, no muestran diferencias en las frecuencias alélicas entre diferentes poblaciones comparadas con las del presente reporte, con excepción a la frecuencia observada en la población bantú del Congo.

El alelo HPA-3a, tiene mayor prevalencia en grupos de origen oriental. Sin embargo, no hay diferencias entre lo señalado en nuestro reporte con lo observado para el resto de los grupos de estudio. En sentido inverso, el alelo HPA-3b, es de menor prevalencia en los grupos orientales.

El alelo HPA-4a, tiene su menor prevalencia en nuestro reporte que lo señalado en el resto de los estudios.

De manera interesante el alelo HPA-4b, tiene mayor frecuencia (0.300), que en el resto de los estudios reportados. Debido a la naturaleza del estudio exploratorio, no es posible determinar las causas de estas diferencias, aunque pudiera estar relacionado con el sesgo de selección en la población de parejas con PGR.

No se encontraron diferencias en la distribución entre las diferentes poblaciones, para los alelos HPA-5a y HPA-6a.

El alelo HPA-5b, se observó con frecuencia de 0.117 en nuestra población, proporción que es similar al resto de los reportes, excepto en las poblaciones orientales y amerindias, donde la frecuencia es menor al 0.030.

El alelo HPA-6b, ocurrió con mayor frecuencia en nuestro grupo de estudio, comparado con el resto de las poblaciones, pero con frecuencia similar a las poblaciones de origen asiático.

Respecto al alelo HPA-9a, aunque hay menor cantidad de estudios presentes en la literatura para realizar la comparación poblacional, la menor frecuencia encontrada es en la población del presente reporte. Para el caso de HPA-9b, se tiene la más elevada frecuencia para el resto de las poblaciones.

En el alelo HPA-15 a/b, existen también un menor número de reportes de la literatura, pero en aquellos casos la ocurrencia de este alelo en población mexicana (0.600), es de mayor frecuencia con respecto a las demás poblaciones evaluadas, pero menor aquellas de origen bantú y amerindio.

Las diferencias más evidentes entre las frecuencias alélicas y genotípicas fueron en HPA 4, HPA 9 y HPA 15 (**Tabla 7**).

Diferencias en frecuencias alélicas entre las parejas.

Al comparar las frecuencias alélicas entre las mujeres con PGR y su cónyuge se observaron diferencias en los alelos HPA-2b, HPA-3b y HPA-15b.

Los alelos HPA-2b y HPA-3b se consideran de bajo riesgo para el desarrollo de aloinmunización, sin embargo el HPA-3b se ha asociado con el desarrollo de púrpura post-transfusional.

El alelo HPA-15b se relaciona al riesgo de TFNA.

En este momento no es posible establecer el papel biológico de estas diferencias en las parejas con PGR, o si finalmente se trata de una asociación espuria.

Frecuencias alélicas por grupos de riesgo.

La distribución de los alelos de los antígenos plaquetarios en parejas con PGR, estratificadas en el riesgo descrito en la literatura para generar patología (aloimmunización, púrpura pos-transfusional), se observó que no hay diferencias entre el grupo 2 y 3 (proporción 0.400), habiendo menor frecuencia en el grupo 1. Es decir, la presencia de incompatibilidad en los alelos de los antígenos plaquetarios se encuentra en proporción de 0.800 de toda la población de PGR evaluada.

El diseño metodológico del presente reporte, no permite establecer asociaciones o causalidad de las diferencias alélicas en la población con PGR. Sin embargo, el reporte de la mayor frecuencia de incompatibilidad en los alelos de los antígenos plaquetarios en las parejas con PGR, permiten establecer el

marco de referencia para evaluar los posibles mecanismos biológicos que pudieran explicar la pérdida gestacional recurrente en las parejas con incompatibilidad a los antígenos plaquetarios.

Es necesario también, documentar esta diferencia ampliando el tamaño de la muestra e incluyendo el grupo control adecuado.

Tabla 7. Frecuencias alélicas HPA en población estudiada del (INPer), comparada con algunas otras poblaciones¹⁷

Población	Distribución de frecuencias alélicas HPA															
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	9a	9b	15a	15b
Población del (INPer)	0,967	0,033	0,900	0,100	0,550	0,450	0,700	0,300	0,883	0,117	0,917	0,083	0,783	0,217	0,600	0,400
Mejicanos²⁹	0,951	0,049	0,841	0,159	0,604	0,396	0,990	0,010	0,938	0,062	1,000	0,000	-	-	-	-
Bereberes	0,748	0,252	0,818	0,182	0,682	0,318	1,000	0,000	0,861	0,139	1,000	0,000	-	-	-	-
Tunecinos	0,750	0,250	-	-	0,694	0,306	-	-	0,780	0,220	-	-	-	-	-	-
Eslovenos	0,809	0,191	0,891	0,109	0,591	0,407	0,997	0,003	0,934	0,066	-	-	-	-	0,527	0,483
Espanoles	0,810	0,190	0,900	0,100	0,650	0,350	1,000	0,000	0,880	0,120	1,000	0,000	-	-	0,474	0,526
Daneses	0,831	0,169	0,917	0,083	0,626	0,374	1,000	0,000	0,921	0,078	-	-	-	-	-	-
Alemanes	0,839	0,161	0,910	0,090	0,586	0,414	-	-	0,917	0,083	-	-	-	-	-	-
Ingleses	0,840	0,161	0,925	0,075	0,627	0,373	1,000	0,000	0,914	0,086	1,000	0,000	-	-	0,524	0,476
Holandeses	0,846	0,154	0,934	0,066	0,555	0,445	1,000	0,000	0,902	0,098	-	-	-	-	-	-
Franceses	0,848	0,152	0,920	0,080	0,620	0,380	-	-	0,874	0,126	-	-	-	-	-	-
Italianos	0,850	0,150	0,890	0,110	0,610	0,390	1,000	0,000	0,900	0,100	1,000	0,000	-	-	-	-
Austriacos	0,852	0,148	0,918	0,082	0,612	0,388	1,000	0,000	0,892	0,108	1,000	0,000	-	-	0,500	0,500
Filandeses	0,860	0,140	0,910	0,090	0,590	0,410	-	-	0,950	0,050	-	-	-	-	-	-
Polacos	0,874	0,126	0,898	0,102	0,592	0,408	1,000	0,000	0,937	0,063	-	-	-	-	0,485	0,515
Argentinos	0,878	0,122	0,875	0,125	0,612	0,388	1,000	0,000	0,927	0,073	1,000	0,000	-	-	0,510	0,490
Irlandeses	0,882	0,118	0,934	0,066	0,624	0,376	1,000	0,000	0,912	0,088	1,000	0,000	-	-	0,542	0,458
Bantúes (Congo)	0,904	0,096	0,776	0,224	0,596	0,404	1,000	0,000	0,732	0,268	1,000	0,000	-	-	0,701	0,299

Coreanos	0,988	0,012	0,923	0,077	0,555	0,445	0,990	0,010	0,978	0,022	0,980	0,020	-	-	-	-
Taiwaneses	0,997	0,003	0,960	0,040	0,575	0,425	0,998	0,002	0,985	0,015	0,963	0,037	-	-	0,538	0,462
Japoneses	0,998	0,002	0,900	0,100	0,718	0,282	0,989	0,011	0,973	0,027	0,973	0,027	-	-	-	-
Amerindios	1,000	0,000	0,821	0,179	0,757	0,243	1,000	0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	0,780	0,220
Brazil³⁰	0,925	0,075	0,850	0,150	0,600	0,400	1,000	0,000	0,920	0,080	1,000	0,000	0,981	0,010	0,533	0,467
Maori, polinesia³¹	0,960	0,040	0,933	0,067	0,580	0,420	1,000	0,000	0,987	0,013	0,987	0,013	1,000	0,000	0,512	0,488

IX. CONCLUSIONES

- ✓ Las frecuencias de los antígenos HPA en la población evaluada son similares a las descritas en varias poblaciones del mundo, con excepción de los sistemas bialélicos HPA 4, HPA 9 y HPA 15.
- ✓ Existe incompatibilidad en los alelos de los antígenos plaquetarios en proporción de 0.800 de las parejas con PGR estudiadas.
- ✓ Esto permite establecer nuevas hipótesis para evaluar modelos explicativos de la PGR.
- ✓ Esta información se deberá validar ampliando el tamaño de la muestra y con el diseño metodológico apropiado.
- ✓ Es escasa la información en la literatura internacional sobre la posible asociación entre los alelos de los antígenos plaquetarios y las parejas con PGR.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertility and sterility*. 1996 Jul; 66(1):24-9. PubMed PMID: 8752606.
2. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertility and sterility*. 1999 Nov; 72(5):765-74. PubMed PMID: 10560975.
3. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Hemostasis in normal pregnancy. *Thrombosis and hemostasis*. 1984 Oct 31; 52(2):176-82. PubMed PMID: 6084322.
4. Jaegtvik S, Husebekk A, Aune B, Oian P, Dahl LB, Skogen B. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA 1a antibodies; the level of maternal antibodies predicts the severity of thrombocytopenia in the newborn. 2000 May; 107(5):691-4. PubMed PMID: 10826588.
5. Kaplan C, Patereau C, Reznikoff-Etievant MN, Muller JY, Dumez Y, Kessler A. Antenatal PLA1 typing and detection of GP IIb-IIIa complex. 1985 Jul; 60(3):586-8. PubMed PMID: 3160384.
6. Gruel Y, Boizard B, Daffos F, Forestier F, Caen J, Wautier JL. Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood*. 1986 Aug; 68(2):488-92. PubMed PMID: 2425870.
7. Curtis BR, McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. 2009; 25(3):125-35. PubMed PMID: 20406019.
8. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. 1993 Feb 1; 81(3):835-40. PubMed PMID: 8427975.
9. Liu TC, Shih MC, Lin CL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-8w platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, and Thai. 2002 May; 81(5):244-8. PubMed PMID: 12029532.
10. Fernández-Delgado N, Platelet Functional spectrum: from Hemostasis to Regenerative Medicine. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2012; 28(3): 200-216
11. Anjali A. Sharathkumar, Amy D. Shapiro, Trastornos de la Función Plaquetaria, *Federación Mundial de Hemofilia*, 1999; revisado en Abril de 2008, No 19. p. 4

-
12. B. R. Curtis & J. G. Mc Farland. Human platelet antigens – 2013. Vox Sanguinis de la ISBT International Society of Blood Transfusion. 2013.
 13. García Mesa M y Coma Alfonso C. Características Estructurales y Funcionales de las Plaquetas, Revista Cubana Angiol y Cir Vasc 2000; 1(2):132-41
 14. Acuña-Alonzo, V., Silva-Ramírez, B., Castillo-Vázquez, M., & Granados-Arriola, J. Variación del HLA-B en poblaciones mexicanas. Bioquímica, (2006) 31(2), 49-58.
 15. Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblant M, Vergara U. Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica 2002, Editorial Universidad de Talca, Capítulo 26:437-457.
 16. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. Transpl Immunol 2002; 10:165-181.
 17. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang 2003; 85 (3): 240-5.
 18. Michael Egbor, Peter Knott. Red-cell and platelet alloimmunisation in pregnancy, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, ELSEVIER, 26 (2012) 119-132
 19. Alfonso Valdés M E. Citopenias Secundarias a Aloimmunización Materna, Revista Cubana de Hematología e Inmunología Med Transf 2006; 22(3)
 20. Jiménez-Fernández L, Céspedes-Marís A, Sander-Mangel K-U. Primer caso reportado de trombocitopenia fetal aloimmune en primigesta. Servicio de Obstetricia, Hospital “Dr. Rafael Á. Calderón Guardia”. Universidad de Costa Rica. Julio 2014.
 21. Suzanne A. Arinsburg, Beth H. Shaz, Connie Westhoff, and Melissa M. Cushing, Determination of human platelet antigen typing by molecular methods: Importance in diagnosis and early treatment of neonatal alloimmune Thrombocytopenia, American Journal of Hematology, 87:525–528, 2012
 22. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. Vox Sang. 2004; 87:1 (82-6).
 23. 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.
 24. P. Metcalfe. Platelet antigens and antibody detection. Vox Sanguinis 2004, 87(Suppl. 1); S82-S86.

-
25. Cortazar Adriana, Silva Elsa Patricia, Métodos Físicos-Químicos en Biotecnología PCR, Instituto de Biotecnología, UNAM, Junio, 2004
26. Mas´ Lanka K, Michur H., Guz K., Wro´ Bel A., Uhrynowska M. Misiak A. Ejduk A. Brojer E., Zupan´ Ska B. The relevance of HPA-15 antigen expression for anti-HPA-15 antibody detection. *Hematology*. 2012, 34, 65–69.
27. Muñiz-Díaz E y Ginovart Galiana G, Trombocitopenia aloimmune en el feto y en el recién nacido, *Pediatr* 2003;58(6):562-7.
28. Marije M. Kamphuis, Noortje P. Paridaans, Leendert Porcelijn, Enrico Lopriore and Dick Oepkes. Incidence and Consequences of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Pediatrics* 2014; 133; 715.
29. Nogues N, Subirana L, Garcia Manzano A. Human Platelet Aloantigens in a Mexican Population: a comparative gene frequency study. *Vox Sanguinis* 2000; 78 (P060).
30. Fabiana Conti, Gerald Bertrand, Marcia Dezan, Thiago Costa, Maria Aravechia, Mariza Mota, Lilian Castilho, Cécile Kaplan, and José Kutner. Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. *Transfusion* 2014; 54:405-411.
31. H. A. Edinur, P. P. J. Dunn, R. A. Lea, G. K. Chambers. Human platelet antigens frequencies in Maori and Polynesian Populations. *Transfusion Medicine*. 10 July 2013 doi: 10.1111/tme.12061.