

TESIS DOCTORAL

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS HPA-1, -3 Y -5 EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO, ARGENTINA

Directores:

Prof. Dr. Antonio Fernández Montoya

Prof. Dr. Vicente Crespo Ferrer

Prof. Dr. Salvador Oyonarte Gómez

Doctorando:

Carlos Daniel De La Vega Elena

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
GRANADA, 2007.

*C'est avec la **logique** que nous prouvons et avec l'**intuition** que nous trouvons.*
(Probamos por medio de la lógica pero descubrimos por medio de la intuición)

Henri Poincaré (1854-1912); Matemático francés.

A mi Familia y amigos.

El Profesor Dr. Antonio Fernández Montoya, médico hematólogo, Director del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada-Almería,

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral, “GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS HPA-1, -3 Y -5 EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO, ARGENTINA” del Bioquímico Carlos Daniel de La Vega Elena, ha sido realizada bajo mi dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, considerándola en condiciones para optar al grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Granada, a 1 de junio de 2007.

Prof. Dr. Antonio Fernández Montoya

El Profesor Dr. Vicente Crespo Ferrer, catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral, “GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS HPA-1, -3 Y -5 EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO, ARGENTINA” del Bioquímico Carlos Daniel de La Vega Elena, ha sido realizada bajo mi dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, considerándola en condiciones para optar al grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Granada, a 1 de junio de 2007.

Profesor Dr. Vicente Crespo Ferrer

El Profesor Dr. Salvador Oyonarte Gómez, médico hematólogo del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada-Almería,

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral, “GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS HPA-1, -3 Y -5 EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO, ARGENTINA” del Bioquímico Carlos Daniel de La Vega Elena, ha sido realizada bajo mi dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, considerándola en condiciones para optar al grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Granada, a 1 de junio de 2007.

Profesor Dr. Salvador Oyonarte Gómez

AGRADECIMIENTOS

Mis disculpas ante todo para aquellas personas que de una u otra forma han aportado o colaborado para lograr esta tesis y que, por un involuntario olvido, no los incluyo; esta lista será tan extensa como incompleta.

Al Profesor Dr. Antonio Fernández Montoya, Médico Hematólogo, Director del Centro Regional de Transfusión Sanguínea (CRTS) de Granada-Almería y director de esta tesis, por la confianza que ha depositado en mí para la realización de este estudio, por su apoyo, rigor científico, guía incansable y especialmente, por su amistad.

A los Profesores Dr. Vicente Crespo Ferrer y Dr. Antonio Campos Muñoz, Catedráticos de Histología de la Universidad de Granada, por su apoyo entusiasta e incondicional.

Al Profesor Dr. Salvador Oyonarte Gómez, Médico Hematólogo del C.R.T.S de Granada-Almería por haberme transmitido su interés en el estudio de los sistemas de antígenos plaquetarios y su aliento.

Mi mayor agradecimiento a la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS), al Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por su apoyo formativo y financiero.

A los Doctores Eduardo Muñiz-Díaz y Nuria Nogues, del laboratorio de inmunohematología del Banc de Sang i teixits de Barcelona, quienes gracias a su dedicación, esfuerzo y espíritu docente hicieron posible este estudio.

A la Profesora Dra. Edita Solís, Jefa del Laboratorio del Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Italiano Garibaldi de Rosario, que me inició en la investigación, por su entusiasmo constante en el trabajo clínico y de laboratorio y especialmente, por su amistad.

Al Profesor Dr. Norberto Arancegui, catedrático de Microbiología de la facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario por su ayuda incondicional, sus siempre acertadas sugerencias y especialmente, por su amistad.

A la antropóloga Claudia Cisneros, por su gran ayuda durante las entrevistas con la comunidad toba de Rosario y su amistad.

A la Bioquímica y especialista en estadística Susana Denner de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por su asistencia en el análisis estadístico de los datos de esta tesis y su amistad.

A todo el personal del CRTS de Granada-Almería y del laboratorio de inmunohematología del Banc de Sang i teixits, por su ayuda y compañerismo a lo largo de todos estos años.

A mis compañeros de trabajo del Servicio de Medicina transfusional del Hospital Italiano de Rosario, especialmente a los Dres. Mario Pivetta, Claudia Fornes, Sofía Bonetti, Carolina Landi, Virginia Nicolorich y Sergio Chialina.

A mis compañeros de trabajo del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, especialmente a los Dres. Elvira Theiller, Kiriam Minella, Cecilia Brisson y Daniel Blanzaco.

A una larga lista de amigos de toda la geografía española y para los que quedaron allende del mar.

A Erica, a quién debí quitar mucho tiempo en pos de este objetivo.

A mi familia por lo que ha significado todo este tiempo de ausencia, que quedará grabada en mi para el resto de mi vida.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN	19
I. INTRODUCCIÓN	21
A. Plaquetas. Generalidades.	23
B. Aloantígenos plaquetarios. Descripción, clasificación	25
C. Aloantígenos plaquetarios no específicos.	26
D. Aloantígenos plaquetarios específicos.	28
E. Nomenclatura HPA	29
F. Bases moleculares HPA	30
Estructura de las GP polimórficas e inmunogénicas de la plaqueta:	
a. GPIIb/IIIa	30
b. GPIb/IX/V (CD42)	32
c. GPIa/IIa	33
d. CD109	34
e. Otras	34
G. Tipificación HPA.	37
a. Fenotipificación serológica.	37
b. Genotipificación	37
i La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
ii PCR - Cebador secuencia específica (SSP).	39
H. Aloinmunización HPA.	41
a. Mecanismos	41
b. Incompatibilidad antigénica	42
c. Factores del antígeno (inmunogenicidad)	45

d. Factores del individuo respondedor	45
e. Factores dependientes de la vía de inmunización	46
I. Implicaciones clínicas de los polimorfismos HPA	47
a. Asociadas a la aloinmunización	47
b. Asociada a cambios en la funcionalidad	49
J. Frecuencias poblacionales de los polimorfismos HPA.	51
K. Demografía Argentina	52
a. Población general	52
c. Los grupos étnicos en la Argentina	55
d. La etnia toba (Qom)	57
e. Los tobas en Rosario (Provincia de Santa Fe)	58
II. OBJETIVOS	61
III. MATERIALES Y MÉTODOS	65
A. Aspectos éticos	67
B. Diseño y cálculo de la muestra	67
a. Población mayoritaria:	67
b. Aborígenes tobas:	68
C. Individuos estudiados	70
a. Donantes de Sangre	70
b. Personal Hospitalario	70
c. Aborígenes tobas	71
D. Métodos	73
a. Obtención de la muestra de sangre entera	73
b. Extracción del ADN genómico	73
c. Cuantificación del ADN	73

e. ADN de referencia	74
f. Protocolos de amplificación PCR-SSP	74
g. Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	77
h. Genotipificación de los individuos	80
i. Fórmulas y métodos estadísticos utilizados.	81
IV. RESULTADOS	85
A. Caracterización de la población mayoritaria de la ciudad Rosario.	87
B. Caracterización de la población de aborígenes tobas.	96
C. Análisis comparativo entre la población de Rosario y los aborígenes tobas.	102
D. Análisis de las Implicaciones Transfusionales y obstétricas.	104
V. DISCUSIÓN	109
A. Caracterización de la población mayoritaria de la ciudad de Rosario	111
B. Caracterización de la población de aborígenes tobas.	113
C. Análisis comparativo entre la población de Rosario y los aborígenes tobas.	115
D. Análisis de las Implicaciones Transfusionales y obstétricas.	116
VI. CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	137

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Los aloantígenos plaquetarios humanos (HPA) son las porciones polimórficas de las glicoproteínas (GPs) de la membrana plaquetaria, capaces de generar una respuesta inmune en individuos susceptibles al ser expuestos durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante. El ímpetu original para 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 (de precursores y de órganos sólidos) y la refractariedad a la transfusión de plaquetas.¹

Recientemente, el efecto de estos polimorfismos sobre la funcionalidad plaquetaria y su papel en cuadros hemorrágicos y trombóticos ha despertado mucho interés, ampliando el espectro de patologías asociadas a algunas muy prevalentes como infarto de miocardio y la enfermedad coronaria arterial entre otras.²

A pesar del gran número de glicoproteínas descritas en la membrana plaquetaria, los aloantígenos se hallan localizados en unas pocas de ellas, principalmente en los complejos GPIIb/IIIa, GP Ib/IX/V, GP Ia/IIa y en el CD109. La caracterización de los genes que las codifican y la descripción reciente de la base molecular de los aloantígenos a nivel del ADN, ha facilitado enormemente su estudio y aplicación en la práctica clínica.

Como sucede para muchos otros grupos sanguíneos, entre las distintas poblaciones estudiadas alrededor del mundo se han encontrado diferencias importantes en las frecuencias de algunos aloantígenos plaquetarios específicos, pero muchas aún no han sido caracterizadas. Este es el caso de la República Argentina, cuya población es resultado de la descendencia directa de distintas oleadas de inmigrantes, principalmente de Europa, y del mestizaje de éstos con una base indígena originaria desde la conquista española. Ambas poblaciones contribuyentes son conocidas por presentar diferencias notables en las frecuencias HPA, lo cual le otorga a su caracterización un particular interés.³⁻⁵

Rosario, es una ciudad del centro-este de Argentina que, junto a otras localidades, forman el área metropolitana del Gran Rosario, la tercera aglomeración del país. De manera similar al resto de la Argentina, la mayoría de sus 1.120.000 habitantes son descendientes

de italianos y españoles y en mucha menor medida de otras nacionalidades.⁶ Desde hace unos años Rosario ha sumado un importante flujo de migración interna, proveniente principalmente de la provincia de Chaco (noreste del país) entre quienes se encuentran al grupo amerindio originario tobas. A pesar de lo reducido de este último grupo, su alta endogamia y aislamiento cultural justifican su caracterización separada como una medida de la heterogeneidad genética de los habitantes de la ciudad de Rosario.

La importancia de establecer la frecuencia de los aloantígenos plaquetarios en una población radica en su estrecha relación con la prevalencia de los cuadros clínicos secundarios a la aloinmunización. Estos actúan como un cuello de botella de factores genéticos y ambientales, limitando el número de individuos susceptibles a la aloinmunización.

Las tablas poblacionales de los aloantígenos plaquetarios humanos que se confeccionen pueden constituir un marco para la búsqueda de productos sanguíneos compatibles para individuos sensibilizados. La iniciación de un panel de donantes caracterizados entre los individuos reclutados, permitirá un adecuado diagnóstico de la sensibilización en gestantes y pacientes y la obtención de hemocomponentes compatibles.

En resumen, la caracterización de las frecuencias de los antígenos plaquetarios humanos en la población Argentina y el análisis comparativo de ésta con otras poblaciones, representará, la puesta en agenda del tema, es decir, el primer paso hacia el esclarecimiento de cuadros patológicos subdiagnosticados en nuestro país.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

A. Plaquetas. Generalidades.

Las plaquetas sanguíneas son fragmentos celulares sin núcleo de 2 a 4 μm de diámetro y 10 fL de volumen, formadas por la división de sus precursores medulares, los megacariocitos.

Normalmente dos tercios de la masa plaquetaria circulan en sangre periférica con recuentos entre 150 y 450 $\times 10^9/\text{L}$.⁷ El tercio restante se encuentra en el bazo, donde también se produce la destrucción por senescencia al final de su vida de 7 a 10 días.

La función principal de las plaquetas es participar en la hemostasis, evitando la pérdida de sangre y colaborando en el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular. Circulan inactivas y frente a una injuria de la pared vascular, alteraciones del flujo sanguíneo o un estímulo químico, manifiestan la denominada triada funcional: adhesión, activación y secreción. Todas las respuestas ocurren vía una serie de señales coordinadas que convierten el estímulo extracelular en mensajeros intracelulares a través de la activación de receptores específicos de membrana.

Las glicoproteínas de la plaqueta cumplen un papel crítico en esta función, actuando como receptores y mediando las interacciones con el sub-endotelio vascular (adhesión) y con otras plaquetas⁸ (agregación). El estímulo causa la aparición en la superficie plaquetaria de numerosas moléculas que se encontraban intracelularmente en lisosomas, gránulos y otros compartimientos celulares.

A su vez, las plaquetas humanas poseen muchas características de las células inflamatorias, tales como quimiotaxis, capacidad para liberar mediadores inflamatorios (factor plaquetario PF4 e histamina), fagocitar cuerpos extraños, interactuar con neutrófilos, estimular basófilos, excretar muchos mediadores, citoquinas, factores de crecimiento e interactuar con bacterias y parásitos.⁹ La membrana plaquetaria también porta moléculas inmunes tales como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC o HLA) de clase I, receptores para la porción Fc Gamma

(Fcγ) y receptores del complemento, e incorpora antígenos de grupo sanguíneo muy importantes en la transfusión de sangre.

Las moléculas se han clasificado en cinco grupos: moléculas de adhesión, moléculas inmunes, receptores, antígenos de grupo sanguíneo y otras.⁹ Las designaciones CD (del inglés *cluster of differentiation*) de todas las moléculas integrales de la membrana plaquetaria, actualizadas de acuerdo con la “8va. Reunión de trabajo sobre antígenos de diferenciación leucocitaria” (8th *Human Leucocyte Differentiation Antigens Workshop*), se encuentran en el sitio de Internet “*Protein review on the web*”, de la agencia nacional de salud norteamericana (<http://mpr.nci.nih.gov/prow/>).

B. Aloantígenos plaquetarios. Descripción, clasificación

Los antígenos son estructuras capaces de interactuar con receptores de linfocitos y macrófagos. Son definidos, al menos inicialmente, a través de su capacidad 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 se está en presencia de un aloantígeno.

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.

El interés del estudio de los antígenos y anticuerpos antiplaquetarios, 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).

Resulta útil diferenciar entre aquellos aloantígenos 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 causales de la mayoría de los cuadros de refractariedad a la transfusión de plaquetas de causa inmunológica, y los últimos, foco de este trabajo de tesis, son responsables casi excluyentes del resto de los cuadros.

C. Aloantígenos 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. A continuación se describen con cierto detalle los antígenos ABH y HLA por su importancia transfusional:

a. 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 de la fracción glicolipídica 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 isoaglutininas¹⁰⁻¹² de hasta un 20% menor al esperado para pacientes que presentan títulos de tipo IgG mayores a 64. Algunos trabajos indican casos donde se han obtenidos recuentos postransfusional satisfactorios sólo después de la transfusión de plaquetas ABH compatibles.

b. 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, la 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 co-expresados 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^{13,14}, haciendo innecesario el estudio de estos últimos en la búsqueda de plaquetas compatibles, salvo muy contadas excepciones.¹⁵

D. Aloantígenos plaquetarios específicos.

A pesar del gran número de glicoproteínas en la superficie plaquetaria, los aloantígenos descritos se encuentran localizados principalmente en los complejos glicoprotéicos GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y en la proteína anclada por grupos glicosil-fosfatidil-inositol, CD109.¹⁶ Estos antígenos acompañan la herencia de estas glicoproteínas y se heredan de manera autosómica co-dominante.

Actualmente se conocen 24 aloantígenos plaquetarios específicos definidos por sus correspondiente 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 aloanticuerpos que los definen pero no para su correspondiente antitético.¹⁷ 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, no existen o son extremadamente raros.

Pese a su denominación, muchos aloantígenos 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 aloantígenos localizados inicialmente en la subunidad $\beta 3$ (GPIIIa) plaquetaria han sido detectados en células endoteliales, células del músculo liso y en los fibroblastos.¹⁸ Los antígenos asociados con la subunidad $\alpha 2$ integrina (GPIa) han sido encontrados en linfocitos T activados y en células endoteliales.^{19,20} Aquellos antígenos asociados al CD109 se encuentran también en los linfocitos T activados, en células endoteliales y en varias líneas celulares tumorales. Contrariamente, los aloantígenos localizados en la subunidad α Ib y en la subunidad GPIb (miembros de la familia de Glicoproteínas ricas en leucina), parecen ser específicos del linaje megacariocítico.

E. 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^{21,22} propusieron en 1990 un sistema simplificado, al que llamaron HPA, acrónimo del inglés *Human Platelet Antigens* (antígenos plaquetarios humanos), el cual fue revisado en 1998 por Santoso y Kiefel²³ y recientemente por Metcalfe et al.¹⁷ 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 aloanticuerpos que definen tanto al antígeno tético como al antitético. Los HPAs y sus sistemas son designados cronológicamente (HPA-1, HPA-2, HPA-3, etc.) 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 aloanticuerpo contra el aloantígeno antitético.¹⁷

F. Bases moleculares HPA

Se conocen las bases moleculares de 22 de los 24 antígenos definidos serológicamente (Tabla 1, página 35).

La diferencia entre lo propio y lo no propio 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.^{1,24,25} La única excepción a esta regla es el antígeno Oe^a (HPA-14bw), definido por una delección de tres nucleótidos que se traduce en un único aminoácido faltante en la glicoproteína portadora.

A continuación se describen con cierto detalle las glicoproteínas polimórficas y aloinmunogénicas de la membrana plaquetaria, portadoras de los aloantígenos HPA.

a. GPIIb/IIIa (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 (VWf). El fibrinógeno se une a la GPIIbIIIa en dos plaquetas adyacentes, haciendo la vez 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 Ca^{2+} para su función. Este consiste en la asociación no covalente de una subunidad α IIB y otra β 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, β 3) es una proteína glicosilada 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, α 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 Factor de Von Willebrand (VWf), 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 numero de antígenos y sistemas (ver Tabla 1, página 35): En la cadena β_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 α IIB se encuentran los sistemas **HPA-3** (residuo 843) y **HPA-9** (residuo 837).

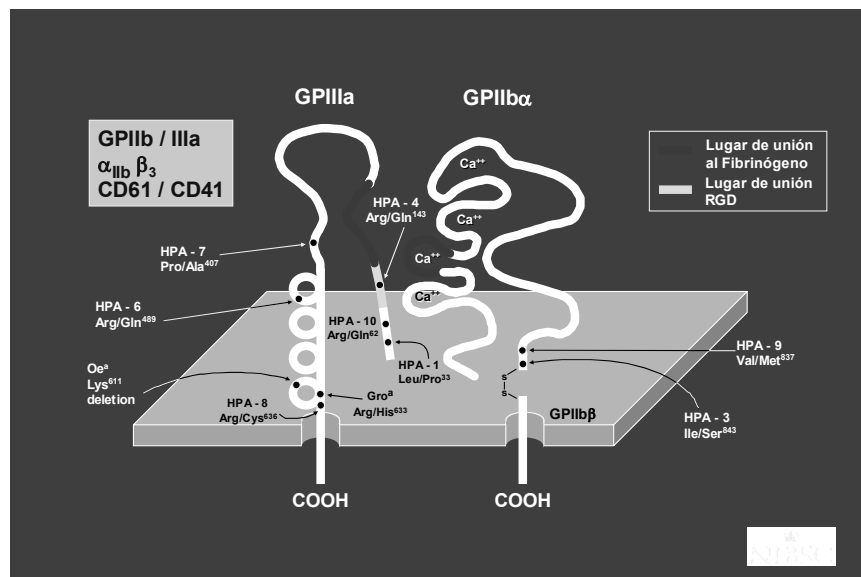


Figura 1. Complejo glicoproteico plaquetario GPIIb/IIIa. Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha. (Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)

b. GPIb/IX/V (CD42)

Este complejo glicoproteico esta involucrado en las etapas iniciales de la adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial de los vasos dañados mediado por el factor de Von Willebrand (VWf).

El receptor del factor de Von Willebrand está constituido por cuatro componentes transmembranales, todos miembros de la familia de proteínas ricas en repeticiones de leucina: La GPIb α (CD42b, 143 kDa) está unida covalentemente a la GPIb β (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 esta asociado funcionalmente al Receptor Fc γ RII (CD32).

El sitio primario de unión del complejo glicoprotéico al factor de Von Willebrand está localizado en la cadena GPIb α , pero el resto del complejo es necesario para dicha unión. La localización de los genes es conocida. El gen que codifica para la GPIb α está en el cromosoma 17, el gen de la GPIb β 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 glicoprotéico se han descrito dos sistemas aloantigénicos hasta el momento (ver Tabla 1 página 35): El polimorfismo **HPA-2**, situado en la GPIb α (residuo 142) y el **HPA-12** en la GPIb β . Se han descritos varias mutaciones silenciosas de la GPIb α pero sin capacidad de inducir una aloinmunización.

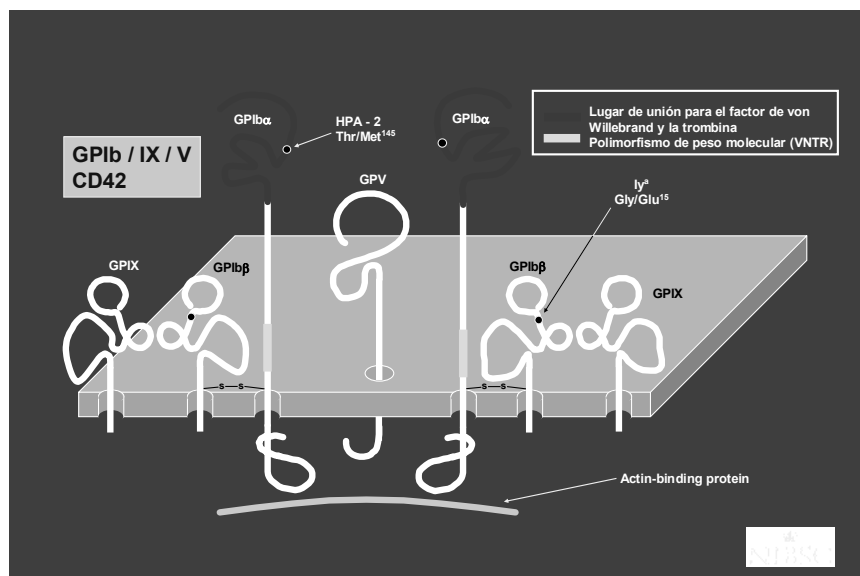


Figura 2 Complejo glicoproteico plaquetario GPIb/IX/V. Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha. (Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)

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 aloantigénicos presentes en el complejo GPIa/IIa (ver Tabla 1, página 35). 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.

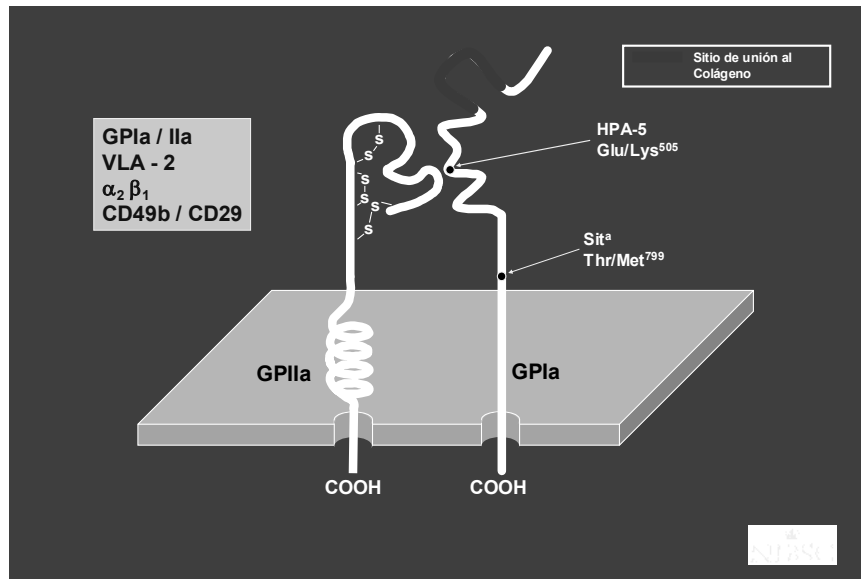


Figura 3 Complejo glicoproteico plaquetario GPIIa. Los antígenos plaquetarios específicos (HPA) están indicados con una flecha. (Modificado de <http://www.nibsc.ac.uk/Haem>, publicado con permiso del Dr. Paul Metcalfe)

d. CD109

Se trata de una glicoproteína de 175 kDa anclada a la membrana plaquetaria por un grupo glicosil-fosfatidil-inositol. Esta también 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 (ver Tabla 1, página 35).

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.

Su deficiencia no se asocia a patologías y es muy frecuente en individuos de origen japonés, los cuales a veces desarrollan isoanticuerpos con la estructura faltante. La estructura contra la cual estaban dirigidos los anticuerpos fue confundida inicialmente con un aloantígeno y llamado antígeno Nak^a.

Tabla 1. Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA)

Sistema	Antígeno	Sinónimos	Glicoproteína	HGNC*	CD*	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Ref.
HPA-1	HPA-1 ^a	Zw ^a , Pl ^{A1}	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	T ¹⁹⁶	Leucina ³³	26-28
	HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}				C ¹⁹⁶	Prolina ³³	
HPA-2	HPA-2 ^a	Ko ^b	GPIIb	<i>GP1BA</i>	CD42b	C ⁵²⁴	Treonina ¹⁴⁵	29-31
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a				T ⁵²⁴	Metionina ¹⁴⁵	
HPA-3	HPA-3 ^a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	CD41	T ²⁶²²	Isoleucina ⁸⁴³	32-34
	HPA-3b	Bak ^b				G ²⁶²²	Serina ⁸⁴³	
HPA-4	HPA-4 ^a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G ⁵²⁶	Arginina ¹⁴³	35-37
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b				A ⁵²⁶	Glutamina ¹⁴³	
HPA-5	HPA-5 ^a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	<i>ITGA2</i>	CD49b	G ¹⁶⁴⁸	Acido Glutámico ⁵⁰⁵	38-42
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a				A ¹⁶⁴⁸	Lisina ⁵⁰⁵	
HPA-6bw		Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G ¹⁵⁶⁴	Arginina ⁴⁸⁹	43-45
						A ¹⁵⁶⁴	Glutamina ⁴⁸⁹	
HPA-7bw		Mo ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C ¹²⁶⁷	Prolina ⁴⁰⁷	46
						G ¹²⁶⁷	Alanina ⁴⁰⁷	
HPA-8bw		Sr ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C ²⁰⁰⁴	Arginina ⁶³⁶	47,48
						T ²⁰⁰⁴	Cisteína ⁶³⁶	
HPA-9bw		Max ^a	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	CD41	G ²⁶⁰³	Valina ⁸³⁷	49
						A ²⁶⁰³	Metionina ⁸³⁷	
HPA-10bw		La ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G ²⁸¹	Arginina ⁶²	50,51
						A ²⁸¹	Glutamina ⁶²	
HPA-11bw		Gro ^a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	G ¹⁹⁹⁶	Arginina ⁶³³	52,53
						A ¹⁹⁹⁶	Histidina ⁶³³	
HPA-12bw		Iy ^a	GPIb β	<i>GP1BB</i>	CD42c	G ¹⁴¹	Glicina ¹⁵	54,55
						A ¹⁴¹	Acido glutámico ¹⁵	
HPA-13bw		Sit ^a	GPIa	<i>ITGA2</i>	CD49b	C ²⁵³¹	Treonina ⁷⁹⁹	56,57
						T ²⁵³¹	Metionina ⁷⁹⁹	
HPA-14bw		Oe a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	AAG ¹⁹²⁹⁻³¹	Lisina ⁶¹¹	58
						delección	Δ Lisina ⁶¹¹	
HPA-15	HPA-15a	Gov b	CD109	<i>CD109</i>	CD109	C ²¹⁰⁸	Serina ⁷⁰³	24,59,60
	HPA-15b	Gov a				A ²¹⁰⁸	Tirosina ⁷⁰³	
HPA-16bw		Duv a	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	CD61	C ⁵¹⁷	Treonina ¹⁴⁰	61
						T ⁵¹⁷	Isoleucina ¹⁴⁰	

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

Tabla 2. Antígenos plaquetarios específicos no-HPA

Antígeno	Glicoproteína	Ref.
Va ^a	GPIIb/IIIa	62
Mou ^a	desconocida	63

G. Tipificación HPA.

a. 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.⁶⁴ Hasta hace poco, la fenotipificación HPA dependía de la disponibilidad de suero humano de individuos sensibilizados contra los aloantígenos 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 “glicoproteína-específicos” tales como el MAIPA (inmovilización del antígeno plaquetario usando un anticuerpo monoclonal). Si bien los anticuerpos monoclonales (AcMo) se utilizan rutinariamente para fenotipar los glóbulos rojos, a excepción de HPA-1a ningún AcMo 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 recombinante⁶⁵ o producidos por tecnología “*Phage display*”.^{66,67} Estos análisis pueden complementar los análisis de genotipificación, acelerando la disponibilidad de paneles HPA-seleccionados.

b. Genotipificación

En cambio, la genotipificación HPA puede realizarse con ADN geonómico obtenido de cualquier material celular, utilizando reactivos disponibles comercialmente. Esto es posible a partir de la caracterización molecular de estos antígenos. 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 utilizan extensamente en los estudios poblacionales y en la práctica clínica especializada.⁶⁸

A pesar de las grandes ventajas que presentan las técnicas de genotipificación es improbable que reemplacen totalmente a la fenotipificación serológica. Esto se debe a casos excepcionales, donde la presencia del SNP puede no resultar exactamente en la expresión del antígeno.^{69,70} Recientemente se describió un tercer alelo de muy baja frecuencia para el sistema HPA-I. En este se describió la pérdida de algunos de los epitopos del antígeno HPA-1a y cuya caracterización a través del polimorfismo de un único nucleótido (SNP) induciría a un error.⁷¹ Se han descrito alelos silentes para el HPA-1b y HPA-3a que dan resultados discordantes en individuos portadores de la Tromboastenia de Glanzmann.^{69,72,73}

A continuación se detalla el fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y seguidamente, la variante cebador-secuencia-específica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-SSP), utilizada en este proyecto para la genotipificación HPA. Esta es la metodología de elección para estudios poblacionales.

i. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método de síntesis de ácidos nucleicos (ADN) in vitro y constituye la técnica más importante para amplificar ácidos nucleicos. Ambas hebras del ADN blanco son duplicadas o replicadas mediante la síntesis enzimática dirigida por una ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada *Taq* polimerasa.⁷⁴

La polimerasa requiere pequeñas secuencias de ADN sintético que actúan como cebadores o iniciadores (*primers*), complementarios de las regiones flanqueantes de la zona de interés y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en un medio amortiguador adecuado. Esta síntesis es repetida en forma cíclica varias veces (generalmente de 25 a 35) logrando así una amplificación exponencial del ADN comprendido entre el sitio de unión de ambos cebadores

(cada ciclo duplica, teóricamente, la cantidad de ADN, por lo que permite obtener hasta mil millones de copias a partir de un solo fragmento en pocas horas).

Cada ciclo consta usualmente de tres pasos, efectuados mediante cambios de temperatura:

1 ^{er} paso	Desnaturalización: Ruptura de los puentes de hidrógeno, queda el ADN como simple cadena.
2 ^{do} paso	Reasociación o <i>annealing</i> : Los cebadores se reasocian a las zonas complementarias.
3 ^{er} paso	Extensión: Se sintetiza ADN, con los nucleótidos y una ADN polimerasa que se hallan en la mezcla de reacción, generándose al final del proceso millones de copias de la región de interés.

Con esta técnica se logra amplificar fragmentos de ADN que comprenden una longitud variable entre 100 pb y 10000 pb.

ii. PCR - Cebador secuencia específica (SSP)

La reacción en cadena de la polimerasa cebador secuencia específica (PCR-SSP) es actualmente la técnica más utilizada para la genotipificación de los HPA. Esta se basa en la incapacidad de la *Taq* ADN polimerasa de reparar una no-complementariedad (*mismatch*) de una única base en el extremo 3' del cebador de ADN. Cuando el nucleótido del extremo 3' del cebador es complementario a la secuencia en el lugar de la variación alélica, tendrá lugar la amplificación. Sin embargo, cuando el nucleótido del extremo 3' del cebador no se aparea, la amplificación no ocurrirá o lo hará con una eficiencia muy baja.

Para la detección de cada alelo, dos pares de cebadores son diseñados conteniendo un cebador secuencia específica y uno común no polimórfico.

Luego de la electroforesis del producto de la PCR, la presencia de ADN se revela con transiluminación ultravioleta en presencia de bromuro de etidio. El genotipo es determinado por la presencia o ausencia de bandas de ADN.

El uso diagnóstico de la PCR-SSP requiere una validación de la especificidad de cada par de cebadores frente a controles positivos y negativos, así como la presencia de un control interno realizado con la amplificación simultánea de un segmento del gen de la proteína C reactiva u otra porción monomórfica para controlar la eficiencia de la PCR.

H. 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 que resultan en la formación de aloanticuerpos antiplaquetarios específicos⁹: 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 el contexto de las moléculas de MHC de clase II de las células presentadoras de antígenos (CPAs) del donante.

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 el contexto de 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 aquellos 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% del repertorio de los TCR 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. Incompatibilidad antigénica

A continuación se modeliza el efecto de la frecuencia de los alelos HPA sobre la incompatibilidad antigénica a nivel poblacional asociada a la transfusión, transplante y gestación.

i. Transfusión y transplante

Para todo sistema antigénico bialélico con herencia autosómica codominante, tal como son los sistemas plaquetario humano (HPA), la probabilidad de que ocurra para una exposición única (transfusión o transplante) una incompatibilidad potencial en una población dada para el antígeno “a” con una frecuencia alélica p , es igual al producto de las probabilidades de que el individuo receptor sea negativo para el antígeno en cuestión (q^2)= $(1-p)^2$ y que el componente que recibe sea antígeno positivo (p^2+2pq)= $(1-q^2)$, es decir, es igual a $(q^2) \times (1-q^2)$.

Como se observa en el Figura 4 (página 43), la probabilidad de que ocurra una incompatibilidad potencial es muy baja para frecuencias alélicas cercanas a 0 y a 1. Para frecuencias alélicas bajas, predominan en la población los individuos negativos (susceptibles a la inmunización) y la probabilidad de incompatibilidad crece paralelamente a la frecuencia fenotípica. A medida que la frecuencia alélica aumenta y se acerca a 0,3 (y la fenotípica a 0,51), la incompatibilidad alcanza su máximo (0,25). A altas frecuencias del alelo, el factor limitante de una incompatibilidad potencial resulta la proporción de individuos susceptibles a inmunizarse, es decir que no portan el antígeno.

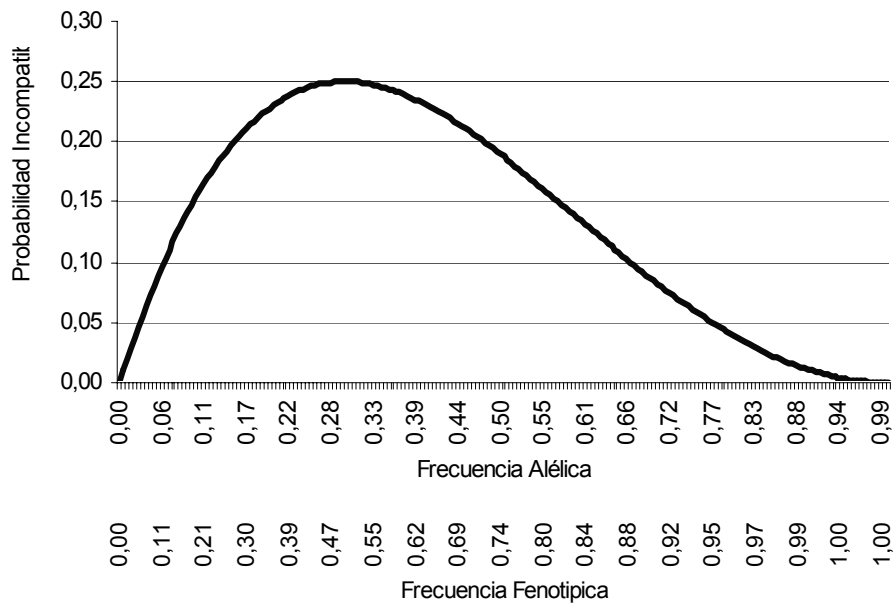


Figura 4. Probabilidad de Incompatibilidad potencial (asociada a la transfusión y trasplante) para un antígeno dado en la población en función de su frecuencia alélica y fenotípica

ii. Embarazo

De manera similar, dado un antígeno a con una frecuencia alélica “ p ” en una población dada, la probabilidad teórica de que una gestante negativa para dicho antígeno $(q^2)=(1-p)^2$ tenga un embarazo con un feto positivo $(p^2+2pxqx(1/2))=(p^2+pxq=px(p+q)=(p))$ es igual al producto entre ambas probabilidades, es decir, $(1-p)^2 \times (p)$

Como se observa en la Figura 5 (página 44), la probabilidad de incompatibilidad fetomaterna para un antígeno en particular tiene un máximo teórico de 0,148 correspondiente a una frecuencia alélica de 0,333. Esta es menor que la asociada a la transfusión (0,250), debido a que la probabilidad de que el feto de una mujer negativa sea negativo para el antígeno en cuestión es mayor que en un individuo al azar de la población como ocurre con la transfusión. Una mujer negativa tiene una probabilidad de 1 de transmitir un alelo negativo a su hijo, por lo que, el fenotipo positivo del feto sólo dependerá de la cigosidad paterna. Para un padre homocigoto para el alelo, la probabilidad

de un feto portador es de 1. En caso de heterocigosis, la probabilidad se reduce a 0,5.

En dicha imagen se observa claramente como varía la probabilidad de incompatibilidad cuando el fenotipo es muy prevalente en la población (ej. HPA-1a) de cuando se encuentra con una frecuencia menor (ej. HPA-5b).

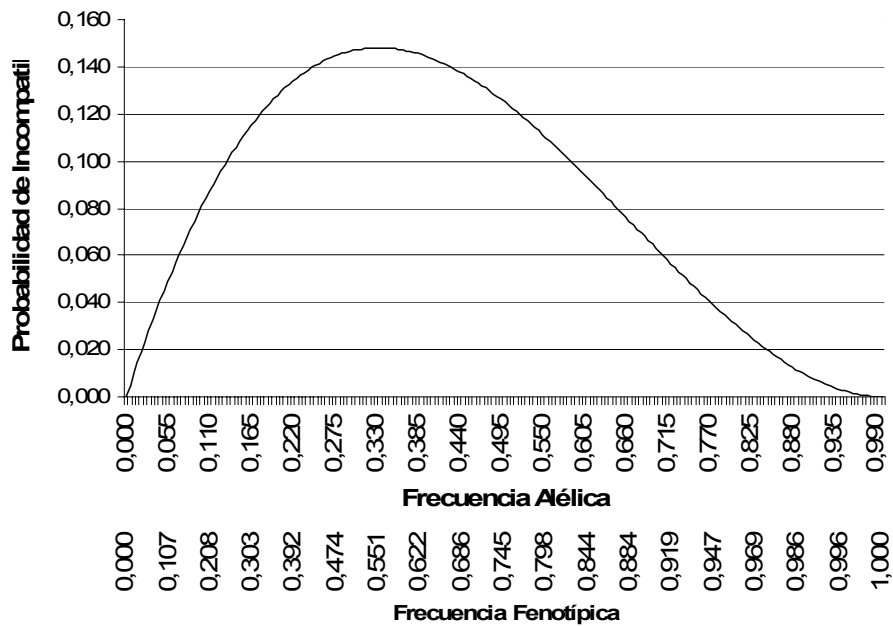


Figura 5. Probabilidad de Incompatibilidad potencial feto-materna en una población para un antígeno dado en función de su frecuencia alélica y fenotípica

La incompatibilidad es una condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la aloinmunización. Existen factores propios del antígeno y del paciente, que condicionan dicha respuesta y pueden describirse de la siguiente manera:

c. Factores del antígeno (immunogenicidad)

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: la densidad antigénica sobre la superficie plaquetaria, la hidrofobicidad de los residuos aminoacídicos que lo conforman y la accesibilidad del epitopo.

d. 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.

Dicha respuesta contra el HPA-1a es la mejor caracterizada. Si bien el 5-10% de las mujeres HPA-1a negativas con fetos HPA-1a positivos producen anti-HPA-1a, la presencia del alelo DRB3*0101 incrementa el riesgo de aloinmunización por un factor 140.⁷⁵ En cambio, la respuesta contra el alelo HPA-1b no parece estar condicionada por el fenotipo HLA de clase II.⁷⁶ Esto indicaría que las células presentadoras de antígenos requieren la molécula HLA-DRB3*0101 para presentar los péptidos derivados del HPA-1a y que la leucina en posición 33 (que define al antígeno HPA-1a) esta involucrada en la unión del péptido al nicho de la molécula HLA de clase II. Esto ha sido corroborado por ensayos in vitro donde se ha demostrado que la leucina se une de hecho a la molécula de HLA-DRB3*0101.⁷⁷ La forma con prolina 33 no se une a la molécula de HLA II y demostraría la rareza de la aloinmunización contra este antígeno.

A nivel poblacional este factor y la probabilidad de incompatibilidad feto-materna condicionarían sinérgicamente la frecuencia de aloinmunización. Esto se observa en la población japonesa, donde la baja frecuencia del alelo HLA-DRB3*0101 (3.8%) y las altas frecuencias del alelo HPA-1a, toman la aloinmunización contra el antígeno HPA-1a excepcional.

Hay menor evidencia, que la respuesta contra el HPA-5b, está también bajo control genético.⁷⁸⁻⁸⁰ Existen trabajos que relacionan una mayor tasa de aloinmunización HPA-1a⁸¹ y HPA-5b⁷⁹ a ciertos alelos TAP1 y TAP2. Hasta el momento, la información disponible es escasa y sugiere una asociación débil.

e. Factores dependientes de la vía de inmunización

En Caucásicos, el anti-HPA-1a es la especificidad de anticuerpos más frecuentemente asociada a TFNA, mientras que el anti-HPA-1b y anti-HPA-5b prevalecen entre los pacientes politransfundidos.⁸² No se ha aclarado hasta el momento las causas de esta diferencia.

I. Implicaciones clínicas de los polimorfismos HPA

a. 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.⁸³ Este proceso ocurre generalmente en el bazo y resulta en trombocitopenia. Estos 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.

Los citados aloanticuerpos pueden causar los cuadros clínicos que se describen a continuación: refractariedad a la transfusión de plaquetas (PTR), trombocitopenia feto-neonatal aloinmune (TFNA), púrpura posttransfusional (PTP) y la trombocitopenia aloinmune pasiva postransfusional.

i. Refractariedad a la transfusión de plaquetas

Las transfusiones de plaquetas son efectivas para disminuir las complicaciones hemorrágicas de la trombocitopenia grave. Pueden suministrarse terapéuticamente a pacientes con sangrado activo o profilácticamente a pacientes con trombocitopenia secundaria a fallo medular. Una hemorragia grave espontánea es difícil que ocurra con recuentos mayores a 10000/ μ l y este valor ha sido generalmente adoptado como nivel para pacientes estables sin sangrado.

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.^{75,84} 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.^{85,86} 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.⁸⁷ 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.

En caucásicos el 95% de los casos son debidos a aloimmunización contra los antígenos HPA-1a y HPA-5b.⁸⁵ Esta respuesta generalmente involucra la producción de anticuerpos IgG1.^{67,88} En orientales es menos prevalente⁸⁹ y ocurre principalmente asociado a HPA-4b³⁵ y HPA-5b. El feto/neonato puede sufrir complicaciones hemorrágicas, la más grave es la hemorragia intracraneal.⁸⁵ 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.

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%^{78,90} 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.⁹¹⁻⁹³ 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.

b. Asociada a cambios en la funcionalidad

Debido al papel preponderante de las glicoproteínas (GP) plaquetarias en la funcionalidad de las plaquetas, no es extraño, que polimorfismos que afectan la expresión o la actividad de estas, puedan influenciar el curso y pronóstico de enfermedades que involucran a la hemostasia.

Existen numerosos estudios epidemiológicos que relacionan varios polimorfismos en las GP plaquetarias, entre ellos, algunos HPAs, con el riesgo aumentado de enfermedad coronaria arterial e infarto de miocardio en individuos

jóvenes. Al igual que los estudios de agregometría in vitro, muchos resultados son conflictivos.

Si bien esta nueva área de la genómica humana debe ser evaluada muy detenidamente, ya existe evidencia substancial de que el alelo HPA-1b, los alelos GPIIb Met₁₄₅ (VNTR A o B) y especialmente el alelo 807T de la integrina α_2 contribuyen al riesgo de infarto agudo de miocardio en individuos jóvenes (< 60 años) y al desarrollo de la retinopatía diabética.² Se espera para los futuros años una evaluación del riesgo acumulativo o efecto sinérgico de estos factores de riesgo plaquetario junto con otros bien definidos en un gran número de patologías muy prevalentes.

J. Frecuencias poblacionales de los polimorfismos HPA.

Como ya se comentó, las frecuencias fenotípicas y génicas de los aloantígenos plaquetarios humanos han sido determinadas en diversas poblaciones y se han observado diferencias claras en la prevalencia de algunos antígenos entre ellas, fundamentalmente entre caucásicos, orientales, africanos y amerindios.

Hay consenso en que las poblaciones estudiadas pueden agruparse por similitudes en sus frecuencias alélicas HPA en dos grandes “*clusters*”. En uno de ellos se encuentran a las poblaciones caucásicas y en el otro a las orientales y amerindias.

El grupo caucásico se caracteriza por poseer frecuencias relativamente altas del alelo “b” de los sistemas HPA-1.-2.-3, y -5. En cambio, para los sistemas HPA-4 y HPA-6, la frecuencia del alelo “b” es muy baja o inexistente.

El grupo oriental presenta un patrón antigénico muy distinto, con frecuencias alélicas “b” significativamente menores que en caucásicos para los sistemas HPA-1,-3 y -5 y frecuencias significativamente mayores del alelo “b” para los sistemas HPA-4 y HPA-6.

Estas diferencias tienen una buena correlación con la epidemiología de la trombocitopenia feto-neonatal aloinmune, en lo que respecta a la prevalencia y las especificidades antigénicas involucradas.⁸⁹

Conocer las frecuencias alélicas HPA en una población dada, es esencial para⁹:

- a. El diagnóstico de las trombocitopenias aloinmunes.
- b. Diseñar programas de cribaje de mujeres embarazadas con riesgo elevado de TFNA.
- c. Dar consejo genético.
- d. La búsqueda de hemocomponentes compatibles para pacientes con anticuerpos anti-HPA.

K. Demografía Argentina

a. Población general

La República Argentina es un país ubicado en el extremo sur de América organizado como una república representativa y federal. Por su extensión, es el segundo estado de América del Sur y el octavo en todo el planeta. Su superficie continental es de 2.780.400 Km². Limita al norte con Bolivia y Paraguay, al nordeste con Brasil, al este con Uruguay y el Océano Atlántico y al sur y al oeste con Chile. Según el censo poblacional, en 2001, la República Argentina contaba con 36.260.130 habitantes. En la Tabla 3 se desglosa el número de habitantes por provincia.

Hasta la llegada del conquistador español, la actual región de la Argentina estaba habitada por grupos amerindios. Debido al reducido número de conquistadores, adelantados y tropas que llegaron a estas regiones hasta inicios de 1700, el impacto poblacional inicial de los europeos fue limitado.

A partir del siglo XIX y hasta mediados del siglo XX, la Argentina recibe masivamente a inmigrantes europeos, en su mayoría provenientes de Italia y España. La primera gran oleada de inmigrantes tuvo lugar entre 1870 y 1930. Durante esos años llegaron casi 4 millones de personas, pero sólo permaneció en el país el 54%. El 46 % de los inmigrantes eran italianos y el 34 % españoles pertenecientes a los estratos sociales más pobres de su país de origen. El segundo gran ingreso de inmigrantes fue entre 1947 y 1954: el país recibió 770.000 inmigrantes, de los que se radicaron el 74%, siendo el 58 % de origen italiano y el 25% español.

Desde 1955 hasta la fecha cambia la magnitud y la composición de las migraciones, incrementándose la migración de países limítrofes. A partir de los censos de población se puede obtener información sobre la nacionalidad y la ascendencia de la población (entendida como la nacionalidad de los padres). Entre 1895 y 1914 los extranjeros representaban entre el 25% y 30% de la población total. En 1914 el 30% de los pobladores era inmigrante y el 35% hijo de

inmigrantes. En 1936 el 64% de los jefes de familia residentes en la ciudad de Buenos Aires era extranjero y el 36% nativos de la Argentina (el 11,4% tenía ambos padres nativos, el 7% tenía padres mixtos y el 18% tenía padres extranjeros). La consecuencia más impactante del ciclo cerrado en 1930 fue la notable disminución relativa del tipo étnico preponderante en la población argentina antes del impacto inmigratorio y su reemplazo por otra población relativamente homogénea desde ese punto de vista (dado que en su mayoría era de origen italiano). Para el año 1991 el porcentaje de extranjeros en la población total es del 6,8%, con un tercio de ellos provenientes de los países limítrofes. Estas cifras destacan la importancia de la ascendencia extranjera entre la población.

Puede aceptarse que en 1990, después de un prolongado lapso sin recepción migratoria transoceánica, al menos 2/3 de la población de las grandes ciudades argentinas debía ser de ascendencia europea (es decir, tenía al menos un abuelo de ese origen).⁶

La idea que el componente aborígen es actualmente muy pequeño, sustentó la autoproclamación de la Argentina como el país europeo de Latinoamérica. Varios estudios moleculares recientes han cuestionado esto último. El más impactante e importante por diseño y extensión, fue el dirigido por el Dr. Corach del Servicio de Huellas Digitales Genéticas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. En el se analizaron marcadores uniparentales en 12.000 individuos en 11 provincias Argentinas y se concluyó que el 56% de la población Argentina tiene antepasados indígenas (el 10% es indígena puro sin ningún componente europeo y el 46% mestizos). Según este estudio, el 44% restante sería de origen mayoritariamente europeo.

Similares resultados fueron descritos para la ciudad de La Plata por el equipo del Departamento de Genética Molecular Poblacional de La Plata⁹⁴, donde también utilizando marcadores uniparentales, estimaron el componente materno amerindio en 45,6%, mientras que el paterno fue mucho más bajo, sólo un 10,6%. Sobre la misma muestra, pero utilizando marcadores autosómicos biparentales, como los HPA pero más polimórficos, encontraron una contribución estimada al

pool génico de la ciudad de La Plata de 67,6% de genes europeos, 25,9% de genes amerindios, y 6,5% de genes africanos.

Para la ciudad de Buenos Aires se obtuvieron resultados equivalentes sobre una muestra de 218 individuos no relacionados⁹⁵: un 15,8% de los individuos tiene marcadores biparentales amerindios y 4,3 % de los habitantes de Buenos Aires y del cono urbano tiene marcadores genéticos africanos.

Como se desprende de estas cifras, el aporte amerindio al pool genético de la población mayoritaria argentina es incuestionable.

Tabla 3. Población argentina total y según provincia

Total País según provincia. Población total, población en hogares y población en instituciones colectivas. Año 2001

Provincia	Población		
	Total	En hogares (1)	En instituciones colectivas
Total	36.260.130	35.927.409	332.721
Ciudad de Buenos Aires	2.776.138	2.725.488	50.650
Buenos Aires	13.827.203	13.708.902	118.301
24 Partidos del Gran Buenos Aires	8.684.437	8.639.451	44.986
Resto de la Provincia de Buenos Aires	5.142.766	5.069.451	73.315
Catamarca	334.568	331.635	2.933
Chaco	984.446	978.882	5.564
Chubut	413.237	405.594	7.643
Córdoba	3.066.801	3.028.943	37.858
Corrientes	930.991	925.924	5.067
Entre Ríos	1.158.147	1.149.418	8.729
Formosa	486.559	484.261	2.298
Jujuy	611.888	608.402	3.486
La Pampa	299.294	296.110	3.184
La Rioja	289.983	288.407	1.576
Mendoza	1.579.651	1.566.902	12.749
Misiones	965.522	960.002	5.520
Neuquén	474.155	467.857	6.298
Río Negro	552.822	545.687	7.135
Salta	1.079.051	1.070.527	8.524
San Juan	620.023	616.484	3.539
San Luis	367.933	365.255	2.678
Santa Cruz	196.958	192.851	4.107
Santa Fe	3.000.701	2.976.384	24.317
Santiago del Estero	804.457	800.591	3.866
Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur	101.079	99.356	1.723
Tucumán	1.338.523	1.333.547	4.976

(1) Se incluye la población censada en la calle.

Fuente: INDEC. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2001.

b. Los amerindios

Una buena parte de los antropólogos actuales apoya la hipótesis de que los ancestros de los indígenas americanos llegaron a América desde Asia a través del estrecho de Bering entre 30.000 y 12.000 años atrás en varias oleadas migratorias. Tanto Siberia como Mongolia^{96,97} son los lugares más probables de su origen en Asia. Esta afirmación se basa en semejanzas culturales, morfológicas y genéticas entre poblaciones americanas y asiáticas.⁹⁸

Los parecidos genéticos, lingüísticos y culturales a ambos lados del estrecho de Bering han sido explicados por un modelo en los que los esquimales son los últimos inmigrantes, mientras que los Dené representan la penúltima inmigración. El resto de los amerindios, quienes viven más al sur, son genéticamente y lingüísticamente más distantes de los asiáticos del noreste, de manera que son considerados descendiente de los primeros inmigrantes que atravesaron presumiblemente el estrecho de Bering congelado al final de la última era de hielo.^{99,100}

Menos importante es la ruta transpacífica desde Asia o la Polinesia, sugerida por la presencia de cepas del virus HTLV-1 de idéntica secuencia en Japón y en el norte de las costas de Sudamérica¹⁰¹ y también por algunos alelos HLA que pudieron ser introducidos por la misma ruta transpacífica.¹⁰² Finalmente, evidencias genéticas¹⁰³ y arqueológicas¹⁰⁴ sugieren que la ruta de dos vías transatlántica ocurrió antes de que Colon descubriese América.

c. Los grupos étnicos en la Argentina

Desde la década del 50 ha quedado clara la imposibilidad de dividir al mundo en sociedades discretas a las cuales les corresponderían culturas discretas, y menos aún poblaciones discretas. Se utiliza el término “grupo étnico” para referirse a una minoría cuya herencia cultural se reconoce como diferente de la mayoritaria en formas que la separan de la cultura dominante nacional. El único criterio para la caracterización actual de los grupos étnicos es el de la identificación, es decir, pertenecen a cada grupo los que se auto identifican como tales.

En América Latina se reconocen 409 grupos aborígenes, algunos de ellos con escasos representantes y otros que superan el cuarto de millón.

En la Argentina, menos del 1% de la población se reconoce perteneciente a los pueblos originarios.¹⁰⁵ La encuesta complementaria de pueblos indígenas que

realizó el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) entre los años 2004 y 2005, señaló la presencia de 318.683 aborígenes en el territorio argentino.

Son diversos los grupos étnicos que conforman nuestros pueblos originarios (ver Tabla 4, página 57). En la actualidad, algunos de ellos están extintos a causa de acciones genocidas y de los procesos de aculturación, como es el caso de los grupos que habitaban el extremo sur del continente: alacalufes, yaganes y tehuelches. Otros, como los mapuches, hoy reducidos a la provincia de Neuquén, extendían su territorio en el siglo pasado desde el océano Pacífico al Atlántico. En las provincias de Tucumán y Catamarca se ubica al grupo diaguítico-calchaquí. Los grupos de habla aymara y quechua del área andina (Bolivia, Perú y Ecuador) en nuestro país se encuentran en las provincias de Jujuy, Salta y Santiago del Estero. Pertenecientes a este grupo, los kollas constituyen uno de las etnias más numerosas. El extremo occidental de las provincias de Salta y Jujuy está habitado por dos grupos amazónicos fusionados, uno de origen guaraní (los chiriguano) y otro arawak (los chané). El complejo **toba**-mataco-chiriguano corresponde a los grupos más numerosos de la zona del Gran Chaco argentino. Existen otros grupos étnicos pertenecientes a la misma familia lingüística cuyos componentes apenas superan el millar. La familia Guaycurú se halla representada por tobas, pilagás y mocovíes. Los guaraní-caingú habitan la provincia de Misiones. A la familia mataco-mataguayo pertenecen los grupos mataco, chorote y chulupí, habitantes del oeste de las provincias de Chaco y Formosa y del este de la provincia de Salta.

Tabla 4. Población indígena por pueblos de pertenencia

Población indígena por pueblos de pertenencia	
Pueblos y provincias de residencia	Población
TOTAL	318.683
Mapuche en Chubut, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego	76.423
Kolla en Jujuy y Salta	53.019
Toba en Chaco, Formosa y Santa Fe	47.591
Wichí en Chaco, Formosa y Salta	36.135
Guaraní en Jujuy y Salta	29.703
Diaguíta calchaquí en Jujuy, Salta y Tucumán	13.773
Huarpe en Mendoza, San Juan y San Luis	12.704
Mocoví en Chaco y Santa Fe	12.145
Diaguíta/diaguíta calchaquí en Catamarca, Córdoba, La Rioja, Santa Fe y Santiago del Estero	5.967
Comechingón en Córdoba	5.119
Rankulche en La Pampa	4.573
Tehuelche en Chubut y Santa Cruz	4.300
Mbyá guaraní en Misiones	4.083
Pilagá en Formosa	3.948
Guaraní en Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Santa Fe	2.965
Chorote en Salta	2.147
Chané en Salta	2.097
Charrúa en Entre Ríos	676
Tapiete en Salta	484
Chulupí en Formosa y Salta	440
Ona en Tierra del Fuego	391

Fuente: INDEC. Encuesta Complementaria de Pueblos Indígenas 2004-2005.

d. La etnia toba (Qom)

Los tobas son un grupo de la rama lingüística Guaycurú que vive en el área chaqueña (provincias de Chaco, Formosa y Santa Fe, ver la Figura 6 en la página 58). Antiguamente eran cazadores-recolectores, y se organizaban en bandas nómades y exógamas. Hoy en día, una gran parte de ellos se halla establecida en comunidades sedentarias agrícolas. También existen en la actualidad asentamientos tobas en los centros urbanos de Resistencia, Formosa, **Rosario**, La Plata y Buenos Aires. Desde los años sesenta una gran cantidad de aborígenes comenzaron a migrar a dichas ciudades principalmente en busca de mejores condiciones de vida.

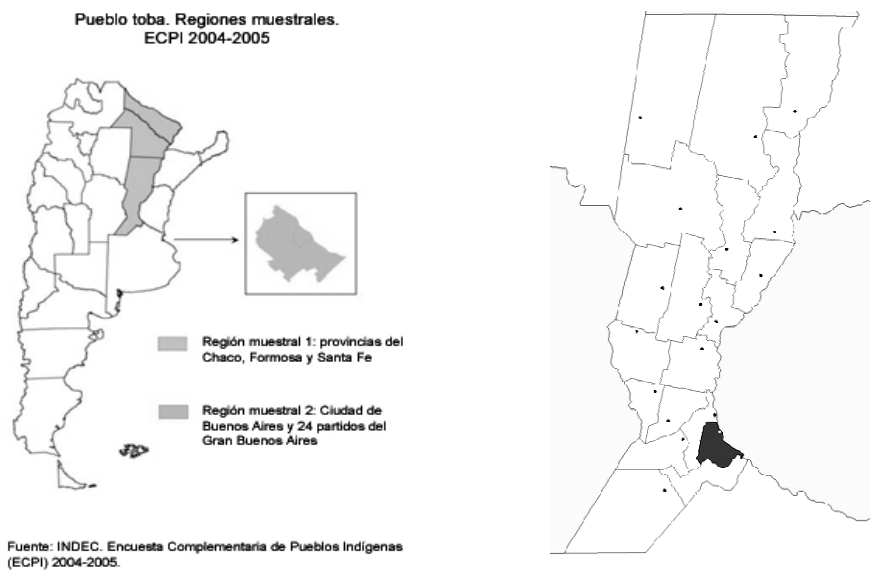


Figura 6. Izquierda: Argentina, sombreadas las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa. Derecha: Provincia de Santa Fe y sombreada la ciudad de Rosario.

e. Los tobas en Rosario (Provincia de Santa Fe)

Rosario, es una ciudad del centro-este de Argentina, cabecera del departamento homónimo. Con 1.118.905 de habitantes (censo 2001) es la más populosa de la provincia de Santa Fe. Constituye un relevante puerto, sobre la margen occidental del caudaloso río Paraná, a 305 Km. al noroeste de Buenos Aires, la capital argentina, y es uno de los principales centros urbanos de la nación. Junto a otras localidades, forman el área metropolitana del Gran Rosario, la tercera aglomeración del país.

El 71% de sus residentes nacieron en la ciudad de Rosario, el 16% provienen de otras provincias del país y el 9% de otras localidades de la provincia. El resto son extranjeros (de Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay, Brasil, Corea y China).

La mayoría son descendientes de italianos y españoles existiendo también de otras nacionalidades. Además, desde hace años Rosario recibe un importante flujo de migración interna, principalmente de la provincia de Chaco (noreste del país) y de la etnia aborígen toba. En la actualidad la presencia de aborígenes tobas

en la ciudad de Rosario supera ampliamente las mil familias, distribuidas en varios asentamientos periféricos. Los más importantes son los de Empalme Graneros (Avda. de la Travesía), Los Pumitas en la zona noroeste y el Barrio Municipal en la zona sudoeste, Villa Banana y Bella Vista, en el oeste y en la vecina localidad de Granadero Baigorria.

Estos asentamientos están conformados por grupos estables, con varios años de permanencia y por familias o individuos recién llegados. Las migraciones entre su lugar de origen y su asentamiento actual son constantes. Cada individuo-familia se reconoce como perteneciente a alguna de las distintas parcialidades (hablantes de distintas variedades de la lengua toba: rapigemlek, lañaGasik, no'olGanaq, etc.). En general provienen de zonas rurales y de asentamientos urbanos de la provincia de Chaco, especialmente de las zonas de Castelli y Roque Sáenz Peña.

Las comunidades tobas de la ciudad viven en condiciones de extrema pobreza (la mayoría habita en zonas marginales y carece de empleos estables), agravada por las distancias lingüísticas, culturales y sociales presentes entre la sociedad nacional y esta minoría. Entre las razones que explican la permanente afluencia de aborígenes a la ciudad de Rosario están el acceso a la asistencia médica en los hospitales públicos y una comida diaria para sus hijos en los comedores escolares. Esto es mucho más de lo que estaban acostumbrados a recibir en Chaco, de forma tal que el acceso a estos "bienes" favorece su instalación permanente en el lugar. Otro recurso de subsistencia es la venta de artesanías: cerámica, cestería y algunos textiles. En Rosario, la comunidad tiene para estos productos un mercado mucho mayor que en Chaco. En el largo plazo, el recurso fundamental terminó siendo el procesamiento de la basura. Por un lado, en los desechos domiciliarios los tobas van a encontrar sobras y restos de alimentos que a veces se convierten en su principal comida diaria. Por otro lado, los provee de vestimenta, calzado y de un ingreso monetario regular. En efecto, los cartones y envases de vidrio y aluminio, recolectados pacientemente y vendidos a precio irrisorio para su reciclado, posibilitan un aporte económico que reemplaza al que antiguamente proveía la cosecha de algodón en el Chaco.¹⁰⁶

Es importante destacar que la comunidad estudiada posee características endogámicas –término aplicado a ciertas costumbres que se practican en algunas sociedades, en las que un miembro de una comunidad, tribu, clan o unidad social contrae matrimonio con otra persona del mismo grupo étnico-social, produciéndose un muy escaso acercamiento con la comunidad no toba, hecho que se evidencia en los que viven en Rosario, así como también en los que lo hacen en sus lugares de origen.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estimar, en la población mayoritaria y en el grupo minoritario aborigen toba de la ciudad de Rosario, Argentina, las frecuencias de los antígenos plaquetarios específicos (HPA) con relevancia clínica y analizar el riesgo de aloinmunización a los mismos asociado al embarazo y a la transfusión.

Los objetivos específicos son:

- A. Estimar las frecuencias génicas y genotípicas de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 en la población mayoritaria de la ciudad de Rosario.
- B. Estimar las frecuencias génicas y genotípicas de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 en la población de amerindios tobas provenientes del norte de la Argentina.
- C. Comparar las frecuencias estimadas de ambas poblaciones entre sí y con las publicadas para otras poblaciones y ubicarlas con respecto a las cercanías genéticas.
- D. Analizar las implicaciones transfusionales y obstétricas de los resultados obtenidos para ambas poblaciones caracterizadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Aspectos éticos

Antes de comenzar el trabajo de campo, se obtuvo la aprobación del plan de trabajo por el comité de bioética de la Asociación Médica Argentina (AMA).

B. Diseño y cálculo de la muestra

Se resolvió medir las frecuencias génicas de los Sistemas HPA en una población donde se ha dado un complejo flujo migratorio, continuo y sistemático.

En el presente estudio hemos analizado muestras de sangre obtenidas de individuos adultos nacidos en territorio argentino y residentes en la ciudad de Rosario de tres fuentes:

- Donantes de Sangre.
- Personal hospitalario.
- Población aborigen toba.

Los donantes y el personal hospitalario caracterizados pertenecen a una misma población, la mayoritaria de la ciudad de Rosario, descendiente de italianos y españoles.

La población caracterizada de aborígenes tobas representa a los descendientes de los pobladores originales previos a la conquista española.

El número mínimo de individuos necesario para estimar las frecuencias alélicas para los sistemas HPA clínicamente más significativos (HPA-1, -3 y -5) fue establecido en base al número de individuos caracterizados en estudios similares realizados en otras poblaciones, la recomendación de expertos y el cálculo *a priori* con una confianza del 95% y un error aceptado del 5% utilizando el programa EPIDAT 3,1* bajo la hipótesis del parecido con poblaciones ya caracterizadas.

a. Población mayoritaria:

Por ser su población la que más aportó con su inmigración a la Argentina y poseer frecuencias esperadas para la “media europea” en los sistemas HPA, se postuló para la población de Rosario frecuencias alélicas similares a las descritas en Italia¹⁰⁷ para los sistemas HPA-1, -3, y -5.

Se elige para el cálculo las condiciones más exigentes, es decir aquellas que requieren una mayor cantidad de individuos caracterizados. En este caso, se da para la determinación de las frecuencias alélicas para el sistema HPA-3.

Tamaño poblacional:	2000000
Proporción esperada:	61,0% o 39,0%
Nivel de confianza:	95,0%
Efecto de diseño:	1,0
Precisión (%)	Tamaño de muestra
-----	-----
5,000	366

Estadísticamente se requiere evaluar 366 cromosomas (183 individuos). Este valor es prácticamente el doble al número de individuos caracterizados en la mayor parte de las descripciones poblacionales.

b. Aborígenes tobas:

Debido a la conservación de los caracteres HPA en todas las poblaciones amerindias descritas y a resultados recientes que describen en el pool genético de este grupo étnico un aporte europeo de solo 4%¹⁰⁸, se postuló en la población de aborígenes toba frecuencias para los sistemas HPA-1, -3 y HPA-5 similares a las descritas en otras poblaciones amerindias caracterizadas del Amazonas.^{4,109}

Se elige para el cálculo las condiciones más exigentes, es decir aquellas que requieren una mayor cantidad de individuos caracterizados. También en este caso, se da para la determinación de las frecuencias alélicas para el sistema HPA-3.

Tamaño poblacional:	140000
Proporción esperada:	75,7% o 24,3%
Nivel de confianza:	95,0%
Efecto de diseño:	1,0
Precisión (%)	Tamaño de muestra
-----	-----
5,000	282

Estadísticamente se requiere evaluar 282 cromosomas (141 individuos) para lograr una precisión del 5% en la estimación de las frecuencias alélicas del sistema HPA-3 en la población amerindia.

Debido a su cuasi-monomorfismo, el número de individuos aborígenes necesarios para caracterizar las frecuencias alélicas en los sistemas HPA-1,-2,-4,-5 y -6 es marcadamente menor que para los sistemas HPA-3 y -15.

C. Individuos estudiados

a. Donantes de Sangre

El primer grupo consistió en 149 individuos adultos sanos (100 hombres y 49 mujeres), no emparentados, donantes de sangre del Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Italiano Garibaldi (HIG) de la ciudad de Rosario, Argentina. Para preservar el anonimato, las muestras fueron codificadas.

Criterios de inclusión

- Gozar de buena salud y haber realizado una donación de sangre.
- Vivir en la ciudad de Rosario o dentro de un radio de 50 kilómetros.
- Aceptar expresamente su participación firmando el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Debido a que los donantes de los Bancos de Sangre de la ciudad de Rosario son, en su mayor parte, intrafamiliares o del entorno del enfermo^{110,111}, es frecuente que individuos emparentados concurren simultáneamente. Para minimizar este sesgo, se excluyeron:

- Donantes que refirieron consanguinidad con un donante ya reclutado para el estudio (es decir, que ambos hubieran donado para el mismo paciente).
- Donantes que quince días antes y después de la donación compartiesen apellidos, dirección y/o teléfono (para lo que se cruzó la información de la base de datos).

b. Personal Hospitalario

El segundo grupo consistió en 43 individuos adultos sanos (13 hombres y 30 mujeres) no relacionados, seleccionados entre el personal médico, enfermero y administrativo del Hospital Italiano Garibaldi. Para preservar el anonimato de los individuos estudiados las muestras fueron codificadas.

Criterios de inclusión

- Gozar de buena salud y estar dispuesto a donar Sangre.
- Vivir en la ciudad de Rosario o dentro de un radio de 50 kilómetros.
- Aceptar expresamente su participación firmando el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Referir consanguinidad con un individuo ya reclutado para el estudio.

En concordancia con los datos censales, sólo 2 de los 192 individuos (1%) incluidos en el estudio refirieron tener un pariente sanguíneo aborígen.

c. Aborígenes tobas

El tercer grupo estuvo compuesto por 27 aborígenes tobas, sanos y no relacionados entre sí. En el momento del estudio todos vivían en los barrios “Los Pumitas” y “la Travesía” de la ciudad de Rosario. Todos ellos habían nacido en la Provincia de Chaco, siendo sus cuatro abuelos tobas, hablan la lengua toba y no encontraron la presencia de ningún caucásico en la genealogía familiar. También en ellos, para preservar el anonimato de los individuos estudiados se codificaron sus muestras.

Para lograr este número se entrevistaron a 72 individuos, de los cuales, muchos se negaron a participar luego de la entrevista por aprehensión a la flebotomía y otros fueron excluidos fundamentalmente por consanguinidad. Este trabajo demandó la presencia durante las entrevistas de la antropóloga que trabajó con el grupo aborígen durante varios años.

Criterios de inclusión:

- Autodefinirse como aborígen toba.
- Gozar de buena salud.
- Vivir en la ciudad de Rosario.

- Aceptar expresamente su participación firmando el consentimiento informado.
- Ser mayor de 18 años.

Criterios de exclusión:

- Consanguinidad con individuos anteriormente reclutados.

D. Métodos

a. Obtención de la muestra de sangre entera

En el caso de los donantes, la muestra de sangre entera fue obtenida luego de:

- la entrevista explicativa de los estudios a realizar
- la obtención del consentimiento informado
- los resultados de la analítica de rutina.

Para ello se transfirieron 1350 μ l de sangre periférica del tubo anti-coagulado con EDTA- Na_2 extraído de rutina a tres tubos eppendorf y se congelaron a -70°C .

En el caso del personal del hospital y de los aborígenes tobas, se procedió de igual forma, excepto en la realización de una flebotomía de 2 ml de sangre entera, innecesario en el caso de los donantes.

b. Extracción del ADN genómico

El ADN fue obtenido de 450 μ l de sangre recogida con EDTA utilizando para su extracción indistintamente el método clásico de Fenol-cloroformo¹¹², y dos kits de extracción disponibles comercialmente, el “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) y el “Genomic DNA Purification System” (Wizard, Promega, Madison). El ADN extraído fue disuelto en una cantidad apropiada de agua. Posteriormente fue analizado por espectrofotometría para comprobar su concentración y calidad, y almacenado a -20°C hasta su empleo.

c. Cuantificación del ADN

Se determinó la absorción ultravioleta (UV) a 260 nm del ADN extraído y se calculó el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN doble cadena. El contenido de ADN también se evaluó en gel de agarosa al 0.8% en tampón TBE 0.5X con solución de bromuro de etidio. La separación se realizó durante 5 minutos a 10 V y se observó al

transiluminador UV, comparando la intensidad de la fluorescencia con la emitida por testigos de concentración conocida.

d. Evaluación de la calidad del ADN

Se determinó, también la absorción de la luz UV a las longitudes de onda de 230 y 280 nm. La relación $\text{abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ permitió evaluar la presencia de proteínas en la muestra y la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ determinar la existencia de sales en la solución.

e. ADN de referencia

Para la validación de la PCR-SSP utilizadas para genotipar los sistemas HPA -1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 se trabajó con un panel de muestras de ADN de individuos homo y heterocigotos para los alelos de cada sistema, a excepción del alelo HPA-6b. La imposibilidad de disponer de ADN de individuos con el excepcional genotipo HPA-6b/6b se solucionó con la utilización de un plásmido artificial como control positivo.

f. Protocolos de amplificación PCR-SSP

Todas las amplificaciones se realizaron con un volumen final de reacción de 25 μl . Se amplificaron regiones monomórficas de los genes que codifican para la proteína C reactiva (CRP) y para la hormona de crecimiento humana (HGH) como controles internos en cada tipaje HPA-1,-2,-3,-5 y -15, y HPA-4 y -6 respectivamente.

La tipificación de los sistemas **HPA-1,-2 y -3** se efectuó con una técnica PCR-SSP “múltiplex”, con ligeras modificaciones de la descrita originariamente por Klüter et al. en 1996. El mezcla se preparó de la siguiente manera: 2,5 μl de tampón *Taq* 10X (Ecotaq, Ecogen, Barcelona, España), 1 μl de cada dNTPs (40mM), 0,75 μl de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μl de los dos cebadores internos control (CRP-I y CRP-II), 0,75 μl de los dos cebadores para HPA-1, 0,5 de los HPA-2 y 0,5 de los HPA-3 y 15,3 μl de H_2O . Seguidamente, 1 μg de ADN y 1U de *Taq*

polimerasa (Ecotaq). En un termociclador programable y después de un único paso de desnaturalización a 94°C de 10 minutos, se realizaron 10 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 segundos), *annealing* (65°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 30 segundos). Seguidamente se realizaron 22 ciclos de desnaturalización (95°C, 1 minuto), *annealing* (58°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 30 segundos). Para finalizar se realizó una extensión a 72°C por 4 minutos.

Para el sistema **HPA-5** las volúmenes de las soluciones de trabajo de los cebadores control (0,1 µl) y de los cebadores HPA-5 (0,44 µl) fueron diferentes a los usados en la multiplex usada para genotipar los sistemas HPA-1,-2-3, pero el resto de las condiciones de ciclado fueron idénticas. La única razón por la que se realizó por separado fue para evitar el solapamiento de las bandas específicas.

Las condiciones de la PCR-SSP para el sistemas **HPA-4**, presentó ligeras modificaciones de la descrita por Skogen et al. en 1994. Brevemente: Una mezcla de 25 µl de volumen final, se preparó de la siguiente manera: 2,5 µl de tampón Taq 10X (Ecotaq, Ecogen, Barcelona, España), 0,25 µl de cada dNTPs (40mM), 0,50 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,06 µl de los dos cebadores internos control, 0,50 µl de los dos cebadores para HPA-4 y 18,4 µl de H₂O. Seguidamente, 1 µg de ADN y 0,4U de Taq polimerasa (Ecotaq). Después de un único paso de desnaturalización a 94°C de 5 minutos, se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 segundos), *annealing* (65°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 30 segundos) en un termociclador programable. Una extensión final a modo de terminación a 72°C se realizó por 10 minutos.

Para el sistema **HPA-6**, se preparó la mezcla (25 µl de volumen final) de la siguiente manera: 2,5 µl de tampón Taq 10X (Ecotaq, Ecogen, Barcelona, España), 0,50 µl de cada dNTPs (40mM), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,12 µl de los dos cebadores internos control (HGH-1s y HGH-2as), 0,50 µl de los dos cebadores para HPA-6 y 18,9 µl de H₂O. Seguidamente, 1 µg de ADN y 0,4U de Taq polimerasa (Ecotaq). Después de un único paso de desnaturalización a 94°C de 5 minutos, se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 segundos), *annealing* (65°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 30 segundos) en un termociclador

programable. Una extensión final a modo de terminación a 72°C se realizó por 10 minutos.

Las condiciones de la amplificación para el sistema **HPA-15**, presentaron ligeras modificaciones de la descrita por Schuh et al. (2002). Una mezcla de 25 μ l de volumen final, se preparó de la siguiente manera: 2,5 μ l de tampón Taq 10X (Ecotaq, Ecogen, Barcelona, España), 1 μ l de cada dNTPs (40mM), 0,75 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0,18 μ l de los dos cebadores internos control, 0,62 μ l de los dos cebadores para HPA-15 y 16,85 μ l de H₂O. Seguidamente, 1 μ g de ADN y 1U de Taq polimerasa (Ecotaq). Después de un único paso de desnaturalización a 94°C de 10 minutos, se realizaron 10 ciclos de desnaturalización (98°C, 1 minuto), *annealing* (57°C, 2 minutos) y extensión (71°C, 1 minuto) en un termociclador programable. Una extensión final a modo de terminación a 71°C se realizó por 5 minutos.

Todas las soluciones de trabajo de los cebadores utilizados para la amplificación alelo específica tenían una concentración de 10 pmol/ μ l, excepto para los HPA-4 y -6 que tenían 20 pmol/ μ l.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores y tamaño del producto amplificado por PCR-SSP para cada alelo HPA

Alelo	Cebador	Secuencia del cebador	Tamaño producto (bp)	Ref.
HPA-1a HPA-1b	HPA-1a-I	5' ACT TAC AGG CCC TGC CTC T 3'	189	113
	HPA-1b-I	5' ACT TAC AGG CCC TGC CTC C 3'		
	HPA-1-II common	5' GTG CAA TCC TCT GGG GAG T 3'		
HPA-2a HPA-3a	HPA-2a-I	5' CCC CCA GG CTC CTG AC 3'	241	113
	HPA-2b-I	5' CCC CCA GGG CTC CTG AT 3'		
	HPA-2-II common	5' GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG 3'		
HPA-3a HPA-3b	HPA-3a-II	5' GGG GGA GGG GCT GGG GA 3'	293	113
	HPA-3b-II	5' GGG GGA GGG GCT GGG GC 3'		
	HPA-3-I common	5' GGC CCT GGG ACT GTG AAT G 3'		
HPA-4a HPA-4b	HPA-4a-I	5' GTG GCC ACCC CAG ATG G3'	252	114
	HPA-4b-I	5' CTG GCC ACC CAG ATG A3'		
	HPA-4-I common	5' GGT AGA AAG GAG CTA TAG TTT GGC3'		
HPA-5a HPA-5b	HPA-5a-I	5' AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG 3'	255	113
	HPA-5b-I	5' AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA 3'		
	HPA-5-II common	5' CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA 3'		
HPA-6a HPA-6b	HPA-6a-I	5' GAC GAG TGC AGC CCC CG 3'	250	114
	HPA-6b-I	5' GGA CGA GTG CAG CCC CCA 3'		
	HPA-6-I common	5' CCT ATG TTT CCC AGT GGT TGC A 3'		
HPA-15a HPA-15b	Govb sense	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGG 3'	225	24
	Gova sense	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGT 3'		
	GOV COM	5' ATGACCTTATGATGACCTATTC 3'		
HGH	HGH-1s	5' TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A 3'	434	114
	HGH-2as	5' CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC 3'		
CRP	CRP-I	5' CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG 3'	440	113
	CRP-II	5' GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA 3'		
HGH	HGH I sense	5' GCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	429	24
	HGH II antisense	5' TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'		

g. Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Al final de la amplificación, los productos fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa. 10 µl de producto de PCR fueron mezclados con 1 µl del tampón de separación y sometidos a una electroforesis en geles de agarosa al 2%. Un marcador del peso molecular del ADN fue cargado en un carril como referencia.

La electroforesis fue realizada en 100V por aproximadamente 30 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2 mg/l), visualizados y fotografiados con la película polaroid 667 bajo luz ultravioleta.

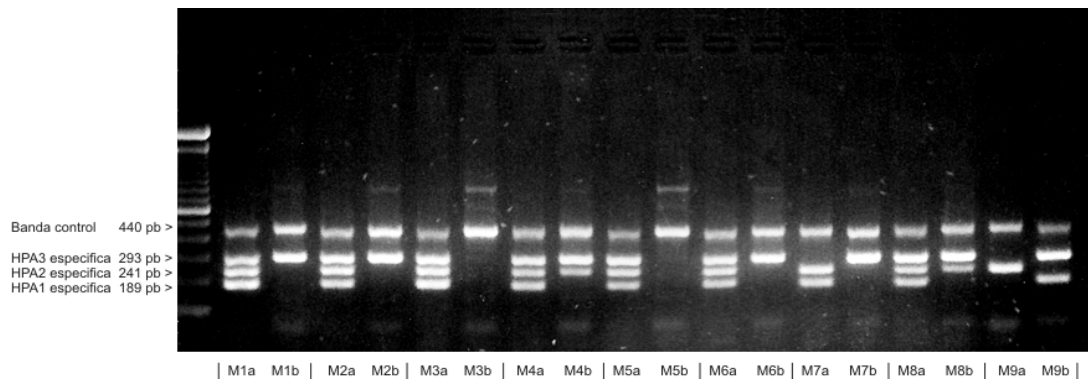


Figura 7. Genotipificación de los sistemas HPA-1,-2 y -3 por PCR-SSP. La banda control de 440 pb, muestra que la amplificación tuvo lugar. La presencia de los fragmentos de ADN de los correspondientes alelos (a y/o b) son visibles unicamente si los primers específicos son completamente complementarios a la secuencia blanco y se diferencian por su tamaño: HPA-1 (189 pb), HPA-2 (241 pb) y HPA-3 (293 pb). Interpretación: M1: 1a/1a, 2a/2a, 3a/3b. M2: 1a/a, 2a/2a, 3a/3b. M3: 1a/1a, 2a/2a, 3a/3a. M4: 1a/1a, 2a/2b, 3a/3b. M5: 1a/1a, 2a/2a, 3a/3a. M6: 1a/1a, 2a/2a, 3a/3b. M7: 1a/1a, 2a/2a, 3b/3b. M8: 1a/1a, 2a/2b, 3a/3b. M9: 1b/1b, 2a/2a, 3b/3b.

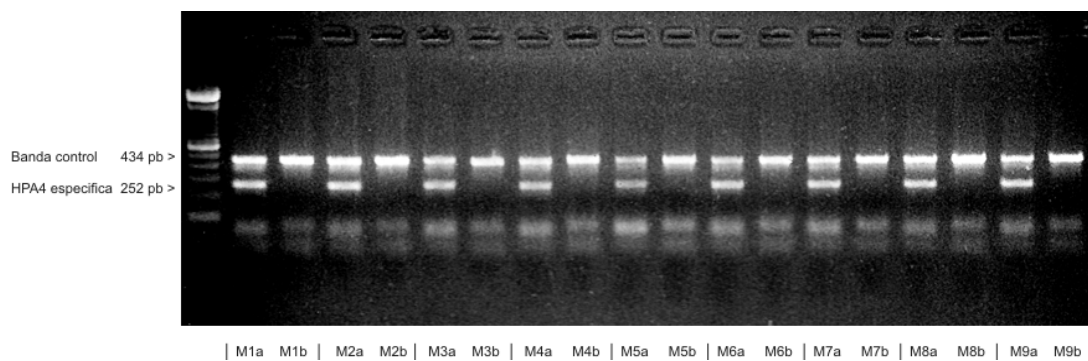


Figura 8. Genotipificación del sistema HPA-4 por PCR-SSP. La banda control de 434 pb, muestra que la amplificación tuvo lugar. La presencia del fragmento de ADN de 252 pb de los correspondientes alelos (a y/o b) son visibles unicamente si los primers específicos son completamente complementarios a la secuencia blanco. Interpretación: M1: 4a/4a. M2: 4a/4a. M3: 4a/4a. M4: 4a/4a. M5: 4a/4a. M6: 4a/4a. M7: 4a/4a. 8M: 4a/4a. M9: 4b/4b.

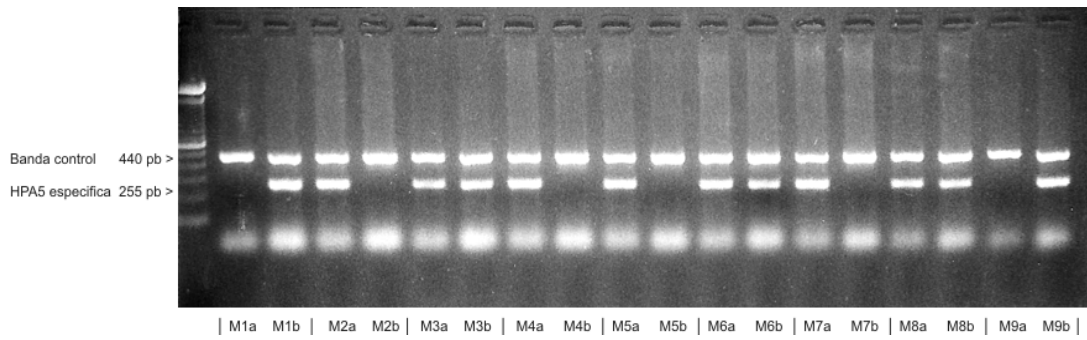


Figura 9. Genotipificación del sistema HPA-5 por PCR-SSP. La banda control de 440 pb, muestra que la amplificación tuvo lugar. La presencia del fragmento de ADN de 255 pb de los correspondientes alelos (a y/o b) son visibles unicamente si los primers específicos son completamente complementarios a la secuencia blanco. Interpretación: M1: 5b/5b. M2: 5a/5a. M3: 5a/5b. M4: 5a/5a. M5: 5a/5a. M6: 5a/5b. M7: 5a/5a. 8M: 5a/5b. M9: 5b/5b.

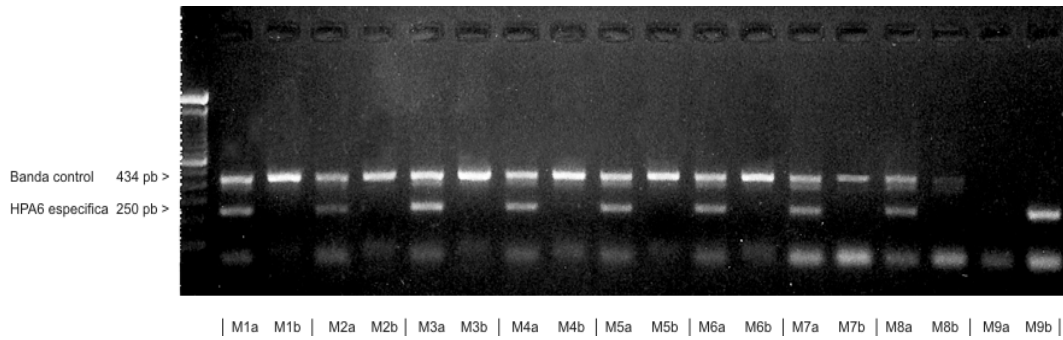


Figura 10. Genotipificación del sistema HPA-6 por PCR-SSP. La banda control de 434 pb, muestra que la amplificación tuvo lugar. La presencia del fragmento de ADN de 250 pb de los correspondientes alelos (a y/o b) son visibles unicamente si los primers específicos son completamente complementarios a la secuencia blanco. Interpretación: M1: 6a/6a. M2: 6a/6a. M3: 6a/6a. M4: 6a/6a. M5: 6a/6a. M6: 6a/6a. M7: 6a/6a. 8M: 6a/6a. M9: control 6b+ (Plásmido).

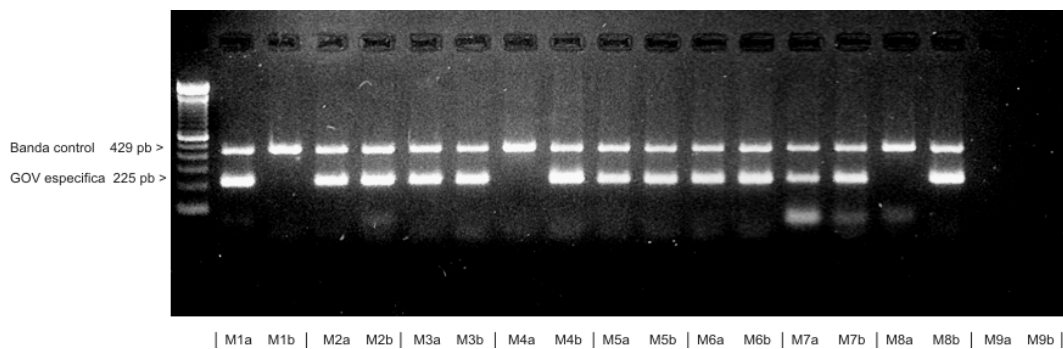


Figura 11. Genotipificación del sistema HPA-15 por PCR-SSP. La banda control de 429 pb, muestra que la amplificación tuvo lugar. La presencia del fragmento de ADN de 225 pb de los correspondientes alelos (a y/o b) son visibles unicamente si los primers específicos son completamente complementarios a la secuencia blanco. Interpretación: M1: 15a/15a. M2: 15a/15b. M3: 15a/15b. M4: 15b/15b. M5: 15a/15b. M6: 15a/15b. M7: 15a/15b. 8M: 15b/15b. M9: control negativo (agua destilada).

h. Genotipificación de los individuos

Los individuos fueron genotipados para cada sistema HPA como aa, ab o bb, en base al patrón de bandas observadas después de la electroforesis en agarosa del producto de las amplificaciones. Todas las reacciones de PCR-SSP realizadas fueron validadas empleando controles internos. Para que los resultados obtenidos para cada “run” (conjunto de muestras procesadas juntas) pudieran ser validados requirieron una perfecta concordancia entre los resultados obtenidos y los esperados para el ADN testigo procesado en paralelo con las muestras incógnitas. Esto aseguró la especificidad y reproductibilidad necesaria para un estudio poblacional con las características requeridas.

i. Fórmulas y métodos estadísticos utilizados.

a. Cálculo de frecuencias genotípicas:

Las frecuencias se definieron por conteo directo $frecuencia = G/n$, siendo G el número de individuos que presentaban el genotipo en cuestión y n el número total de individuos genotipados.

b. Cálculo de frecuencias alélicas:

Las frecuencias alélicas se definieron por conteo directo $P(A) = [2(AA) + (Aa)]/2n$, siendo (AA) el número de individuos homocigotos para el alelo A (aportan dos alelos por persona), siendo (Aa) el número de individuos heterocigotos (aportan un alelo por persona) y n el número total de individuos estudiados.

c. Intervalos de confianza:

Los intervalos de confianza para las frecuencias génicas y genotípicas fueron estimados con una $p < 0,05$ (95% de probabilidad) utilizando el test exacto o el de Ward para distribución binomial.

d. Conformidad con la ley de equilibrio Hardy-Weinberg

El principio de Hardy-Weinberg indica que las frecuencias genotípicas para un gen con dos posibles alelos son una función binomial de las frecuencias alélicas. Asume que la mutación, la deriva genética, el flujo génico y la selección no están afectando la variación genética. Si la frecuencia del alelo **a** esta representada por p , la frecuencia del alelo **b** esta representada por q y donde n es el numero total de individuos. De esta forma, la cantidad de individuos previstos para cada genotipo resulta como sigue:

Individuos HPAaa = p^2n , *Individuos HPAab* = $2pqn$ e *Individuos HPAbb* = q^2n . La conformidad al equilibrio de Hardy-Weinberg se prueba usando la prueba χ^2 (Chi-cuadrado)^{115,116} entre los números observados (Obs) y los previstos (Exp) aplicando la ley de Hardy-Weinberg. En este caso, el número de grados de libertad es el número de fenotipos menos el de alelos, o $3 - 2 = 1$.

$$\chi^2 = \text{Sum}(\text{Obs} - \text{Exp})^2 / \text{Exp} \text{ para 1 grado de libertad}$$

e. Incompatibilidad antigénica *a priori* asociada a la gestación y a la transfusión

El riesgo potencial de aloinmunización asociado a la gestación⁸⁹ fue calculado usando la siguiente fórmula: la probabilidad de una incompatibilidad materno-fetal para el antígeno señalado es igual al producto de la frecuencia de madres negativas para el antígeno y la frecuencia de fetos positivos para el antígeno = $(1 - p_m) \times p_p$, donde p_m es la frecuencia alélica para la población a la que pertenece la madre (Gestante) y p_p es la frecuencia alélica de la población a la que pertenece el padre.

El riesgo potencial de aloinmunización asociado a la transfusión fue calculado usando la siguiente fórmula: la probabilidad de una transfusión antígeno-incompatible es igual al producto de la frecuencia de pacientes antígeno-negativos y la frecuencia de donantes antígeno-positivos = $(1 - p_p) \times (2p_d - p_d^2)$, donde p_p es la frecuencia alélica de la población a la que pertenece el paciente y p_d es la frecuencia alélica de la población a la que pertenece el donante.

f. Diferencias entre poblaciones

La significación estadística de las diferencias entre las distintas poblaciones se calculó con el test de χ^2 (Chi-cuadrado) de Pearson o el test exacto de Fisher.

El test de χ^2 es una prueba estadística que asume la hipótesis nula de no relación entre 2 variables dicotómicas. La aplicación de la fórmula correspondiente a su cálculo da lugar a un “valor p”. Este valor indica la probabilidad de equivocarse si se acepta que las dos variables analizadas estén realmente asociadas. Dicho de otra manera, la probabilidad de que las dos variables analizadas tengan una asociación real (no debida al azar) es de 1-p. El valor de p considerado límite para afirmar que dos variables están asociadas es de $p < 0,05$. El Test exacto de Fisher tiene un fundamento similar al anterior, aunque utiliza una aproximación matemática distinta y más compleja. Se emplea como alternativa al test de χ^2 cuando la frecuencia de las variantes estudiadas es muy bajo (<5%). La significación estadística, análogamente al caso anterior, se considera cuando la $p < 0,05$

g. Análisis del componente principal:

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es un método estadístico de análisis multivariado, que reduce el número de variables, a pesar de lo cual sigue describiendo los datos en su mayor parte. Se analizarán a través del PCA las frecuencias alélicas de los sistemas HPA para muchas poblaciones y se realizará un gráfico de los primeros componentes, de manera de obtener una imagen en dos dimensiones de un espacio pluridimensional (de manera similar a los dendrogramas). Por supuesto, cuanto más cercanas se vean la representación de las poblaciones, más parecidas serán entre sí en lo que respecta a las frecuencias alélicas HPA.

h. Software estadístico:

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete STATA versión 9,1. (College Station, Texas, EUA. Representante en España: Timberlake Consulting S.L. Ciudad Expo C/ La Niña, Blq 47, 2ºD. 41927 Sevilla) y el programa EPIDAT 3,1, desarrollado por el Servicio de Información sobre Saúde Pública de la Dirección Xeral de Saúde Pública de la Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia) en colaboración con la Unidad de Análisis de Salud y Sistemas de Información de Salud de la Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

- A. Caracterización de la población mayoritaria de la ciudad de Rosario para los sistemas HPA. Similitudes y diferencias con otras poblaciones descritas anteriormente.

Como se esperaba, las muestras obtenidas de los donantes de sangre (149 individuos) y del personal del hospital (43 individuos) mostraron que se trataba de la misma población. Esto se basa en los resultados de la prueba de homogeneidad obtenidos comparando las frecuencias genotípicas para todos los sistemas HPA caracterizados de ambos grupos de muestras.

Los datos obtenidos para la genotipificación de los sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 en los 192 individuos adultos sanos de la ciudad de Rosario estudiados, son presentados de la siguiente forma:

En la Tabla 6 (página 89) se indica el número de individuos observados para cada genotipo y sistema HPA, el número de individuos esperado según la ley de Hardy-Weinberg y los valores de p asociado (prueba del χ^2) al ajuste de los datos experimentales a la ley citada para cada sistema HPA. En esta tabla se observa para todos los sistemas HPA una proporción baja de individuos homocigotos para el alelo “b”, excepto para los sistemas HPA-3 y HPA-15, donde predominan los individuos heterocigotos. Para los sistemas HPA-4 y HPA-6, no se encontraron individuos portadores del alelo “b”. No todos los individuos reclutados fueron genotipados para la totalidad de los sistemas HPA. Como se observa en la Tabla 6, los 192 individuos reclutados fueron genotipados para los sistemas HPA-1, 2, 3, 4 y 5, 191 individuos para el sistema HPA-15 y 187 individuos para el sistema HPA-6.

En la Tabla 7 (página 90) y Tabla 8 (página 91), se detallan las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas estimadas en dicha población con intervalos de confianza del 95%. La imprecisión en la estimación de las frecuencias alélicas para todos los sistemas son iguales o menores al 5%.

En la Tabla 9 (ver página 92) se detallan las frecuencias alélicas para los sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 de la población adulta Argentina* de la ciudad de Rosario junto con las frecuencias publicadas para muchas otras poblaciones, según su frecuencia alélica HPA-1a: Bereberes, tunecinos, eslovenos, españoles, ingleses, daneses, alemanes, holandeses, franceses, italianos, austriacos, finlandeses, polacos, irlandeses, bantúes (Congo), mejicanos, taiwaneses, coreanos, japoneses y amerindios.

En la Tabla 10, (página 93) se presentan los resultados de la prueba de homogeneidad utilizando el test de χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher para cada sistema HPA y para todas las poblaciones mencionadas anteriormente con respecto a la población Argentina. En la tabla se observan poblaciones que difieren con la población mayoritaria de Rosario en las frecuencias alélicas de uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco sistemas HPA.

En la página 95, se presenta un gráfico similar a los dendrogramas que facilita la interpretación de las similitudes y diferencias en las frecuencias alélicas de los sistemas HPA-1,-2,-3,-4 y -5 entre las poblaciones (incluyendo a la Argentina) descritas en la Tabla 9. Este gráfico bidimensional obtenido de graficar las primeras dos componentes de un tipo de análisis multivariado denominado Análisis del componente principal retuvo el 91% de la variabilidad en las frecuencias alélicas de estos sistemas: el 61% para el componente 1 (eje X: sistemas HPA-1 y HPA-5) y el 30% restante para el componente 2 (eje Y: Sistemas HPA-2,-3 y -4). Al analizar dejando de lado al sistema HPA-2 que tiene un impacto clínico más limitado, es decir, considerando las frecuencias de los sistemas HPA-1,-3,-4 y -5, la distribución de las poblaciones en el gráfico no se ve modificada notoriamente y la variabilidad retenida por los primeros dos componentes aumenta al 96 %.

Tabla 6. Genotipos HPA observados y previstos por la ley de Hardy-Weinberg para la población caucásica adulta sana de Rosario

Sistema	Genotipo	n observada	n esperado	Análisis Hardy-Weinberg*
HPA-1	1a/1a	147	148	$\chi^2=0,438$ $p=0,508$
	1a/1b	43	41	
	1b/1b	2	3	
HPA-2	2a/2a	148	147	$\chi^2=0,435$ $p=0,509$
	2a/2b	40	42	
	2b/2b	4	3	
HPA-3	3a/3a	76	72	$\chi^2=1,477$ $p=0,224$
	3a/3b	83	92	
	3b/3b	33	29	
HPA-4	4a/4a	192	NA	NA
	4a/4b	0		
	4b/4b	0		
HPA-5	5a/5a	166	165	$\chi^2= 1,160$ $p=0,281$
	5a/5b	24	26	
	5b/5b	2	1	
HPA-6	6a/6a	187	NA	NA
	6a/6b	0		
	6b/6b	0		
HPA-15	15a/15a	47	50	$\chi^2=0,529$ $p=0,467$
	15a/15b	101	96	
	15b/15b	43	45	

* χ^2 (Grados de libertad = 1) para evaluar el ajuste entre lo observado/esperado. NA, no aplicable. Número de individuos estudiados (n)=187-192.

Tabla 7. Frecuencias alélicas HPA estimadas para la población caucásica adulta sana de Rosario.

Alelos	sinónimos	Frecuencia	IC 95%
HPA-1a	Zw ^a ,PIA1	0,878	[0.845-0.910]
HPA-1b	Zw ^b ,PIA2	0,122	[0.090-0.155]
HPA-2a	Ko ^b	0,875	[0.842-0.908]
HPA-2b	Ko ^a ,Sib ^a	0,125	[0.092-0.158]
HPA-3a	Bak ^a ,Lek ^a	0,612	[0.563-0.661]
HPA-3b	Bak ^b	0,388	[0.339-0.437]
HPA-4a	Yuk ^b ,Pen ^a	1,000	[0.992-1.000]
HPA-4b	Yuk ^a ,Pen ^b	0,000	[0.000-0.008]
HPA-5a	Br ^b ,Zav ^b	0,927	[0.901-0.953]
HPA-5b	Br ^a ,Zav ^a ,Hc ^a	0,073	[0.047-0.099]
HPA-6a	Ca ^b ,Tu ^b	1,000	[0.992-1.000]
HPA-6b	Ca ^a ,Tu ^a	0,000	[0.000-0.008]
HPA-15a	Gov ^b	0,511	[0.460-0.561]
HPA-15b	Gov ^a	0,489	[0.439-0.539]

Número de cromosomas estudiados n=384 para los sistemas HPA-1, 2, 3, 4 y 5. n=374 para HPA-6 y n=382 para el sistema HPA-15. NA, no aplicable.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y fenotípicas estimadas para la población caucásica adulta sana de Rosario.			
Sistema	Frecuencia genotípica	IC 95%	Frecuencia fenotípica (%)
HPA-1	1a1a=0,770 1a1b=0,215 1b1b=0,015	[0.711-0.830] [0.156-0.271] [0.000-0.033]	1a=98,5 1b=23,0
HPA-2	2a2a=0,766 2a2b=0,219 2b2b=0,016	[0.706-0.826] [0.160-0.278] [0.000-0.033]	2a=98,4 2b=23,4
HPA-3	3a3a=0,374 3a3b=0,475 3b3b=0,151	[0.307-0.443] [0.403-0.544] [0.100-0.202]	3a=84,9 3b=62,5
HPA-4	4a4a=1,000 4a4b=0,000 4b4b=0,000	NA	4a=100,0 4b=0,000
HPA-5	5a5a=0,860 5a5b=0,135 5b5b=0,005	[0.810-0.909] [0.087-0.184] [0.000-0.015]	5a=99,5 5b=14,1
HPA-6	6a6a=1,000 6a6b=0,000 6b6b=0,000	NA	6a=100,0 6b=0,000
HPA-15	15a15a=0,262 15a15b=0,497 15b15b=0,241	[0.199-0.324] [0.426-0.568] [0.180-0.301]	15a=76,0 15b=73,9
Número de individuos estudiados n=192 para los sistemas HPA-1, 2, 3, 4 y 5. n=187 para HPA-6 y n=191 para el sistema HPA-15. NA, no aplicable.			

Tabla 9. Frecuencias alélicas HPA en varias poblaciones.

	H P A - 1		H P A - 2		H P A - 3		H P A - 4		H P A - 5		H P A - 6		H P A - 15	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Población	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Bereberes ¹¹⁷	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 ¹¹⁸	0,750	0,250	-	-	0,694	0,306	-	-	0,780	0,220	-	-	-	-
Eslovenos ¹¹⁹	0,809	0,191	0,891	0,109	0,591	0,407	0,997	0,000	0,934	0,066	-	-	0,527	0,483
Españoles ³	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 ¹²⁰	0,831	0,169	0,917	0,083	0,626	0,374	1,000	0,000	0,921	0,078	-	-	-	-
Alemanes ¹¹³	0,839	0,161	0,91	0,09	0,586	0,414	-	-	0,917	0,083	-	-	-	-
Ingleses ¹²¹	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 ¹²²	0,846	0,154	0,934	0,066	0,555	0,445	1,000	0,000	0,902	0,098	-	-	-	-
Franceses ¹²³	0,848	0,152	0,920	0,080	0,620	0,380	-	-	0,874	0,126	-	-	-	-
Italianos ¹⁰⁷	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 ¹²⁴	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
Finlandeses ¹²⁵	0,860	0,140	0,910	0,090	0,590	0,410	-	-	0,950	0,050	-	-	-	-
Polacos ¹²⁶	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 ¹²⁷	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
Bantús (Congo) 128	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
Mejicanos ¹²⁹	0,951	0,049	0,841	0,159	0,604	0,396	0,990	0,010	0,938	0,062	1,000	0,000	-	-
Coreanos ¹³⁰	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 ¹³¹	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 ^{132,133}	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 ^{4,109}	1,000	0,000	0,821	0,179	0,757	0,243	1,000	0,000	1,000	0,000	-	-	0,780	0,220

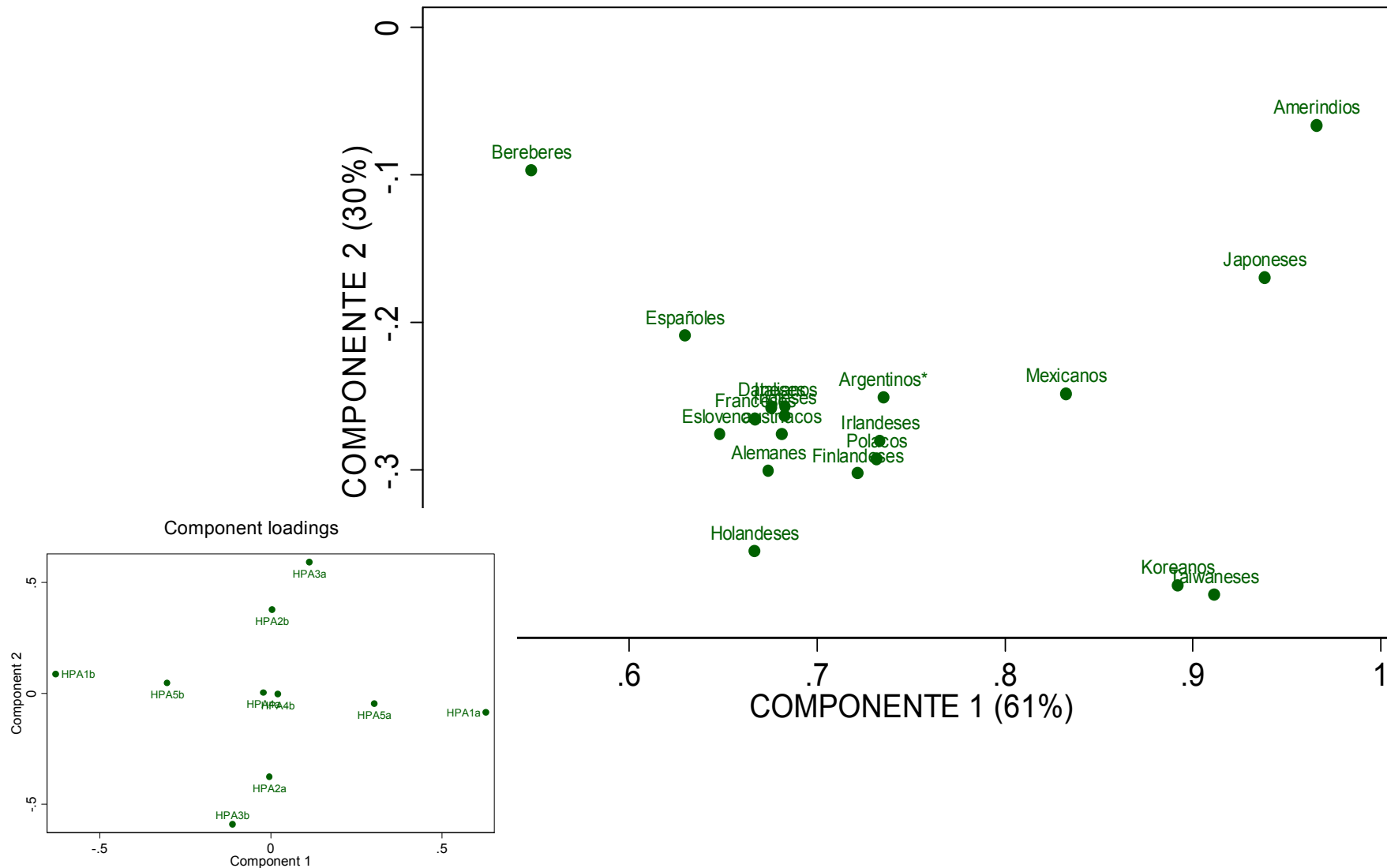
* El presente trabajo

Tabla 10. Test de homogeneidad entre la población argentina y otras poblaciones descritas.							
	H P A - 1	H P A - 2	H P A - 3	H P A - 4	H P A - 5	H P A - 6	H P A - 1 5
Población	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)
Bereberes ¹¹⁸	$\chi^2_{(2)}=15,97$ p<0.001	Exacto de Fisher p=0,140	$\chi^2_{(2)}=2,52$ p=0,284	NC	Exacto de Fisher p=0,020	NC	---
Tunecinos ¹¹⁹	$\chi^2_{(2)}=14,77$ p=0,001	---	$\chi^2_{(2)}=3,76$ p=0,153	---	Exacto de Fisher p<0.001	---	---
Eslovenos ¹²⁰	$\chi^2_{(2)}=6,57$ p=0,037	Exacto de Fisher p=0,894	$\chi^2_{(2)}=0,26$ p=0,877	NC	Exacto de Fisher p=0,937	---	$\chi^2_{(2)}=0,06$ p=0,969
Españoles ¹²¹	$\chi^2_{(2)}=9,89$ p=0,007	$\chi^2_{(2)}=1,81$ p=0,404	$\chi^2_{(2)}=1,95$ p=0,377	NC	$\chi^2_{(2)}=6,79$ p=0,034	NC	$\chi^2_{(2)}=1,35$ p=0,509
Daneses ¹²³	$\chi^2_{(2)}=4,64$ p=0,098	Exacto de Fisher p=0,205	$\chi^2_{(2)}=0,14$ p=0,931	NC	Exacto de Fisher p=0,959	---	---
Alemanes ¹⁰⁵	$\chi^2_{(2)}=3,91$ p=0,142	$\chi^2_{(2)}= 4,90$ p=0,086	$\chi^2_{(2)}=0,97$ p=0,615	---	Exacto de Fisher p=0,857	---	---
Ingleses ¹²²	Exacto de Fisher p=0,429	Exacto de Fisher p=0,138	$\chi^2_{(2)}=0,13$ p=0,937	NC	Exacto de Fisher p=0,821	NC	$\chi^2_{(2)}=0,13$ p=0,936
Holandeses ¹²⁴	$\chi^2_{(2)}=1,72$ p=0,422	Exacto de Fisher p=0,015	$\chi^2_{(2)}=2,63$ p=0,268	NA	Exacto de Fisher p=0,472	---	---
Franceses ¹²⁵	$\chi^2_{(2)}=2,56$ p=0,277	Exacto de Fisher p=0,024	$\chi^2_{(2)}=0,10$ p=0,950ç	---	$\chi^2_{(2)}=9,73$ p=0,008	---	---
Italianos ¹²⁶	Exacto de Fisher p=0,602	Exacto de Fisher p=0,891	$\chi^2_{(2)}=0,00$ p=0,999	NA	Exacto de Fisher p=0,501	NA	---

Austriacos ¹²⁷	$\chi^2_{(2)}=1,72$ p=0,422	$\chi^2_{(2)}=7,15$ p=0,028	$\chi^2_{(2)}=0,00$ p=0,999	NA	$\chi^2_{(2)}=4,26$ p=0,119	NA	$\chi^2_{(2)}=0,10$ p=0,953
Finlandeses ¹²⁸	Exacto de Fisher p=0,773	Exacto de Fisher p=0,310	$\chi^2_{(2)}=0,41$ p=0,814	---	Exacto de Fisher p=0,450	---	---
Polacos ¹²⁹	Exacto de Fisher p=0,962	Exacto de Fisher p=0,594	$\chi^2_{(2)}=0,27$ p=0,874	NA	Exacto de Fisher p=0,876	---	$\chi^2_{(2)}=0,60$ p=0,740
Irlandeses	Exacto de Fisher p=0,972	Exacto de Fisher p=0,006	$\chi^2_{(2)}=0,15$ p=0,930	NA	Exacto de Fisher p=0,792	NA	$\chi^2_{(2)}=0,88$ p=0,644
Bantúes (congo) ¹³⁰	Exacto de Fisher p=0,603	$\chi^2_{(2)}=10,20$ p=0,006	$\chi^2_{(2)}=0,15$ p=0,928	NA	$\chi^2_{(2)}=42,59$ p<0,001	NA	$\chi^2_{(2)}=22,05$ p<0,001
Mejicanos ¹³¹	Exacto de Fisher p<0,001	$\chi^2_{(2)}=1,91$ p=0,386	$\chi^2_{(2)}=0,05$ p=0,975	Exacto de Fisher p=0,123	Exacto de Fisher p=0,770	NA	---
Coreanos ¹³³	Exacto de Fisher p<0,001	Exacto de Fisher p=0,055	$\chi^2_{(2)}=2,63$ p=0,268	Exacto de Fisher p=0,123	Exacto de Fisher p=0,002	Exacto de Fisher p=0,007	---
Taiwaneses ¹³²	Exacto de Fisher p<0,001	Exacto de Fisher p<0,001	$\chi^2_{(2)}=1,33$ p=0,515	Exacto de Fisher p=1,000	Exacto de Fisher p<0,001	Exacto de Fisher p<0,001	$\chi^2_{(2)}=0,73$ p=0,694
Japoneses ^{134,135}	Exacto de Fisher p<0,001	Exacto de Fisher p=0,410	$\chi^2_{(2)}=12,67$ p=0,002	Exacto de Fisher p=0,049	Exacto de Fisher p=0,001	Exacto de Fisher p<0,001	---
Amerindios ^{110,111}	Exacto de Fisher p<0,001	Exacto de Fisher p=0,267	Exacto de Fisher p=0,010	NA	Exacto de Fisher p<0,001	---	$\chi^2_{(2)}=39,89$ p<0,001

El valor estadísticamente significativo para p fue fijado en 0,05, El grado de libertad para el χ^2 figura entre paréntesis. Las celdas sombreadas (■) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población Argentina. Las celdas vacías (---) significan que los datos no fueron publicados en el trabajo original. NA = test no aplicable.

FRECUENCIAS GÉNICAS HPA-1 AL HPA-5 EN DISTINTAS POBLACIONES ANÁLISIS DEL COMPONENTE PRINCIPAL



B. Caracterización de la población de aborígenes tobas de Rosario para los sistemas HPA.

Los datos obtenidos de la genotipificación de los sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 en la población de aborígenes tobas de la ciudad de Rosario, son presentados de la siguiente forma:

En la Tabla 11 (página 97) se indica el número de individuos observados para cada genotipo y sistema HPA, el número de individuos esperado según la ley de Hardy-Weinberg y los valores de p asociado (prueba del χ^2) al ajuste de los datos experimentales a la ley de Hardy-Weinberg para cada sistema HPA. Se observa para todos los sistemas HPA una proporción baja de individuos homocigotos para el alelo “b”, excepto para los sistemas HPA-3 y HPA-15, donde predominan los individuos heterocigotos “ab” para el primero y homocigotos “bb” para el segundo. Para los sistemas HPA-1, HPA-4, HPA-5 y HPA-6, no se encontraron individuos portadores del alelo “b”.

En la Tabla 12 (página 98) y Tabla 13 (página 99) se detallan las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas estimadas en dicha población con un intervalo de confianza del 95%. La imprecisión en la estimación de las frecuencias alélicas para los sistemas HPA-1, HPA-2, HPA-4, HPA-5 y HPA-6 son iguales o menores al 6,1%. Para los alelos de los sistemas HPA-3 y HPA-15 la imprecisión es de 13 y 12,5% respectivamente.

En la Tabla 14 (página 100) se detallan las frecuencias alélicas para los sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -15 en la población toba de la ciudad de Rosario junto con las frecuencias publicadas para todos los grupos amerindios del amazonas caracterizados hasta el momento: xikrin-kayapo, tupi, wayampi, yanomama, kayapo, arara, wayana-apalai, y gaviões.

En la Tabla 15 (página 101) se presentan los resultados de la prueba de homogeneidad utilizando el test de χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher para cada sistema HPA y para todas las poblaciones mencionadas anteriormente con respecto a la población toba.

Tabla 11. Genotipos HPA observados y previstos por la ley de Hardy-Weinberg para la población de aborígenes tobas de Rosario.

Sistema	Genotipo	n observada	n esperado	Análisis Hardy-Weinberg*
HPA-1	1a/1a	27	27	NA
	1a/1b	0	0	
	1b/1b	0	0	
HPA-2	2a/2a	24	24	$\chi^2=0,093$ $p=0,760$
	2a/2b	3	3	
	2b/2b	0	0	
HPA-3	3a/3a	5	4	$\chi^2=0,551$ $p=0,458$
	3a/3b	11	13	
	3b/3b	11	10	
HPA-4	4a/4a	25	25	NA
	4a/4b	0	0	
	4b/4b	0	0	
HPA-5	5a/5a	25	25	NA
	5a/5b	0	0	
	5b/5b	0	0	
HPA-6	6a/6a	24	24	NA
	6a/6b	0	0	
	6b/6b	0	0	
HPA-15	15a/15a	3	3	$\chi^2=0,084$ $p=0,773$
	15a/15b	11	11	
	15b/15b	13	13	

*Para evaluar el ajuste entre lo observado/esperado se empleó la prueba χ^2 (Grados de libertad = 1). NA, no aplicable. n=Individuos caracterizados.

Tabla 12. Frecuencias alélicas HPA estimadas para la población aborigen toba de Rosario.

Alelos	sinónimos	Frecuencia	IC 95 %
HPA-1a	Zwa,PIA1	1,000	[0.946-1.000]
HPA-1b	Zwb,PIA2	0,000	[0.000-0.054]
HPA-2a	Kob	0,944	[0.883-1.000]
HPA-2b	Koa,Siba	0,056	[0.000-0.117]
HPA-3a	Baka,Lek a	0,389	[0.259-0.519]
HPA-3b	Bakb	0,611	[0.481-0.741]
HPA-4a	Yukb,Pena	1,000	[0.942-1.000]
HPA-4b	Yuka,Penb	0,000	[0.000-0.059]
HPA-5a	Brb,Zavb	1,000	[0.942-1.000]
HPA-5b	Bra,Zava,Hca	0,000	[0.000-0.059]
HPA-6a	Cab,Tub	1,000	[0.939-1.000]
HPA-6b	Caa,Tua	0,000	[0.000-0.061]
HPA-15a	Gov b	0,685	[0.561-0.809]
HPA-15b	Gov a	0,315	[0.191-0.439]

Número de cromosomas estudiados n=54 para los sistemas HPA-1, 2, 3 y 15. n=50 para HPA-4 y -5 y n=48 para el sistema HPA-6.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y fenotípicas estimadas para la población aborigen toba de Rosario.

Sistema	Frecuencia genotípica	IC 95%	Frecuencia fenotípica (%)
HPA-1	1a1a=1,000 1a1b=0,000 1b1b=0,000	NA	1a=100,0 1b=0,00
HPA-2	2a2a=0,892 2a2b=0,105 2b2b=0,003	[0.770-1.000] [0.000-0.230] [0.000-0.108]	2a=99,7 2b=10,8
HPA-3	3a3a=0,151 3a3b=0,475 3b3b=0,373	[0.014-0.282] [0.293-0.670] [0.188-0.553]	3a=62,6 3b=84,8
HPA-4	4a4a=1,000 4a4b=0,000 4b4b=0,000	NA	4a=100,0 4b=0,00
HPA-5	5a5a=1,000 5a5b=0,000 5b5b=0,000	NA	5a=100,0 5b=0,00
HPA-6	6a6a=1,000 6a6b=0,000 6b6b=0,000	NA	6a=100,0 6b=0,00
HPA-15	15a15a=0,469 15a15b=0,431 15b15b=0,099	[0.287-0.680] [0.224-0.612] [0.024-0.292]	15a=90,0 15b=53,0

NA: Test no aplicable.

Tabla 14. Frecuencias alélicas HPA en amerindios.

Población	N=cromosomas n	H P A - 1 a l e l o s		H P A - 2 a l e l o s		H P A - 3 a l e l o s		H P A - 4 a l e l o s		H P A - 5 a l e l o s		H P A - 6 a l e l o s		H P A - 1 5 a l e l o s	
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Tobas*	54	1,000	0,000	0,944	0,056	0,389	0,611	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,685	0,315
Xikrin-Kayapo^{109,134}	190/2 12	1,000	0,000	0,963	0,037	0,708	0,292	1,000	0,000	0,963	0,037	---	---	0,780	0,220
Tupi4	140	1,000	0,000	0,821	0,179	0,757	0,243	1,000	0,000	1,000	0,000	---	---	---	---
Wayampi¹³⁵	44	---	---	---	---	0,270	0,730	---	---	1,000	0,000	---	---	---	---
Yanomama¹³⁵	48	---	---	---	---	0,460	0,540	---	---	1,000	0,000	---	---	---	---
Kayapo¹³⁵	56	---	---	---	---	0,610	0,390	---	---	1,000	0,000	---	---	---	---
Arara¹³⁵	40	---	---	---	---	0,700	0,300	---	---	1,000	0,000	---	---	---	---
Wayana-Apalai¹³⁵	64	---	---	---	---	0,750	0,250	---	---	1,000	0,000	---	---	---	---
Amerindios (Varios)¹³⁶	150	1,000	0,000	0,957	0,042	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Gavioes¹⁰⁹	62	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,660	0,340

Las celdas vacías (---) significan que los datos no fueron descritos en el trabajo original.

Tabla 15. Test de homogeneidad entre la población toba y otras poblaciones amerindias descritas.

	H P A - 1	H P A - 2	H P A - 3	H P A - 4	H P A - 5	H P A - 6	H P A - 1 5
Población	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)	Test (p)
Xikrin-Kayapo ^{109,134}	NA	$\chi^2(1)=0,39$ p=0,532	$\chi^2(2)=18,20$ p<0,001	NA	Exacto de Fisher P=0,346	---	$\chi^2(2)=2,550$ p=0,278
Tupi ⁴	NA	Exacto de Fisher p=0,107	Exacto de Fisher p<0,001	NA	NA	---	---
Wayampi ¹³⁵	---	---	Exacto de Fisher P=0,666	---	NA	---	---
Yanomama ¹³⁵	---	---	$\chi^2(2)=0,681$ P=0,711	---	NA	---	---
Kayapo ¹³⁵	---	---	Exacto de Fisher P=0,090	---	NA	---	---
Arara ¹³⁵	---	---	Exacto de Fisher P=0,018	---	NA	---	---
Wayana-Apalai ¹³⁵	---	---	Exacto de Fisher P=0,001	---	NA	---	---
Amerindios (Varios) ¹³⁶	NA	$\chi^2(1)=0,24$ p=0,625	---	---	---	---	---
Gavioes ¹⁰⁹	---	---	---	---	---	---	Exacto de Fisher P=1,000

El valor estadísticamente significativo de p fue fijado en 0,05. El grado de libertad para el χ^2 figura entre paréntesis. Las celdas vacías (---) significan que los datos no fueron publicados en el trabajo original. Las celdas sombreadas (■) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población toba. NA = test no aplicable.

C. Análisis comparativo entre la población de Rosario y los aborígenes tobas.

Al comparar ambas poblaciones caracterizadas de la ciudad de Rosario, se observaron en los aborígenes tobas, frecuencias mayores para el alelo “a” en todos los sistemas HPA estudiados excepto para el HPA-3, que presentó el caso inverso. Estas diferencias tuvieron significación estadística para los sistemas HPA-1 ($p=0,002$), HPA-3 ($p=0,002$), HPA-5 ($p=0,036$) y HPA-15 ($p=0,016$) como se observa en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparación de las frecuencias génicas HPA entre los donantes de sangre y la población aborigen toba de Rosario.

Alelo HPA	Frecuencia DONANTES	Frecuencia TOBAS	Análisis estadístico
1a	0,878	1,000	Exacto de Fisher $p=0,002$
1b	0,122	0,000	
2a	0,875	0,944	Exacto de Fisher $P=0,175$
2b	0,125	0,056	
3a	0,612	0,389	$\chi^2_{(1)}=9,701$ $p=0,002$
3b	0,388	0,611	
4a	1,000	1,000	NA
4b	0,000	0,000	
5a	0,927	1,000	Exacto de Fisher $p=0,036$
5b	0,073	0,000	
6a	1,000	1,000	NA
6b	0,000	0,000	
15a	0,511	0,685	$\chi^2_{(1)}=5,800$ $p=0,016$
15b	0,489	0,315	

El valor estadísticamente significativo fue fijado en 0,05. Las celdas sombreadas () indican diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones. NA = test no aplicable.

D. Análisis de las Implicaciones Transfusionales y obstétricas

Se calcularon a partir de las frecuencias alélicas para todas las poblaciones detalladas en la Tabla 9 (ver página 92), los porcentajes de la incompatibilidad máxima teórica para cada sistema HPA para la gestación (Tabla 17, página 105) y la transfusión (Tabla 18, página 106).

También se calcularon las probabilidades *a priori* de incompatibilidad HPA asociada a la gestación (Tabla 19, página 107) y la transfusión (Tabla 20, página 107) para la población mayoritaria de Rosario, la población toba y entre ambos grupos.

Tabla 17. Porcentaje de la incompatibilidad teórica máxima HPA para la gestación														
	H P A - 1		H P A - 2		H P A - 3		H P A - 4		H P A - 5		H P A - 6		H P A - 1 5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Población	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Bereberes	32,095	95,267	18,308	82,284	46,599	99,939	0,000	0,000	11,240	69,624	0,000	0,000	-	-
Tunecinos	31,672	95,017	-	-	43,908	99,581	-	-	25,508	90,438	-	-	-	-
Eslovenos	19,941	84,463	7,153	58,468	66,148	96,052	0,000	0,000	2,749	38,902	-	-	83,070	90,637
Espanoles	19,757	84,229	6,081	54,730	53,801	99,916	0,000	0,000	8,562	62,789	0,000	0,000	88,611	79,851
Daneses	16,037	78,855	4,268	47,158	59,164	99,028	0,000	0,000	3,786	44,705	-	-	-	-
Alemanes	14,694	76,575	4,980	50,357	67,864	96,058	-	-	4,268	47,158	-	-	-	-
Ingleses	14,712	76,758	3,516	43,359	58,942	99,079	0,000	0,000	4,568	48,543	0,000	0,000	80,220	88,310
Holandeses	13,557	74,473	2,749	38,902	74,259	92,616	0,000	0,000	5,853	53,874	-	-	-	-
Franceses	13,238	73,854	3,978	45,751	60,492	98,697	-	-	9,375	65,033	-	-	-	-
Italianos	12,922	73,226	7,276	58,872	62,690	98,053	0,000	0,000	6,081	54,730	0,000	0,000	-	-
Austriacos	12,610	72,590	4,171	46,691	62,252	98,191	0,000	0,000	7,030	58,062	0,000	0,000	84,459	84,459
Finlandeses	11,389	69,962	4,980	50,357	67,013	96,433	-	-	1,605	30,490	-	-	-	-
Polacos	9,375	65,033	6,313	55,576	66,586	96,614	0,000	0,000	2,513	37,373	-	-	86,915	81,852
Argentinos*	8,830	63,546	9,238	64,664	62,252	98,191	0,000	0,000	3,338	42,386	0,000	0,000	82,737	86,114
Irlandeses	8,298	62,024	2,749	38,902	59,607	98,923	0,000	0,000	4,772	49,455	0,000	0,000	76,819	90,908
Bantús (Congo)	5,629	53,009	26,308	91,140	65,728	96,964	0,000	0,000	35,524	97,028	0,000	0,000	42,345	99,276
Mejicanos	1,543	29,943	14,366	75,985	63,998	97,613	0,067	6,622	2,436	36,858	0,000	0,000	-	-
Coreanos	0,096	7,915	3,698	44,323	74,259	92,616	0,067	6,622	0,320	14,218	0,265	12,978	-	-
Taiwaneses	0,006	2,015	1,038	24,908	70,175	94,943	0,003	1,346	0,150	9,833	0,891	23,184	77,590	90,353
Japoneses	0,003	1,346	6,081	54,730	38,580	98,228	0,081	7,270	0,479	17,271	0,479	17,271	-	-
Amerindios	0,000	0,000	17,774	81,523	30,203	94,088	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	25,508	90,438

Tabla 18. Porcentaje de la incompatibilidad teórica máxima HPA para la transfusión o el transplante														
	H P A - 1		H P A - 2		H P A - 3		H P A - 4		H P A - 5		H P A - 6		H P A - 1 5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Población	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Bereberes	23,788	98,584	12,811	88,559	36,359	99,513	0,000	0,000	7,579	76,706	0,000	0,000	-	-
Tunecinos	23,438	98,438	-	-	33,947	99,865	-	-	18,423	95,300	-	-	-	-
Eslovenos	14,060	90,454	4,696	65,454	55,019	90,355	0,000	0,000	1,735	44,540	-	-	73,422	82,471
Españoles	13,919	90,253	3,960	61,560	42,998	97,598	0,000	0,000	5,677	69,882	0,000	0,000	80,051	69,679
Daneses	11,098	85,475	2,737	53,518	48,124	95,324	0,000	0,000	2,414	50,813	-	-	-	-
Alemanes	10,100	83,366	3,214	56,940	56,808	90,190	-	-	2,737	53,518	-	-	-	-
Ingleses	10,120	83,656	2,237	49,412	47,909	95,431	0,000	0,000	2,937	55,004	0,000	0,000	70,096	79,674
Holandeses	9,261	81,387	1,735	44,540	63,524	85,258	0,000	0,000	3,805	60,661	-	-	-	-
Franceses	9,028	80,797	2,544	52,003	49,419	94,655	-	-	6,250	72,148	-	-	-	-
Italianos	8,798	80,198	4,781	65,871	51,586	93,457	0,000	0,000	3,960	61,560	0,000	0,000	-	-
Austriacos	8,570	79,587	2,672	53,016	51,152	93,704	0,000	0,000	4,611	65,033	0,000	0,000	75,000	75,000
Finlandeses	7,686	77,037	3,214	56,940	55,937	90,771	-	-	0,998	35,198	-	-	-	-
Polacos	6,250	72,148	4,118	62,447	55,501	91,056	0,000	0,000	1,581	42,856	-	-	77,952	71,958
Argentinos*	5,865	70,649	6,152	71,777	51,152	93,704	0,000	0,000	2,120	48,353	0,000	0,000	72,981	76,979
Irlandeses	5,492	69,103	1,735	44,540	48,556	95,105	0,000	0,000	3,074	55,978	0,000	0,000	66,305	82,987
Bantúes (Congo)	3,652	59,750	19,063	95,824	54,631	91,615	0,000	0,000	26,666	99,487	0,000	0,000	32,563	99,970
Mejicanos	0,958	34,584	9,857	82,814	52,890	92,690	0,040	7,802	1,532	42,287	0,000	0,000	-	-
Coreanos	0,058	9,315	2,358	50,458	63,524	85,258	0,040	7,802	0,194	16,649	0,160	15,213	-	-
Taiwaneses	0,004	2,382	0,639	28,901	59,200	88,525	0,002	1,592	0,090	11,555	0,547	26,942	67,154	82,266
Japoneses	0,002	1,592	3,960	61,560	29,280	99,904	0,048	8,560	0,291	20,173	0,291	20,173	-	-
Amerindios	0,000	0,000	12,406	87,884	22,225	97,866	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	18,423	95,300

Tabla 19. Probabilidad a priori de incompatibilidad para la gestación entre los distintos grupos caracterizados.

Alelo HPA	Caucásicos→caucásicos	tobas → tobas	tobas → caucásicos	caucásicos → tobas
1a	0,013	0,000	0,015	0,000
1b	0,094	0,000	0,000	0,122
2a	0,014	0,003	0,015	0,003
2b	0,096	0,050	0,043	0,111
3a	0,092	0,145	0,059	0,228
3b	0,145	0,092	0,229	0,059
4a	0,000	0,000	0,000	0,000
4b	0,000	0,000	0,000	0,000
5a	0,005	0,000	0,005	0,000
5b	0,063	0,000	0,000	0,073
6a	0,000	0,000	0,000	0,000
6b	0,000	0,000	0,000	0,000
15a	0,122	0,068	0,164	0,051
15b	0,127	0,148	0,082	0,230

Las celdas sombreadas (◐) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambas poblaciones para el correspondiente sistema HPA.

Tabla 20. Probabilidad a priori de incompatibilidad para la transfusión/transplante entre los distintos grupos caracterizados.

Alelo HPA	Caucásicos→caucásicos	tobas → tobas	tobas → caucásicos	caucásicos → tobas
1a	0,015	0,000	0,015	0,000
1b	0,177	0,000	0,000	0,229
2a	0,015	0,003	0,016	0,003
2b	0,179	0,097	0,083	0,209
3a	0,128	0,234	0,094	0,317
3b	0,234	0,128	0,318	0,095
4a	0,000	0,000	0,000	0,000
4b	0,000	0,000	0,000	0,000
5a	0,005	0,000	0,005	0,000
5b	0,121	0,000	0,000	0,141
6a	0,000	0,000	0,000	0,000
6b	0,000	0,000	0,000	0,000
15a	0,182	0,089	0,216	0,075
15b	0,192	0,249	0,138	0,347

Las celdas sombreadas (◐) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambas poblaciones para el correspondiente sistema HPA.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

A. Caracterización de la población mayoritaria de la ciudad de Rosario para los sistemas HPA. Similitudes y diferencias con otras poblaciones descritas anteriormente.

La estimación de las frecuencias alélicas HPA de la población mayoritaria de Rosario, a través de la caracterización de sus donantes de sangre, no posee el sesgo que se observa para la caracterización de los grupos sanguíneos eritrocitarios ABO y Rh (sobreestimación de los individuos O RhD negativos), por no ser el perfil antigénico plaquetario conocido al momento de la donación por el donante, ni solicitada expresamente por los servicios de medicina transfusional.

Como se observa en la Tabla 6, los valores de χ^2 obtenidos al comparar entre las frecuencias de los genotipos observados y los esperados según la ley de Hardy-Weinberg para todos los sistemas con un grado de libertad de uno, fueron menores de 3,841. Eso nos permite establecer con una confianza del 95% que las desviaciones observadas a la ley no son estadísticamente significativas y que por lo tanto, todos los sistemas HPA caracterizados tuvieron un buen ajuste a la ley de Hardy-Weinberg. Esto significa que en la población estudiada los sistemas HPA no estaban afectados por la selección o migración reciente y también fue una validación, aunque poco sensible, del muestreo (selección de los individuos a estudiar) y de la metodología utilizada para la genotipificación (obtención de datos coherentes).

De los resultados de la prueba de homogeneidad para las frecuencias alélicas HPA entre la población de la ciudad de Rosario y varias poblaciones europeas (Tabla 10, página 93) se observa una gran proximidad de la primera con la población inglesa, danesa, alemana, italiana, austriaca, finlandesa, polaca e irlandesa;

Si bien existe cierta tendencia hacia frecuencias mayores para los antígenos HPA-1a y -5a en nuestra población cuando se la compara con las europeas, probablemente debido a la influencia amerindia, esta observación no fue estadísticamente significativa (Tabla 10, página 93) excepto para eslovenos ($p=0.037$ para HPA-1), españoles ($p=0.007$ y 0.034 para HPA-1 y HPA-5 respectivamente) y franceses ($p=0,008$ para HPA-5). Estas poblaciones presentan frecuencias extremas para estos alelos y se diferencian de otras poblaciones europeas. La

población argentina también mostró diferencias estadísticamente significativas para el sistema HPA-2 con los holandeses ($p=0,015$), franceses ($p=0,024$) y austriacos ($p=0,028$). Para el sistema HPA-3, -4 y -6 no se encontraron diferencias significativas con ninguna población europea. Resulta importante la diferencia con respecto al sistema HPA-1 en la población argentina con la mexicana ($p<0.001$) y por supuesto, aún más marcadas, con las poblaciones amerindias y orientales.

El análisis del componente principal realizado para todas las poblaciones descritas en la Tabla 9, resume gráficamente la variabilidad HPA-1,-2,-3,-4 y -5. Se repite la observación previa, la conformación de un “*cluster*” o “bloque Europeo”, constituido por las poblaciones alemana, austriaca, danesa, finlandesa, inglesa, irlandesa, italiana y polaca. Integrada en este bloque se encuentra a la población argentina. Los españoles están algo alejados del mismo fundamentalmente por diferencias en las frecuencias del antígeno HPA-1b, debido a cierta influencia árabe; Junto a los eslovenos, presentan las frecuencias más altas en Europa. Los holandeses están también alejados del bloque debido a diferencias puntuales en un sistema clínicamente poco significativo: el HPA-2. Los mejicanos se encuentran muy alejados del bloque, a medio camino de las poblaciones amerindias y orientales. Estas últimas con una importante dispersión en el eje Y, por diferencias principalmente en los sistemas HPA-2 y HPA-3.

En resumen, en la primer y única caracterización de las frecuencias alélicas HPA de la población de una ciudad argentina, se observó una distribución similar a las descritas en poblaciones europeas.

B. Caracterización de la población de aborígenes tobas de Rosario para los sistemas HPA.

Como se observa en la Tabla 11, los valores de χ^2 obtenidos al comparar entre las frecuencias de los genotipos observados y los esperados según la ley de Hardy-Weinberg para todos los sistemas, con un grado de libertad de 1, fueron menores de 3,841. Eso nos permite establecer con una confianza del 95% que las desviaciones observadas a la ley no son estadísticamente significativas y que por lo tanto, todos los sistemas HPA caracterizados tuvieron un buen ajuste a la ley de Hardy-Weinberg.

La limitación observada en el número de individuos tobas estudiados, es compartida con muchos de los trabajos realizados con otras poblaciones amerindias, Estos en su mayoría, fueron realizados sobre muestras poblacionales pequeñas, con una media de 40 individuos estudiados (Tabla 14).

Los primeros amerindios estudiados para los antígenos plaquetarios específicos fueron los Indios Mapuches en Chile. En 1988, utilizando métodos serológicos, Inostroza et al.¹³⁷ fenotipificaron una muestra de esta población para los aloantígenos plaquetarios específicos PLA1, Baka, Yuka, Yukb, y Bra (HPA-1a, -3a, -4b,-4a y -5b). Estos primeros hallazgos fueron ampliados posteriormente a otros sistemas utilizando metodología moleculares en varias poblaciones amerindias aisladas del amazonas por Covas et al.^{135,136} (amerindios wayampi, yanomama , kayapo, arara, wayana-apalai), Castro et al.⁴ (amerindios parakanã), Chiba et al.¹³⁴ (amerindios xikrin-kayapo) y Cardone et al.¹⁰⁹

Los resultados hallados para los sistemas HPA en la población toba son coherentes con los estudios realizados sobre otras poblaciones amerindias. La ausencia de los alelos HPA-1b y HPA-5b es una característica de esta población que probablemente se relacione con las bajas frecuencias de este alelo encontradas en poblaciones orientales.

El único sistema que muestra una desviación significativa con respecto a la descrita para otras poblaciones amerindias es el HPA-3. La frecuencia para el alelo HPA-3a encontrada en la población toba fue de 0,389, menor que las reportadas por Chiba et al.¹³⁴ en los amerindios Xikrin-Kayapo (0,708) y por Castro et al.⁴ en los amerindios de la tribu Tupi conocidos como Parakanã (0,757). Asimismo, esto es coherente con la gran dispersión de frecuencias alélicas descritas por Covas et al.¹³⁵ al estudiar 5 poblaciones amerindias aisladas

del amazonas (Wayampi, Yanomama, Kayapo, Arara, Wayana-Apalai), probablemente se deba al aislamiento geográfico y al efecto de deriva genética.

En la población toba los sistemas HPA-4 y HPA-6 resultaron monomórficos. No se detectó el antígeno HPA-4b, de gran significación clínica en poblaciones orientales. Existe evidencia que este antígeno está presente en las poblaciones amerindias; Se halló al antígeno HPA-4b en los Mapuches¹³⁷ con una frecuencia fenotípica de 0,9% (1 en 112 individuos) y se ha descrito una frecuencia fenotípica de 2,07% para este antígeno en una población mejicana, con un alto grado de mestizaje con amerindios.¹²⁹ El sistema bialélico HPA-4 es considerado polimórfico sólo en poblaciones asiáticas y la mayor parte de las inmunizaciones contra los HPA-4a o HPA-4b han sido descritas en Japón. Debido a la frecuencia extremadamente baja en caucásicos del alelo HPA-4b (Tabla 9, página 92), sólo se han informado 2 casos de trombocitopenia neonatal aloinmune producidos por anticuerpos de especificidad anti-HPA-4b en la población Caucásica, uno de ellos en España.^{138,139}

Por último las frecuencias encontradas para el sistema HPA-15 en los tobas no difiere significativamente de las descritas para las únicas dos poblaciones amerindias caracterizadas hasta el momento, Gavioes y Xikrin-Kayapo.¹⁰⁹

Las frecuencias de los antígenos HPA encontradas en la población de los aborígenes tobas de la ciudad de Rosario son muy similares a las encontradas en otras poblaciones amerindias alejadas geográficamente. Las semejanzas encontradas, son coherentes con lo descrito recientemente por Goicochea et al.¹⁴⁰, donde estudiando muchos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios, estimaron un aporte europeo en este grupo aborígen de sólo 4%. Esto se explica por la altísima endogamia observada en este grupo.

Para aquellos sistemas HPA cuasi-monomórficos en amerindios (HPA-1, -2, -4, -5, y -6), pese al reducido número de cromosomas estudiados, la imprecisión en la estimación de las frecuencias alélicas fue menor o igual a 6,1%. Para los dos sistemas HPA restantes la imprecisión fue mucho mayor e inaceptable (13 % para HPA-3 y 12,5 % para HPA-15).

Pese a la coherencia de los resultados obtenidos con las frecuencias publicadas para otras poblaciones amerindias (Tabla 14, página 100) y el buen ajuste a la ley de Hardy-Weinberg (Tabla 11, página 97), el número reducido de individuos estudiados le otorga un carácter de “base” a la caracterización de los sistemas HPA-1, -2, -4, -5, y -6 en los tobas. Con respecto a los sistemas HPA -3 y -15, un mayor número de individuos deben ser estudiados.

C. Análisis comparativo entre la población de Rosario y los aborígenes tobas.

Son particularmente importantes las diferencias encontradas para los sistemas HPA-1 y HPA-5, donde se observó la ausencia de los alelos HPA-1b y HPA-5b en la población toba frente a frecuencias moderado-bajas en la población caucásica mayoritaria.

Para el caso de los sistemas HPA-3 y HPA-15 se observó entre los aborígenes tobas frecuencias de los alelos HPA-3b y HPA-15a sensiblemente más altas que en la población mayoritaria. Como era previsible, los mismos resultados se obtuvieron al comparar la población mayoritaria con respecto a otros grupos amerindios del Amazonas (Tabla 9, página 92).

D. Análisis de las Implicaciones Transfusionales y obstétricas

Como ya se comentó, las frecuencias encontradas para los alelos HPA en la población mayoritaria de la ciudad de Rosario, no difirieron significativamente de las descritas en muchas de las poblaciones europeas.

El impacto de las frecuencias sobre el riesgo potencial de aloinmunización se observa mejor al comparar los porcentajes de la incompatibilidad máxima teórica HPA calculados para la gestación (Tabla 17, página 105) y la transfusión/transplante (Tabla 18, página 106).

Como se ha visto, existen factores propios del antígeno y del individuo respondedor que condicionan la respuesta inmune, de forma que sólo una parte de los casos de incompatibilidad potencial lleva finalmente a la inmunización. El ejemplo con mayor importancia clínica, es para la inmunización contra HPA-1a asociada a la gestación. Prácticamente en todas las poblaciones europeas, alrededor del 10 % de las mujeres negativas para el antígeno se inmunizan y casi siempre está asociada a la presencia del alelo HLA-DRB3*0101. Esto explica también el caso de aquellos antígenos como el HPA-1b, que con un porcentaje mucho mayor de incompatibilidad potencial, no se asocia con TFNA y otros cuadros secundarios a la aloinmunización. Esa limitación (en términos absolutos) no existe cuando se comparan estos valores entre poblaciones, siempre que sea posible simplificar el análisis, asumiendo que el resto de los factores genéticos y ambientales son iguales en ambas poblaciones.

Hasta el momento, el único factor genético de peso identificado como condicionante de la aloinmunización HPA es el alelo HLA-DRB3*0101. En caucásicos entre el 30 al 50% de los individuos son negativos para el alelo HLA-DRB3*0101.⁷⁵ Diferencias importantes para la población argentina con respecto a las europeas en la frecuencia del alelo DRB3*0101 son improbables, como ocurre en poblaciones orientales.¹⁴¹ En la población toba se encuentra una frecuencia alélica DRB1*0101 de 0,289¹⁰² Esto implica que alrededor del 50% de los aborígenes tobas porta dicho alelo y que por lo tanto no existen diferencias importantes con las poblaciones caucásicas. Estudios realizados sobre diversas poblaciones amerindias de México, Brasil y Argentina han encontrado frecuencias DRB3*0101 similares a las descritas en la población toba.¹⁴²

La ciudad de Rosario, con una población superior al millón de habitantes, una tasa bruta de natalidad de 17,01.87 por mil nacimientos vivos anuales y sólo seis casos confirmados o con sospecha muy alta en los últimos nueve años, ostenta una incidencia de TFNA de aproximadamente 1 en 25.000 nacimientos. Estos datos, no publicados, provienen del laboratorio de inmunohematología del Servicio de Medicina Transfusional y Hematología del Hospital Italiano, centro de reconocida trayectoria en el campo de la inmunohematología y que gracias a convenios con la Municipalidad de Rosario y otros efectores de salud públicos y privados, centraliza la totalidad de los estudios inmunohematológicos plaquetarios de la ciudad.

Es la opinión del grupo que el diagnóstico de la TFNA está limitado a unos pocos neonatos del total afectado, probablemente por falta de divulgación y de entrenamiento del personal sanitario sobre este cuadro.

La situación de Rosario y en general de la Argentina es similar al informado en el año 2002 en Irlanda por Davoren et al.¹⁴³ En ese momento, con una incidencia histórica de TFNA de 1 por cada 16.500 nacimientos, su grupo plantea su fuerte sospecha de subdiagnóstico que fue confirmada un año después por el mismo grupo a través de un estudio prospectivo sistemático, resultando en una incidencia de 1 en 1.100 embarazos no seleccionados¹⁴⁴ como la mayoría de las poblaciones caucásicas descritas hasta el momento. Por supuesto, que en este estudio se tipificaron a todas las madres para el antígeno HPA-1a, se buscó sistemáticamente en todas la presencia de aloanticuerpos y de rutina se realizó un conteo de plaquetas de cordón en el recién nacido. La diferencia notable entre ambos reportes, como ocurre con la mayoría de los trabajos sobre prevalencia de este cuadro, se deben a la metodología utilizada y a qué tanto énfasis se ponga en la búsqueda de la aloinmunización.

Es importante destacar que la población de Irlanda tiene prácticamente la misma distribución para los HPA que la población Argentina y por lo tanto, la epidemiología de la TFNA no debería diferir significativamente ambas poblaciones.

Con respecto a la población aborígen toba de la ciudad de Rosario, el riesgo potencial de aloinmunización es notablemente menor que el estimado para el grupo mayoritario (Tabla 19, página 107). La virtual ausencia de los antígenos HPA-1b y HPA-5b condicionaría una

epidemiología *a priori* cercana a la descrita en población oriental o inclusive menos grave aún.

Es precisamente la ausencia de estos antígenos que produce una caída en el riesgo de aloinmunización para un individuo caucásico, cuando su pareja/donante pertenece a la etnia toba (Tabla 19, página 107), excepto para el antígeno HPA-3b, pero el carácter minoritario de esta etnia minimiza su impacto a nivel poblacional.

El riesgo potencial de aloinmunización para un individuo toba (muy bajo) aumenta notablemente cuando su pareja/donante es caucásico, fundamentalmente para los antígenos HPA-1b, HPA-2b, HPA-3a, HPA-5b, HPA-15b. Debido a la fuerte endogamia, actualmente esto es más probable en el caso de transfusiones que en el ámbito “reproductivo”. Aún así, el riesgo resultante continua siendo menor que el estimado para la población general. En otras palabras, los aborígenes tobas al hacer uso del sistema de salud público y relacionarse con la población mayoritaria, asimilarían parte del riesgo de aloinmunización HPA de esta última.

Existen en la muestra indicios sobre un intercambio alélico marginal entre estas poblaciones, particularmente sobre el grupo ABO, en correspondencia con lo descrito recientemente por Goicochea et al¹⁴⁰, quienes estimaron un aporte europeo en este grupo aborígen de un 4%.

El hecho que las características estudiadas no sean estáticas, ya que las poblaciones tampoco lo son, determina que desde el punto de vista de la seguridad transfusional y obstétrica, se debe poner toda la energía en la detección y caracterización de la aloinmunización, independientemente de la etnia a la que pertenece el paciente o gestante.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Las frecuencias estimadas de los antígenos HPA en la población de la ciudad de Rosario son similares a las descritas en poblaciones europeas.
- ✓ Las frecuencias estimadas para los aborígenes tobas son homologables a las encontradas en grupos amerindios del Amazonas y en menor grado, a poblaciones orientales.
- ✓ Existen diferencias para los sistemas HPA de importancia clínica entre ambos grupos. Debido a estas diferencias, el riesgo de aloinmunización potencial de la población mayoritaria de Rosario es superior que el estimado para el grupo aborígen toba.
- ✓ El hecho que las poblaciones no sean estáticas y se relacionen entre si, determina que desde el punto de vista de la seguridad transfusional y obstétrica, se deba poner toda la energía en la detección y caracterización de la aloinmunización independientemente del grupo étnico del paciente.
- ✓ Los pocos casos diagnosticados de TFNA, el limitado conocimiento sobre la naturaleza y la gravedad de este cuadro, sugieren que se halla fuertemente subdiagnosticada en nuestro medio, al igual que el resto de los cuadros asociados a la aloinmunización HPA. La fuerte discrepancia entre los casos observados y los esperados indica la necesidad de poner mayor énfasis en la educación continuada del personal médico-sanitario involucrado.

APORTES DE LA TESIS AL CONOCIMIENTO

- ✓ La confección de tablas poblacionales y análisis del riesgo de aloinmunización HPA en una población Argentina. Primer trabajo de estas características realizado en Argentina.

APORTES DE LA TESIS A LA COMUNIDAD

- ✓ La puesta en agenda de cuadros patológicos prevalentes y actualmente subdiagnosticados en Argentina. El primer paso necesario hacia su esclarecimiento.
- ✓ La creación de un panel de donantes de aféresis con genotipos homocigotos "aa" y "bb" para los sistemas HPA -1, -3 y -5, que nos permite realizar un correcto diagnóstico serológico y proveer plaquetas compatibles a los pacientes sensibilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lucas GF, Metcalfe P. Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms. *Transfus Med* 2000; 10 (3): 157-74.
2. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Platelets: New Understanding of Platelet Glycoproteins and Their Role in Disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000: 222-40.
3. Muniz-Diaz E, Martinez C, Arilla M, et al. Frecuencia de los antígenos plaquetarios específicos de los sistemas HPA-1,-2,-3,-4,-5 y -6 en población española. *Haematologica* 1998; 83 (suppl. 2) [Ed. Esp].).
4. Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999; 26 (5): 355-60.
5. Bontadini A, Tazzari PL, Manfroi S, et al. Human-platelet-antigen and neutrophil-antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica* 2000; 85 (4): 430-1.
6. Torrado S. *Historia de la Familia en Argentina moderna (1970-2000)*. Buenos Aires, 2003.
7. Zucker-Franklin D. Platelet morphology and function. In Williams WS, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds): *Hematology*, McGraw Hill, New York, , p. 1172, 1989.
8. 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.
9. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol* 2002; 10 (2-3): 165-81.
10. Ogasawara K, Ueki J, Takenaka M, Furihata K. Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood* 1993; 82 (3): 993-9.
11. Carr R, Hutton JL, Jenkins JA, et al. Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. *Br J Haematol* 1990; 75 (3): 408-13.

12. Heal JM, Rowe JM, McMican A, et al. The role of ABO matching in platelet transfusion. *Eur J Haematol* 1993; 50 (2): 110-7.
13. Duquesnoy RJ, Filip DJ, Tomasulo PA, Aster RH. Role of HLA-C matching in histocompatible platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Transplant Proc* 1977; 9 (4): 1827-8.
14. Mueller-Eckhardt G, Hauck M, Kayser W, Mueller-Eckhardt C. HLA--C antigens on platelets. *Tissue Antigens* 1980; 16 (1): 91-4.
15. 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.
16. Halle L. [Platelet alloantigenic systems]. *Transfus Clin Biol* 1998; 5 (5): 362-5.
17. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003; 85 (3): 240-5.
18. Giltay JC, Brinkman HJ, von dem Borne AE, van Mourik JA. Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 1989; 74 (3): 965-70.
19. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Human platelet alloantigens Bra/Brb are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T lymphocytes. *Hum Immunol* 1989; 25 (4): 237-46.
20. Giltay JC, Brinkman HJ, Vlekke A, et al. The platelet glycoprotein Ia-IIa-associated Br-alloantigen system is expressed by cultured endothelial cells. *Br J Haematol* 1990; 75 (4): 557-60.
21. Von dem Borne AE, Decary F. ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang* 1990; 58 (2): 176.
22. Von dem Borne AE, Decary F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Hum Immunol* 1990; 29 (1): 1-2.

23. Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang* 1998; 74 Suppl 2 (249-53).
24. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99 (5): 1692-8.
25. National Institute for Biological Standards and Control: [http:// www.nibsc.ac.uk](http://www.nibsc.ac.uk) (under Haematology Division).
26. Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC. Immunoreactions Involving Platelets. V. Post-Transfusion Purpura Due to a Complement-Fixing Antibody against a Genetically Controlled Platelet Antigen. a Proposed Mechanism for Thrombocytopenia and Its Relevance in "Autoimmunity". *J Clin Invest* 1961; 40 (9): 1597-620.
27. Van Der Weerd CM, Veenhoven-Vonriesz LE, Nijenhuis LE, Van Loghem J. The Zw Blood Group System in Platelets. *Vox Sang* 1963; 20 (513-30).
28. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83 (5): 1778-81.
29. Van Der Weerd CM, H. vdW-D, Engelfriet CP, Van Loghem J. A new platelet antigen. In: *Proceedings of the 8th congress of the European Society of Haematology*. Karger, Basel. 1962.
30. Van Der Weerd CM. *Platelet Antigens and Iso-Immuneization*. Amsterdam: University of Amsterdam, 1965.
31. Kuijpers RW, Faber NM, Cuypers HT, et al. NH2-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89 (2): 381-4.
32. Von dem Borne AE, von Riesz E, Verheugt FW, et al. Baka, a new platelet-specific antigen involved in neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1980; 39 (2): 113-20.
33. Kickler TS, Herman JH, Furihata K, et al. Identification of Bakb, a new platelet-specific antigen associated with posttransfusion purpura. *Blood* 1988; 71 (4): 894-8.

34. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood* 1990; 75 (12): 2343-8.
35. Shibata Y, Matsuda I, Miyaji T, Ichikawa Y. Yuka, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1986; 50 (3): 177-80.
36. Shibata Y, Miyaji T, Ichikawa Y, Matsuda I. A new platelet antigen system, Yuka/Yukb. *Vox Sang* 1986; 51 (4): 334-6.
37. Wang R, Furihata K, McFarland JG, et al. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pena/Penb alloantigen system. *J Clin Invest* 1992; 90 (5): 2038-43.
38. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhardt C. A new platelet-specific alloantigen Bra. Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1988; 54 (2): 101-6.
39. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol* 1989; 72 (2): 191-8.
40. Santoso S, Kalb R, Walka M, et al. The human platelet alloantigens Br(a) and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest* 1993; 92 (5): 2427-32.
41. Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, et al. Localization of the Br polymorphism on a 144 bp exon of the GPIa gene and its application in platelet DNA typing. *Thromb Haemost* 1994; 71 (5): 651-4.
42. Simsek S, Gallardo D, Ribera A, von dem Borne AE. The human platelet alloantigens, HPA-5(a+, b-) and HPA-5(a-, b+), are associated with a Glu505/Lys505 polymorphism of glycoprotein Ia (the alpha 2 subunit of VLA-2). *Br J Haematol* 1994; 86 (3): 671-4.
43. Kekomaki R, Jouhikainen T, Ollikainen J, et al. A new platelet alloantigen, Tua, on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia in two families. *Br J Haematol* 1993; 83 (2): 306-10.

44. McFarland JG, Blanchette V, Collins J, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new platelet-specific alloantibody. *Blood* 1993; 81 (12): 3318-23.
45. Wang R, McFarland JG, Kekomaki R, Newman PJ. Amino acid 489 is encoded by a mutational "hot spot" on the beta 3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood* 1993; 82 (11): 3386-91.
46. Kuijpers RW, Simsek S, Faber NM, et al. Single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1993; 81 (1): 70-6.
47. Kroll H, Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Sra, a private platelet antigen on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1990; 76 (11): 2296-302.
48. Santoso S, Kalb R, Kroll H, et al. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GPIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269 (11): 8439-44.
49. Noris P, Simsek S, de Bruijne-Admiraal LG, et al. Max(a), a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1995; 86 (3): 1019-26.
50. Reviron D, Mercier P, Dabanian C, et al. Laa: A new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Platelets* 1994; 280 (5): (abstract).
51. Peyruchaud O, Bourre F, Morel-Kopp MC, et al. HPA-10w(b) (La(a)): genetic determination of a new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa and its expression in COS-7 cells. *Blood* 1997; 89 (7): 2422-8.
52. Simsek S, Vlekke AB, Kuijpers RW, et al. A new private platelet antigen, Groa, localized on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1994; 67 (3): 302-6.

53. Simsek S, Folman C, van der Schoot CE, von dem Borne AE. The Arg633His substitution responsible for the private platelet antigen Gro(a) unravelled by SSCP analysis and direct sequencing. *Br J Haematol* 1997; 97 (2): 330-5.
54. Kiefel V, Vicariot M, Giovangrandi Y, et al. Alloimmunization against Iy, a low-frequency antigen on platelet glycoprotein Ib/IX as a cause of severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura. *Vox Sang* 1995; 69 (3): 250-4.
55. Sachs UJ, Kiefel V, Bohringer M, et al. Single amino acid substitution in human platelet glycoprotein Ibbeta is responsible for the formation of the platelet-specific alloantigen Iy(a). *Blood* 2000; 95 (5): 1849-55.
56. Santoso S, Amrhein J, Sachs UJ, et al. Single point mutation in glycoprotein Ia responsible for the formation of a new platelet alloantigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1997; 90 (261a (abstract)).
57. Santoso S, Amrhein J, Hofmann HA, et al. A point mutation Thr(799)Met on the alpha(2) integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit(a) and affects collagen-induced aggregation. *Blood* 1999; 94 (12): 4103-11.
58. Santoso S, Kiefel V, Richter IG, et al. A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta(3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99 (4): 1205-14.
59. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, et al. Gova/b alloantigen system on human platelets. *Blood* 1990; 75 (11): 2172-6.
60. Smith JW, Hayward CP, Horsewood P, et al. Characterization and localization of the Gova/b alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood* 1995; 86 (7): 2807-14.
61. Jallu V, Meunier M, Brement M, Kaplan C. A new platelet polymorphism Duv(a+), localized within the RGD binding domain of glycoprotein IIIa, is associated with neonatal thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99 (12): 4449-56.

62. Kekomaki R, Raivio P, Kero P. A new low-frequency platelet alloantigen, Vaa, on glycoprotein IIb/IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med* 1992; 2 (1): 27-33.
63. Masters R, Taaning E. Three cases of platelet alloimmunisation associated with the presence of a novel platelet-specific antibody. *Vox Sang* 1998; 75 (3): 242-6.
64. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang* 2004;87 Suppl 1 (82-6).
65. 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.
66. Griffin HM, Ouwehand WH. A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. *Blood* 1995; 86 (12): 4430-6.
67. Proulx C, Chartrand P, Roy V, et al. Human monoclonal Fab fragments recovered from a combinatorial library bind specifically to the platelet HPA-1a alloantigen on glycoprotein IIb-IIIa. *Vox Sang* 1997; 72 (1): 52-60.
68. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, et al. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang* 2002; 83 (1): 1-12.
69. Morel-Kopp MC, Clemenceau S, Arousseau MH, et al. Human platelet alloantigen typing: PCR analysis is not a substitute for serological methods. *Transfus Med* 1994; 4 (1): 9-14.
70. Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Allen D, et al. A naturally occurring ARG-GLN substitution at position 93 of a platelet β 3 integrin abolishes anti-HPA-1a binding. *Blood* 2000; 96: 249a.
71. Santoso S, Kroll H, Andrei-Selmer CL, et al. A naturally occurring LeuVal mutation in beta3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1. *Transfusion* 2006; 46 (5): 790-9.
72. Skogen B, Wang R, McFarland JG, Newman PJ. A dinucleotide deletion in exon 4 of the P1A2 allelic form of glycoprotein IIIa: implications for the correlation of serologic versus genotypic analysis of human platelet alloantigens. *Blood* 1996; 88 (10): 3831-6.

73. Kroll H, Santoso S, Kremer V, et al. Frequency of Glanzmann's thrombasthenia carriers estimated by discrepancies in platelet alloantigen typing strategies. *Blood* 1996; 88 (320a).
74. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239 (4839): 487-91.
75. Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood* 1998; 92 (7): 2280-7.
76. Kuijpers RW, von dem Borne AE, Kiefel V, et al. Leucine33-proline33 substitution in human platelet glycoprotein IIIa determines HLA-DRw52a (Dw24) association of the immune response against HPA-1a (Zwa/PIA1) and HPA-1b (Zwb/PIA2). *Hum Immunol* 1992; 34 (4): 253-6.
77. Wu S, Maslanka K, Gorski J. An integrin polymorphism that defines reactivity with alloantibodies generates an anchor for MHC class II peptide binding: a model for unidirectional alloimmune responses. *J Immunol* 1997; 158 (7): 3221-6.
78. Schnaidt M, Wernet D. Platelet-specific antibodies in female blood donors after pregnancy. *Transfus Med* 2000; 10 (1): 77-80.
79. Semana G, Zazoun T, Alizadeh M, et al. Genetic susceptibility and anti-human platelet antigen 5b alloimmunization role of HLA class II and TAP genes. *Hum Immunol* 1996; 46 (2): 114-9.
80. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Kroll H, Mueller-Eckhardt G. HLA-DRw6, a new immune response marker for immunization against the platelet alloantigen Bra. *Vox Sang* 1989; 57 (1): 90-1.
81. Braud V, Chevrier D, Cesbron A, et al. Susceptibility to alloimmunization to platelet HPA-1a antigen involves TAP1 polymorphism. *Hum Immunol* 1994; 41 (2): 141-5.
82. Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 2001; 41 (6): 766-70.
83. 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.

84. 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.
85. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989; 1 (8634): 363-6.
86. 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.
87. Vanderpuye OA, Labarrere CA, McIntyre JA. A vitronectin-receptor-related molecule in human placental brush border membranes. *Biochem J* 1991; 280 (Pt 1) (9-17).
88. Mawas F, Wiener E, Williamson LM, Rodeck CH. Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 1997; 59 (5): 287-92.
89. Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med* 2004; 14 (6): 399-408.
90. Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors. *Hematol J* 2003; 4 (6): 441-4.
91. Scott EP, Moilan-Bergeland J, Dalmaso AP. Posttransfusion thrombocytopenia associated with passive transfusion of a platelet-specific antibody. *Transfusion* 1988; 28 (1): 73-6.
92. Solenthaler M, Krauss JK, Boehlen F, et al. Fatal fresh frozen plasma infusion containing HPA-1a alloantibodies. *Br J Haematol* 1999; 106 (1): 258-9.
93. 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.
94. Martinez Marignac VL, Bertoni B, Parra EJ, Bianchi NO. Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Hum Biol* 2004; 76 (4): 543-57.
95. Avena SA, Goicoechea AS, Rey J, et al. [Gene mixture in a population sample from Buenos Aires City]. *Medicina (B Aires)* 2006; 66 (2): 113-8.

96. Kolman CJ, Sambuughin N, Bermingham E. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics* 1996; 142 (4): 1321-34.
97. Merriwether DA, Hall WW, Vahlne A, Ferrell RE. mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding population for the New World. *Am J Hum Genet* 1996; 59 (1): 204-12.
98. Crawford MH. *The Origins of Native Americans: evidence from anthropological genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
99. Greenberg JH, Turner CG, Zegura SL. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Current Anthropology* 1986; 27 (5): 477-97.
100. Cavalli-Sforza LL. Genes, peoples and languages. *Sci Am* 1991; 265 (5): 104-10.
101. Leon SF, Ariza-Deleon A, Leon SM, Ariza CA. Peopling the Americas. *Science* 1996; 273 (5276): 723-5.
102. Cerna M, Falco M, Friedman H, et al. Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol* 1993; 37 (4): 213-20.
103. Bruges-Armas J, Martinez-Laso J, Martins B, et al. HLA in the Azores Archipelago: possible presence of Mongoloid genes. *Tissue Antigens* 1999; 54 (4) :349-59.
104. Holden C. Were Spaniards among the first Americans? *Science* 1999; 286 (5444): 1467-8.
105. Hernández I. "Los indios y la antropología en la Argentina". *Los indios y la antropología en América Latina*. Buenos Aires: Yuchán, 1984.
106. Bou LC. The new urban poor: the Tobas indians. *Dev Pract* 2000; 10 (1): 71-6.
107. Mazzucco et al Lea. 6th Europ. Symp. Plat., Gran.& Red Cell Immunobiology. Amsterdam 2000 Abstract Book (p 22).
108. Cristina B. Dejean BC-R, Alicia S. Goicoechea, Sergio A. Avena, Carnese aFR. Genetic variability in Amerindian populations of Northern Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 2001; 27 (4): 489-95.

109. Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, et al. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med* 2004; 14 (6): 433-7.
110. García Gutiérrez M, Sáenz de Tejada E, Cruz JR. Estudio de factores socioculturales relacionados con la donación voluntaria de sangre en las Américas. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13 (2/3).
111. Schmunis GA, Zicker F, Segura EL, del Pozo AE. Transfusion-transmitted infectious diseases in Argentina, 1995 through 1997. *Transfusion* 2000; 40 (9): 1048-53.
112. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. In: *Molecular cloning. A laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
113. Kluter H, Fehlau K, Panzer S, et al. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 1996; 71 (2): 121-5.
114. Skogen B, Bellissimo DB, Hessner MJ, et al. Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion* 1994; 34 (11): 955-60.
115. Pearson K. On a criterion that a given system of deviations from the probable in the case of correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. . *Philosophical Magazine* 1900; 50 (5): 157-75.
116. Pearson K. On the χ^2 test of goodness of fit. *Biometrika* 1922; 14 (186-91).
117. Ferrer G, Muniz-Diaz E, Aluja MP, et al. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfus Med* 2002; 12 (1): 49-54.
118. Mojaat N, Halle L, Proulle V, et al. Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue Antigens* 1999; 54 (2): 201-4.
119. Rozman P, Drabbels J, Schipper RF, et al. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. *Eur J Immunogenet* 1999; 26 (4): 265-9.

120. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens* 1996; 48 (2): 93-6.
121. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, et al. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet* 2003; 30 (6): 415-9.
122. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81 (3): 835-40.
123. Merieux Y, Debost M, Bernaud J, et al. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Pathol Biol (Paris)* 1997; 45 (9): 697-700.
124. Holensteiner A, Walchshofer S, Adler A, et al. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis* 1995; 25 (3): 133-6.
125. Kekomaki S, Partanen J, Kekomaki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med* 1995; 5 (3): 193-8.
126. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med* 1998; 8 (4): 339-42.
127. Robinson J, Waller MJ, Stoehr P, Marsh SG. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* 2005;33 Database Issue (D523-6).
128. Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 2005; 65 (3): 295-8.
129. Nogues N, Subirana L, Garcia Manzano A. Human platelet alloantigens in a Mexican population: a comparative gene frequency study. *Vox Sanguinis* 2000; 78 (P060).
130. Seo DH, Park SS, Kim DW, et al. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998; 8 (2): 129-32.
131. Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, et al. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion* 2002; 42 (8): 1089-95.

132. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, et al. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 1996; 36 (9): 813-7.
133. Tanaka S, Taniue A, Nagao N, et al. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox Sang* 1995; 68 (4): 225-30.
134. Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST, et al. Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2000; 10 (3): 207-12.
135. Covas DT, Biscaro TA, Nasciutti DC, et al. Gene frequencies of the HPA-3 and HPA-5 platelet antigen alleles among the Amerindians. *Eur J Haematol* 2000; 65 (2): 128-31.
136. Covas DT, Delgado M, Zeitune MM, et al. Gene frequencies of the HPA-1 and HPA-2 platelet antigen alleles among the Amerindians. *Vox Sang* 1997; 73 (3): 182-4.
137. Inostroza J, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Frequency of platelet-specific antigens PlA1, Baka, Yuka, Yukb, and Bra in South American (Mapuches) Indians. *Transfusion* 1988; 28 (6): 586-7.
138. Morel-Kopp MC, Blanchard B, Kiefel V, et al. Anti-HPA-4b (anti-Yuk(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: first report in a Caucasian family. *Transfus Med* 1992; 2 (4): 273-6.
139. Puig N, Muniz-Diaz E, Monteagudo E, et al. A second case of neonatal alloimmune thrombocytopenia by anti-HPA-4b (anti-Yuka) in a Caucasian family. *Transfus Med* 1993; 3 (2): 164-5.
140. Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean C, et al. Genetic relationships between Amerindian populations of Argentina. *Am J Phys Anthropol* 2001; 115 (2): 133-43.
141. Song EY, Park H, Roh EY, Park MH. HLA-DRB1 and -DRB3 allele frequencies and haplotypic associations in Koreans. *Hum Immunol* 2004; 65 (3): 270-6.
142. Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, et al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Ache. *Tissue Antigens* 2003; 62 (6): 512-26.
143. Davoren A, McParland P, Barnes CA, Murphy WG. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: a discrepancy between observed and expected cases. *J Clin Pathol* 2002; 55 (4): 289-92.
144. Davoren A, McParland P, Crowley J, et al. Antenatal screening for human platelet antigen-1a: results of a prospective study at a large maternity hospital in Ireland. *Bjog* 2003; 110 (5): 492-6.

ANEXOS

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
bp	par de bases (base pair)
CD	agrupación de diferenciación (cluster of differentiation)
CRP	Proteína C reactiva (C Reactive Protein)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (ethylenediamine tetra-acetic acid)
ELISA	Enzimo-inmunoensayo (enzyme-linked immunosorbent assay)
et al	y colaboradores
GP	Glicoproteína
GPI	Grupo Fosfadil-Inositol.
GRs	Glóbulos rojos
HGH	Hormona de crecimiento humana (Human Growth hormone)
HGNC	El comité en nomenclatura génica de la organización genoma humano (the Human genome organisation Gene Nomenclature Comité)
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos (Human Leukocyte Antigen)
HPA	Antígenos Plaquetarios Humanos (Human Platelet Antigen)
IC	Intervalo de confianza
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
INDEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
ITP	Púrpura trombocitopénica idiopática (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura)
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton
LCR	Reacción en cadena de la ligasa (Ligase Chain reaction)
MACE	(Modified Antigen Capture ELISA)
MAIPA	(monoclonal antibody-specific immobilisation of platelet antigens)
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
ml	mililitros
μL	microlitro

nm	nanómetros
PA-IgG	Inmunoglobulina G asociada a la plaqueta (platelet-associated IgG)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCR-SSP	Reacción en Cadena de la Polimerasa-cebador secuencia específica.
PCR- SSO	Reacción en cadena de la polimerasa y posterior Hibridación del producto con sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia.
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos (phosphate-buffered saline)
PIFT	Test de inmunofluorescencia plaquetaria (platelet immunofluorescence test)
pmol	picomol (1e-12 moles)
PTP	Púrpura trombocitopénica Post-Transfusional.
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.
RTP	Refractariedad a la transfusión de plaquetas.
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido.
SSCP	polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (The single-strand conformation polymorphism).
VNTR	número variable de repeticiones en tándem (Variable number of tandem repetition).
VWf	factor de Von Willebrand.
TCR	Receptor de las células T (T Cell Receptor).
TFNA	Trombocitopenia feto-neonatal aloinmune.
TPTP	Trombocitopenia pasiva postransfusional.

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del estudio: **GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO.**

Investigador: Bioquímico Carlos Daniel de La Vega Elena.

El objetivo de este trabajo es describir las frecuencias génicas y genotípicas para los sistemas de antígenos plaquetarios humanos clínicamente más importantes en dos poblaciones aún no caracterizadas, los donantes de sangre y los aborígenes Tobas de la ciudad de Rosario, Argentina.

La investigación de estos polimorfismos tiene gran importancia en el estudio de la trombocitopenia aloinmune feto-neonatal, la refractariedad a la transfusión de plaquetas, la Púrpura trombocitopénica postransfusional y otros cuadros de mediación no-inmunológica. Su descripción dará un marco a la búsqueda de productos compatibles para individuos sensibilizados contra dichos antígenos, así como permitirá estimar el riesgo relativo de aloimmunización en los diferentes grupos étnicos, necesario para desarrollar un programa de prevención para parejas con alto riesgo de tener hijos afectados de trombocitopenia feto-neonatal aloinmune, el equivalente plaquetario a la enfermedad hemolítica feto-neonatal.

El análisis comparativo de las frecuencias estimadas de ambas poblaciones con otras ya descritas, fundamentalmente las Europeas que más aportaron a la población Argentina con su inmigración masiva hasta 1930, como así también otras poblaciones aborígenes, supondrá un aporte de considerable valor antropológico al permitir inferir flujos génicos entre poblaciones

La metodología a emplear consistirá en la obtención de un volumen pequeño de sangre de la muestra obtenida de rutina (3 ml), la extracción del ADN y su posterior caracterización a nivel génico usando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores secuencia específica (PCR-SSP).

Se realizarán también determinaciones de otros antígenos de grupos sanguíneos correspondientes a los sistemas ABO, Rh, Diego y otros, con el fin de extender la descripción a otros polimorfismos de importancia transfusional y/o obstétrica.

Es importante indicar que:

- En el caso de los Donantes de sangre, estas determinaciones se realizan posteriormente a la analítica de rutina, no siendo necesario una muestra de sangre adicional. Cuando sea posible se obtendrá además, una muestra de saliva de alrededor de 2 ml
- En el caso de los aborígenes Tobas, estas determinaciones se realizaran sobre una muestra extraída para tal efecto de solo 3 ml de sangre entera y cuando sea posible se obtendrá además una muestra de saliva de alrededor de 2 ml
- No se administrará ningún tipo de tratamiento.
- Aportara información sobre aspectos aún no estudiados en estas poblaciones.
- No existe ningún tipo de incomodidades y riesgos derivados del presente estudio, ni hay posibilidad de acontecimientos adversos, fuera de los descritos para una flebotomía de muy bajo volumen.
- La participación en este proyecto de investigación tiene carácter voluntario, pudiéndose retirarse del mismo en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.
- Los datos del voluntario serán utilizados y manejados de forma **confidencial** y tan sólo tendrán acceso a los mismos el personal que participa en el desarrollo del presente proyecto de investigación.
- El investigador responsable del ensayo y de informar al sujeto y contestar a sus dudas y preguntas será el Bioquímico Daniel de La Vega. (Matrícula 1913, Colegio de Bioquímicos de Santa Fe - 2ª circunscripción. Rosario)

Título del ensayo: **GENOTIPIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS HUMANOS EN DONANTES DE SANGRE Y ABORÍGENES TOBAS EN ROSARIO.**

YO,.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.//

He podido hacer preguntas sobre el estudio.//

He recibido suficiente información sobre el estudio.//

//

He hablado con el Bioquímico Carlos Daniel de La Vega Elena.//

Comprendo que mi participación es voluntaria.//

Comprendo que mi participación no constituye un beneficio para mi persona.//

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercute de ninguna forma en mi persona.//

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante

D.N.I.