

R.27.759

TE 616.155.194

RIC

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

BIBLIOTECA UCM



5301486286

**LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y  
SU DIAGNOSTICO  
EN LA PRACTICA CLINICA**

María del Pilar Ricard Andrés

Madrid, 1993

Colección Tesis Doctorales. N.º 212/93

X-53-125475-4

© María del Pilar Ricard Andrés

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.  
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.  
Madrid, 1993.  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-30783-1993



La Tesis doctoral de D.<sup>ca</sup> Pilar Rivas Au-  
drás  
titulada La Esquizofrenia hereditaria y su diag-  
nóstico en la práctica clínica  
Director Dr. D.<sup>ca</sup> Florinda Iglesias Rodríguez  
fue leída en la Facultad de MEDICINA de la  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
el día 7 de Julio de 1992 ante el tribunal constituido  
por los siguientes Profesores:

Presidente Domènec Espinós Pérez  
Vocal Angel Miquel Esquet  
Vocal José Joaquín Fayó  
Vocal Dr.ª Sus Dambella García  
Secretario Ana Vilegas Martínez

habiendo recibido la calificación de Apto cum  
laude por unanimidad.

Madrid, a 7 de Julio de 1992.  
El Secretario del Tribunal.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

**A ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y SU DIAGNOSTICO  
EN LA PRACTICA CLINICA"**

**TESIS DOCTORAL**



MARÍA del Pilar Ricard Andrés  
- Madrid, 1992 -

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

"LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y SU DIAGNOSTICO  
EN LA PRACTICA CLINICA"

Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Medicina y Cirugía  
por la Universidad Complutense de Madrid  
por la licenciada D<sup>a</sup> María del Pilar Ricard  
Andrés y dirigida por la Dra. D<sup>a</sup> Florinda  
Gilsanz Rodríguez, Profesora Titular del  
Departamento de Medicina.

Madrid, Mayo de 1992

Este trabajo se ha realizado merced al Proyecto de Investigación del  
Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social FISS 86/737.

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMA: Que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. M<sup>a</sup> DEL PILAR RICARD ANDRES, titulado: "LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y SU DIAGNOSTICO EN LA PRACTICA CLINICA", dirigido por la Profra. Dra. Dña. Florinda Gilsanz Rodríguez, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión  
Consejo Departamento

1 de Junio de 1.992

El Director del Departamento

Fdo.: Prof. Carlos Perezagua  
(fecha y firma)  
1 de Junio 1.992

D<sup>a</sup> FLORINDA GILSANZ RODRIGUEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGIA Y PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICO: Que la Tesis Doctoral titulada "LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y SU DIAGNOSTICO EN LA PRACTICA CLINICA", ha sido realizada por D<sup>a</sup> María del Pilar Ricard Andrés bajo mi dirección y reúne las características necesarias para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y, para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, a veintiseis de Mayo de mil novecientos noventa y dos.

*Florinda Gilsanz*

Fdo.: Dra. D<sup>a</sup> Florinda Gilsanz

## INDICE

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

### I. INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION
2. OBJETIVOS
3. MATERIALES Y METODOS
4. RESULTADOS
5. DISCUSION
6. CONCLUSIONES
7. RESUMEN
8. BIBLIOGRAFIA

### II. INDICE DE FIGURAS

### III. INDICE DE GRAFICAS

### IV. INDICE DE TABLAS

### V. INDICE DE ARBOLES GENEALOGICOS

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. D<sup>a</sup> Florinda Gilsanz por su amistad y ejemplo, cuya dirección, ayuda y confianza constantes e incondicionales han hecho posible esta Tesis Doctoral.

A la Dra. D<sup>a</sup> Isabel Millán, del Servicio de Bioestadística de la Clínica "Puerta de Hierro", por su amabilidad y valiosa intervención en la práctica e interpretación del tratamiento estadístico.

A D<sup>a</sup> Elena Salinas y a D. Juan A. Torres, ATS/DUE del Laboratorio de Hematología del Hospital "12 de Octubre", por su colaboración inestimable y por su amistad.

A los Dres. D. Francisco J. Aracil y D. Luis F. Villa, del Hospital Universitario "Príncipe de Asturias", por brindarme gentilmente su tiempo y sus conocimientos de informática en la elaboración de las gráficas, árboles genealógicos y figuras.

A mis compañeros del Servicio de Hematología del Hospital Universitario "Príncipe de Asturias", tanto personal médico como técnico y auxiliar, por su simpatía, disposición y muchas veces agradable compañía durante la realización de parte del trabajo experimental. Asimismo deseo expresar mi agradecimiento a los Servicios de Hematología, de Análisis Clínicos y de Medicina Nuclear del Hospital "12 de Octubre", y al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario "Príncipe de Asturias". A D<sup>a</sup> Rosa Trueba, bibliotecaria del Hospital Universitario "Príncipe de Asturias", por su interés y eficaz labor.

A toda mi familia por su comprensión y paciencia infinitas, especialmente a mi esposo, Fernando, por su apoyo y por las muchas horas que no le he podido dedicar; a mi tía Angelines, que con tanto cariño y esfuerzo ha mecanografiado esta Tesis Doctoral, y a mi padre, Enrique, siempre a punto para ayudar en lo posible.

Pero, sobre todo, mi agradecimiento va dirigido a los enfermos y sus familias, verdaderos protagonistas de este trabajo, que sin su decidida colaboración nunca hubiese existido.

## ABREVIATURAS

Ank/B3:	contenido de la membrana eritrocitaria en ankirina.
ANOVA:	análisis de la varianza.
Area I:	tanto por ciento de hematíes con concentración de hemoglobina entre 35 y 37,5 g/dL.
Area II:	tanto por ciento de hematíes con concentración de hemoglobina entre 37,5 y 40 g/dL.
BSA:	albúmina sérica bovina.
CHCM:	concentración de hemoglobina corpuscular media calculada.
CV:	coeficiente de variación.
DTT:	ditiothreitol.
EH:	esferocitosis hereditaria.
EHE:	enfermos de EH esplenectomizados.
EHNE:	enfermos de EH no esplenectomizados.
EPO:	eritropoyetina.
g. l.:	grados de libertad.
Hb:	hemoglobina.
HC:	concentración de hemoglobina corpuscular media medida directamente.
HCM:	hemoglobina corpuscular media.
Hct:	hematocrito.
HDW:	desviación standard de la distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina.
% Hiper:	tanto por ciento de hematíes con concentración de hemoglobina mayor de 41 g/dL.
Htíes:	número de hematíes.
IC:	intervalo de confianza.
LDH:	lactato deshidrogenasa.
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero.
OD:	densidad óptica, absorbancia.
PBS:	buffer salino fosfato pH 7,2-7,4.

PCCEH:	Programa de Control de Calidad Externo en Hematología. . Comité de Estandarización en Hematología. Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.
PEH:	progenitores de enfermos de EH sin historia familiar.
PMSF:	fenilmetilsulfonilfluoride.
r:	coeficiente de correlación simple.
RDW:	coeficiente de variación de la distribución de los hematíes según volumen.
RGO:	resistencia globular osmótica.
SD:	desviación standard.
SDS:	dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
Sp/B3:	contenido de la membrana eritrocitaria en espectrina.
SSF:	solución salina fisiológica (CINa 9 g/L).
TBST:	buffer tris salino con Tween 20.
TEMED:	N, N, N', N' tetrametiletildiamina.
VCM:	volumen corpuscular medio.
$\bar{X}$ :	media aritmética.

## 1. INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Apunte histórico .....	2
1.2. Concepto clínicos de la Esferocitosis Hereditaria (EH) .....	3
1.2.1. Definición y prevalencia .....	3
1.2.2. Herencia .....	4
1.2.3. Manifestaciones clínicas .....	5
1.2.4. Complicaciones .....	6
1.2.5. Asociación con otras enfermedades .....	8
1.3. Base molecular de la EH .....	9
1.3.1. Composición y estructura de la membrana eritrocitaria .	10
1.3.2. Las proteínas de la membrana eritrocitaria. Estructura, genética y función .....	14
1.3.3. El esqueleto de la membrana eritrocitaria. Organización y modulación .....	24
1.3.4. Función del esqueleto de la membrana eritrocitaria .....	27
1.3.5. Defectos moleculares de la EH .....	30
1.4. Fisiopatología de la EH .....	33
1.5. Diagnóstico de la EH .....	38
1.5.1. Datos clínicos .....	38
1.5.2. Morfología eritrocitaria y datos hematológicos .....	39
1.5.3. Resistencia globular osmótica. Otros tests diagnósticos ...	44
1.5.4. Estudio del defecto molecular de la EH .....	48
1.6. Tratamiento y pronóstico .....	50
2. OBJETIVOS .....	53
3. MATERIALES Y METODOS .....	59
3.1. Enfermos y controles .....	60
3.2. Citometría de difracción de luz láser .....	61
3.3. Morfología de la serie roja .....	64

	<u>Página</u>
5.3.3. Características citométricas de la EH. Relación con otros datos .....	185
5.3.4. Eficacia estadística de la citometría de luz láser en el diagnóstico de la EH .....	186
5.3.5. Fragilidad osmótica, esferocitosis y EH .....	187
5.3.6 Rol de la SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria en el diagnóstico de la EH .....	188
5.4. Progenitores de EH sin historia familiar .....	192
5.5. Clasificación de la EH según su expresión biológica ..	194
6. CONCLUSIONES .....	198
7. RESUMEN .....	201
8. BIBLIOGRAFIA .....	205

## II. INDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
1. - Esquema del esqueleto de la membrana eritrocitaria .....	12
2. - Esquema de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de la membrana eritrocitaria ....	14
3. - Organización espacial del transportador aniónico o banda 3 .	16
4. - Organización tetramérica de la espectrina y sus asociaciones	18
5. - Anatomía molecular de la espectrina .....	20
6. - Complejos de unión del esqueleto de la membrana eritrocitaria .....	21
7. - Estructura de la proteína 4.1 .....	22
8. - Esquema de la anatomía ultraestructural del esqueleto de la membrana eritrocitaria .....	25
9. - Esquema de los reordenamientos del esqueleto de la membrana en la deformación reversible de los hematíes .....	28
10. - Esquema de la génesis de esferocitos en la EH .....	34
11. - Patobiología de la EH.....	36
12. - Morfología eritrocitaria en la EH .....	40
13. - Transformación discocito a esferoestomatocito y esferoequinocito .....	41
14. - Esquema de la citometría de apertura-impedancia .....	42
15. - Esquema de la citometría por difracción de luz láser .....	43
16. - Fragilidad osmótica de los hematíes en la EH .....	45
17. - Densitometrías de SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria. Control y EH .....	49
18. - Distribuciones de los hematíes según concentración de hemoglobina por citometría de luz láser. Control y EH .....	65
19. - SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria .....	71

### III. INDICE DE GRAFICAS

	<u>Página</u>
1. - Distribución de frecuencias. Variables edad y gravedad .....	118
2. - Distribución de frecuencias. Variable sexo .....	119
3. - Distribución de frecuencias. Variable herencia .....	120
4. - Distribución de frecuencias. Variable gravedad .....	121
5. - EHNE. Correlación lineal, variables CHCM y HC .....	122
6. - EHNE. Correlación lineal, variables CHCM y Area I .....	123
7. - EHNE. Correlación lineal, variables HC y % Hiper .....	124
8. - EHNE. Correlación lineal, variables HC y Area II .....	125
9. - EHNE. Correlación lineal, variables RDW y reticulocitos .....	126
10. - EHNE. Correlación lineal, variables CHCM y % Hiper .....	127
11. - EHNE. Correlación lineal, variables RGO inmediata Inicial y RDW.....	128
12. - EHNE. Correlación lineal, variables RGO incubada media y % Hiper .....	129
13. - EHNE. Correlación lineal, variables RGO incubada media y RDW .....	130
14. - EHNE. Correlación lineal, variables RGO incubada media y re- ticulocitos .....	131
15. - EHNE. Correlación lineal, variables haptoglobina y hematíes ...	132
16. - EHNE. Correlación lineal, variables EPO y hematíes .....	133
17. - EHNE. Correlación lineal, variables EPO y hemoglobina .....	134
18. - EHNE. Correlación lineal, variables EPO y hematocrito .....	135
19. - EHNE. Correlación lineal, variables EPO y RDW' .....	136
20. - EHNE. Correlación lineal, variables, gravedad y hematíes .....	137
21. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y hemoglobina ...	138
22. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y hematocrito .....	139
23. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y RDW .....	140
24. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y reticulocitos ....	141
25. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y bilirrubina total	142
26. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y EPO .....	143
27. - EHNE. Correlación lineal, variables gravedad y RGO incubada media .....	144
28. - EHE. Correlación lineal, variables HC y RDW .....	145

	<u>Página</u>
29. - EHE. Correlación lineal, variables HC y % Hiper .....	146 .
30. - EHE. Correlación lineal, variables HC y Area II .....	147
31. - EHE. Correlación lineal, variables HC y RGO inmediata inicial	148
32. - EHE. Correlación lineal, variables % Hiper y RDW .....	149
33. - EHE: Correlación lineal, variables % Hiper y RGO inmediata ini cial .....	150
34. - EHNE y Controles. Distribución de frecuencias, variable HC ....	151
35. - EHNE y Controles. Distribución de frecuencias, variable % Hiper	152
36. - EHNE y Controles. Distribución de frecuencias, variable Area I.	153
37. - EHNE y Controles. Distribución de frecuencias, variable Area II.	154
38. - EH, PEH y Controles. Distribución de frecuencias, variable Sp/B3	155
39. - EH, PEH y Controles. Distribución de frecuencias, variable Ank/B3	156

#### IV. INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
I.- Defectos moleculares primarios en la EH .....	95
II.- Abreviaturas, unidades y valores de referencia de los parámetros cuantitativos .....	96 y 97
III.- Abreviaturas y códigos de los parámetros cualitativos .....	98
IV.- EHNE. Datos clínicos, bioquímicos y de membrana .....	99 y 100
V.- EHNE. Datos hematológicos .....	101 y 102
VI.- EHE. Datos clínicos, bioquímicos y de membrana .....	103
VII.- EHE. Datos hematológicos .....	104
VIII.- PEH. Datos bioquímicos y de membrana .....	105
IX.- PEH. Datos hematológicos .....	106
X.- Controles. Datos hemocitométricos. Estudio de la membrana eritrocitaria. Tabla de medias .....	107
XI.- Casos. Datos bioquímicos y del estudio de la membrana eritrocitaria. Tabla de medias .....	108
XII.- Casos. Datos hematológicos. Tabla de medias .....	109
XIII.- EHNE. Análisis respecto de la variable gravedad .....	110
XIV.- Clasificación de la EH según su expresividad biológica .....	111
XV.- EHE. Datos pre y postesplenectomía .....	112
XVI.- EHE. Respuesta a la esplenectomía .....	113
XVII.- Casos y controles. Estudio intergrupo .....	114
XVIII.- Citometría por difracción de luz láser. Estudio de la membrana eritrocitaria. Eficacia diagnóstica .....	115
XIX.- Déficit parcial de espectrina y ankirina de la EH en la literatura .....	116

## V. INDICE DE ARBOLES GENEALOGICOS

	<u>Página</u>
Códigos .....	158
Familia A .....	159
Familia B .....	159
Familia C .....	160
Familia D .....	160
Familia E .....	161
Familia F .....	161
Familia G .....	162
Familia H .....	162
Familia I .....	163
Familia J .....	163
Familia K .....	164
Familia L .....	164
Familia M .....	165
Familia N .....	165
Familia O .....	166
Familia P .....	166
Familia Q .....	167
Familia R .....	167
Familia S .....	168
Familia T .....	169
Familia U .....	170
Familia V .....	170
Familia W .....	171
Familia X .....	171
Familia Y .....	172
Familia Z .....	172
Familia a .....	173
Familia b .....	173
Familia c .....	174
Familia d .....	174

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Apunte histórico

La Esferocitosis Hereditaria (EH) fue descrita en 1871 por Vanlair y Masius <sup>38,137,139</sup>, que estudiaron una familia belga cuyo propósito era una mujer joven aquejada de dolor abdominal recurrente, ictericia y debilidad. Su madre y hermana mayor presentaban síntomas similares. Los autores apreciaron que algunos hematíes de su propósito eran pequeños, esféricos e hipercrómicos, y sugirieron que se trataba de corpúsculos en vías de destrucción de los que procedía un exceso de pigmentos biliares <sup>38,137</sup>.

En 1890, Wilson comunicó seis miembros de una familia con esplenomegalia y subictericia, aparentemente hereditarias. En 1893, Wilson y Stanley detallaron más el cuadro sindrómico de esta familia con episodios de mayor ictericia asociados a cólico biliar y anemia, considerando secundaria a ello la afectación del bazo. Asimismo señalaron la cronicidad de la enfermedad, que no impedía una vida duradera <sup>38</sup>. Una de sus pacientes falleció, su examen postmortem del bazo reveló su congestión macro y microscópicamente y la causa de la muerte dictaminada fue hemólisis activa de origen esplénico <sup>38</sup>.

La descripción más conocida de la enfermedad fue de Minkowski en 1900, con ocho casos de ictericia en tres generaciones de una familia <sup>38,137,139</sup>. Barlow y Shaw (1902) participaron la existencia de úlceras distales en las piernas de sus dos pacientes <sup>38</sup>.

En 1907, Chauffard cuantificó la fragilidad osmótica de sus enfermos, observando que difería de otros tipos de ictericia en que los hematíes eran muy frágiles, y con la anisocitosis de los casos concluyó que las células más pequeñas eran las más frágiles <sup>38,137</sup>.

Más aportaciones importantes han sido las publicaciones sobre la corrección de la hemólisis con la esplenectomía <sup>6,113</sup> y los estudios de Ham y Castle sobre el atrapamiento y condicionamiento esplénico de los esferocitos <sup>137,138</sup>. Otros trabajos revelaron anomalía en el transporte de membrana de cationes monovalentes y en la fosforilación de varias proteínas de membrana, así como reducción de la superficie celular por pérdida de lípidos <sup>35</sup>, pero ulteriores estudios demostraron que tales anomalías eran debidas a defecto subyacente de las proteínas del esqueleto

de la membrana <sup>12,135</sup>. Las investigaciones más recientes se han polarizado, en estas proteínas ya individualizadas. Greenquist y cols. <sup>72</sup> observaron que ciertos ratones con anemia hemolítica esferocítica grave eran deficientes en espectrina, posteriormente se apreció que su defecto molecular primario era heterogéneo, pudiendo afectar bien a la cadena  $\alpha$  espectrina (mutación sph), bien a la cadena  $\beta$  espectrina (mutación ja) o bien a la ankirina (mutación nb) <sup>19</sup>. Se describió déficit parcial de espectrina en la EH humana <sup>2</sup>.

Actualmente se considera que el déficit de espectrina juega un papel primordial en la desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana, aunque sólo en una minoría de casos podría ser el defecto molecular primario, que en otros casos radicaría en la ankirina o en otras proteínas, como comentaremos en este trabajo.

## 1.2. Conceptos clínicos de la Esferocitosis Hereditaria

### 1.2.1. Definición y prevalencia

La EH es el trastorno hemolítico hereditario más prevalente en la población. Es una entidad heterogénea, de herencia autosómico dominante generalmente, caracterizada por una disminución de la relación superficie/volumen de los hematíes, con hemólisis, presencia de esferocitos en sangre periférica, elevación de la concentración de hemoglobina corpuscular media en la mitad de los casos, aumento de la fragilidad osmótica y respuesta clínica favorable a la esplenectomía. Sus heterogéneas bases moleculares residen en defectos primarios de las proteínas de la membrana eritrocitaria <sup>6,12,139</sup>, que aún se desconocen en la mayor parte de los casos <sup>6,12,112, 139,163,191</sup>,

Su prevalencia estimada en la población occidental es 1:5000. Esta cifra muy probablemente infravalora la realidad, dada la gran frecuencia de casos leves y asintomáticos que se detectan solamente con ocasión del estudio familiar de un caso de EH, y la alta prevalencia descrita de fragilidad osmótica aumentada en donantes de sangre sanos (aproximadamente del 1%)<sup>65</sup>.

La EH también afecta otros grupos étnicos como japoneses y negros africanos, pero se desconoce su prevalencia en ellos 6,137,139. Un estudio reciente en Argelia (de mezcla genética Europea y de Africa central oriental y subsahariana) cifra la frecuencia absoluta de la EH en 1:1000 191.

### 1.2.2. Herencia

La EH se considera típicamente como de herencia autosómico dominante en la mayoría de los casos 6,12,112,139,163, aproximadamente un 75% de los pacientes 6,112. Se han descrito casos autosómico recesivos 2,3,4,30, que frecuentemente presentan hemólisis grave, y se ha observado en varias ocasiones que los progenitores de los enfermos sin afectación familiar aparente muestran mínimas anomalías en algunos parámetros de hemólisis y fragilidad osmótica, sugiriendo que se trata de casos muy leves o asintomáticos y que su descendencia afecta es homocigota o doble heterocigota de la carga genética responsable 2,4,6,137,139. En algunas familias la forma de EH autosómico recesiva es extremadamente grave o incluso letal 6,137,139.

Ante lo heterogéneo de la base molecular de esta entidad, son varios los genes asociados a la EH 163,

- el brazo corto del cromosoma 1 (q22-q25) alberga el locus de la cadena  $\alpha$  espectrina 19,79 y existe mutación de su dominio  $\alpha$ II en algunos pacientes con formas de EH consideradas autosómico recesivas 119.
- el cromosoma 14 (q23-q24.2) codifica la cadena  $\beta$  espectrina 18,59, 143, el defecto en su dominio  $\beta$ IV se asocia a aquellas EH autosómico dominante con una cadena  $\beta$  espectrina disfuncional por ser fácilmente susceptible de oxidación 13, quedando dañado su lugar de unión con la proteína 4.1 y debilitadas las interacciones espectrina-actina 69,186,
- el cromosoma 8, concretamente 8p11.2, contiene el gen de la ankirina 27,96,116, proteína deficitaria en ratones con anemia hemolítica esferocítica grave afectos de la mutación nb/nb 19, y se han descrito pacientes con déficit parcial de ankirina tanto en EH autosómico dominante 36,82 como no dominante 30,77,116, habiéndose demostrado una fuerte asociación del locus de la EH autosómico dominante con el polimorfismo Nco I del gen de la ankirina 36. Asimismo se ha observado delección intersticial del cromosoma 8 ó su translocación a otros cromosomas en varios pacientes con EH 27,32,116.

### 1.2.3. Manifestaciones clínicas

La EH es una entidad caracterizada por su heterogeneidad clínica, de forma que la gravedad del defecto es variable entre enfermos de diferentes familias y sin embargo los individuos afectos de una misma familia suelen presentar un grado de hemólisis similar <sup>6,138</sup>, aunque en ocasiones las manifestaciones clínicas pueden variar considerablemente entre los miembros de una determinada familia <sup>138,163</sup>. Se perfilan diferentes cursos clínicos en la EH, según la gravedad de la hemólisis <sup>6,12,112,138,139,163</sup>.

- formas típicas, en las que el paciente presenta signos de hemólisis leve o moderada y puede estar relativamente asintomático, aunque con cierto grado de ictericia y esplenomegalia y a menudo sin anemia, compensada con reticulocitosis por hiperplasia eritroide en la médula ósea. Estos enfermos pueden sufrir complicaciones como colelitiasis, crisis anémicas, úlceras maleolares, entre otras que revisaremos en este epígrafe clínico,
- formas leves y asintomáticas quizás más de un 20-30% de casos <sup>112,163</sup>, que frecuentemente se descubren al realizar el estudio familiar de casos más sintomáticos, o bien durante la gestación <sup>78</sup>, o a causa de infecciones transitorias como la mononucleosis infecciosa o la infección por parvovirus B 19 <sup>32,100</sup>, en otros casos se descubre por la existencia de colelitiasis <sup>113</sup>, incluso algunos enfermos se diagnostican en edades avanzadas <sup>58</sup>. Estos pacientes son esencialmente asintomáticos, no presentan anemia y su reticulocitosis y evidencia bioquímica de hemólisis son mínimas o inexistentes, y su EH solamente se detecta mediante el test de fragilidad osmótica incubada <sup>6,12,138,139</sup> (su versión no incubada suele ser normal), que en ocasiones es sólo sutilmente superior al límite de la normalidad. También se intensifica la hemólisis por esfuerzos físicos intensos, posiblemente por aumento del flujo sanguíneo esplénico, pudiendo deteriorarse de forma significativa el rendimiento atlético en deportes de resistencia <sup>112</sup>. Ciertos sujetos de tales características han engendrado enfermos con EH de curso clínico grave considerada de herencia autosómico recesiva <sup>2,3,4,6</sup>,

- formas atípicas con hemólisis grave, que son relativamente raras (menos del 5% de casos), presentando el paciente una anemia hemolítica severa incluso con compromiso vital desde edades muy tempranas de la vida 2,4,12,30,139. En general carecen de afectación familiar aparente, según los métodos diagnósticos convencionales, y se consideran EH de herencia autosómico recesiva 2,3,4,6,12,30,139,
- forma neonatal, período en que la EH es comúnmente sintomática (hasta en un 50% de casos) 112. La ictericia neonatal es habitualmente evidente en las primeras 48 h de vida, aunque en un 20% de pacientes puede diferirse hasta después de la primera semana. En la mayoría de los casos la ictericia puede controlarse con fototerapia aunque en ocasiones hay que recurrir a la exanguinotransfusión. También es común la anemia (Hb menor de 15 g/dL) en la EH neonatal, y raramente es importante. No existe evidencia de que las EH sintomáticas en el período neonatal sean formas más graves, la mayoría de los niños quedan relativamente asintomáticos tras este período. Algunos pacientes pueden requerir transfusión en las primeras 4 semanas de vida, debido a que la respuesta medular a la anemia es perezosa, con una reticulocitosis pobre, incluso con hematocritos en torno a 20%, que habitualmente mejora en el plazo de una o dos transfusiones. El diagnóstico de la EH neonatal es en general más difícil que en otras etapas de la vida, con el agravante de que los hematíes fetales son osmóticamente más resistentes que los hematíes adultos, aunque se acepta que el test de fragilidad osmótica incubado es un arma diagnóstica fiable. En ocasiones el diagnóstico diferencial con la enfermedad hemolítica del recién nacido y sepsis está facilitado por los estudios familiares (positivos en un 75% de los pacientes) y por la evolución clínica 112.

#### 1.2.4. Complicaciones

La evolución clínica de los pacientes afectados de EH puede estar jalonada de una serie de complicaciones, que comentamos a continuación:

- Crisis anémicas, a su vez de carácter heterogéneo, distinguiéndose varios tipos:
  - crisis hemolíticas verdaderas, que son raras y se han descrito asociadas a infecciones 113, debidas probablemente a estímulo reticuloendotelial 112 con cierto grado de hiperesplenismo 83, con un discreto aumento transitorio de la hemólisis, que habitualmente no anemiza seriamente al paciente,

- crisis megaloblásticas, a veces como manifestación inicial de la EH, son de comienzo más gradual y se producen particularmente en el embarazo como consecuencia de la mayor demanda de ácido fólico que conlleva, dado que su déficit compromete la compensación eritropoyética 12,139,
- crisis aplásicas, tienen lugar durante infecciones virales, siendo el parvovirus B 19 100,189 su agente causal más prevalente. Esta infección denominada eritema infeccioso o quinta enfermedad 189, puede ser asintomática o cursar con fiebre y escalofríos, deterioro general, síntomas de vías respiratorias altas, dolor abdominal con intolerancia digestiva y ocasional diarrea, artralgias o mialgias, y un característico exantema maculopapular facial que también puede aparecer en tronco y extremidades. El parvovirus B 19 suprime la eritropoyesis selectivamente 113,188 (de forma predominante aunque no exclusiva según opinión de otros autores 75) produciendo una anemia por hipoplasia eritroide con reticulocitopenia, con frecuencia grave, que puede ser la primera manifestación de la EH 100. La eritropoyesis normalmente se recupera al cabo de 7-10 días del comienzo de la crisis 83, 189.

Asimismo, pueden producirse crisis aplásicas por eritrosupresión por fármacos 83,

- colelitiasis, la complicación más frecuente de los casos de EH típica, en relación con la hiperbilirrubinemia que presentan los pacientes no esplenectomizados. Se hallan cálculos biliares aproximadamente en el 50% de los pacientes (hasta en un 85% de los enfermos adultos 83) incluso los afectos de formas muy leves de la enfermedad 80,163. Raramente se encuentran en niños y su incidencia crece con la edad aunque se ha constatado colelitiasis incluso en el tercer año de vida 113. Estos cálculos de bilirrubina son generalmente pequeños, múltiples, facetados y raramente carcinógenos 83. Dada la alta prevalencia de esta complicación, se recomienda la revisión ultrasonográfica periódica de los pacientes en este sentido 139. Se ha estimado en un estudio prospectivo que la probabilidad de que un enfermo con colelitiasis asintomática desarrolle síntomas (colecistitis, obstrucción biliar) es del 18%<sup>71</sup>,

- úlceras maleolares, en general infrecuentes pero indolentes y crónicas cuando aparecen y que dan paso a una dermatitis eritematoedematosa, dermatosis crónica o pigmentación en caso de cicatrizar 38,139. Se dan en aquellos pacientes con formas de EH clínicamente más graves y de edad media o avanzada y característicamente se curan rápidamente tras la esplenectomía 38,139. Su patogenia no es bien conocida, pero puede ser reflejo de la deformabilidad alterada de los esferocitos, cuyo efecto es más notorio en una región anatómica pobremente vascularizada y vulnerable a pequeños traumatismos repetidos 38,139,
- otras complicaciones, como:
  - . signos y síntomas de expansión del compartimento medular eritroide, pudiendo producir cambios esqueléticos como la turricefalia o braquicefalia o cierta deformidad maxilofacial que supone en los pacientes unos rasgos asiáticos típicos. En otras ocasiones existe verdadera hemopoyesis extramedular 10,38,139,141, que se ha descrito en diversas regiones anatómicas, y cuya afectación en cuerpos vertebrales puede producir manifestaciones neurológicas de compresión medular o radicular; cuando se localiza en el tórax (principalmente en el mediastino inferior, retropleural y paravertebral 10) plantea diagnóstico diferencial con masas neoplásicas 10,38,139,141,
  - . retrasos del crecimiento, del desarrollo esquelético y de la maduración sexual, que se dan en las EH clínicamente más graves 83,
  - . hemocromatosis, a la que contribuye el aumento de la absorción de hierro intestinal vinculado a la regeneración eritroblástica modular, las transfusiones repetidas en los pacientes más gravemente afectados, y en algunos casos explicable por la asociación de los defectos genéticos de la EH y la heterocigocia de la hemocromatosis ligada al HLA 52,137,139,
  - . hiperesplenismo.

#### 1.2.5. Asociación con otras enfermedades

Es conocida la asociación de la EH con el retraso psicomotor 27,30,32,38,92,116,139, y en tres de estos pacientes se han demostrado deleciones intersticiales del cromosoma 8 (del 8p11-p21.1) 27,92,116 con pérdida comprobada de un gen de la ankirina (8 p11.2, técnica de hi-

bridación in situ) en dos casos, con el consiguiente déficit parcial de ankirina en la membrana eritrocitaria <sup>116</sup>. Puesto que la ankirina del hematíe es funcional y estructuralmente similar a la ankirina del tejido nervioso<sup>134</sup>, se ha especulado que el déficit parcial de ankirina de estos pacientes (constatado en sus eritrocitos) pudiera ser responsable de tal retardo psicomotor <sup>139</sup>, posibilidad que se atenuaría dado que al menos dos de las múltiples isoformas de la ankirina están codificadas por un gen separado <sup>182</sup>.

También se ha descrito la coexistencia de EH con trastornos funcionales de la médula espinal<sup>38,139</sup> y cardiomiopatía hipertrófica <sup>130</sup>.

Es interesante considerar que las proteínas del esqueleto de la membrana eritrocitaria, como la espectrina, ankirina y proteínas 4.1 y 4.2, son comunes a otros tejidos <sup>40,98,153,170</sup>, y cabría esperar que la repercusión de sus defectos no fuese solamente aparente en la serie roja. Sin embargo, las espectrinas no eritroides parecen ser producto de genes  $\alpha$  y  $\beta$  diferentes de los que codifican las correspondientes cadenas eritrocitarias <sup>41,101</sup>; esta afirmación no es tan contundente para la  $\beta$  espectrina <sup>41,139</sup>, que puede ser producto de un único gen, como sucede con la proteína 4.1<sup>33,170</sup>, debiendo su diversidad tisular a splicings alternativos del RNA nuclear heterogéneo, dando lugar a distintos RNA mensajeros <sup>34,170,185</sup>.

### 1.3. Base molecular de la EH

El eritrocito normal tiene una forma de disco bicóncavo por su exceso de superficie de membrana respecto del volumen celular<sup>6,22</sup>, excedente que no es necesario para la célula en reposo pero sí para su supervivencia media de 120 días en el lecho vascular, en el que sufre numerosos ciclos de deformación reversible y elástica fisiológicamente <sup>26,157</sup>, con el consiguiente cambio de forma que permite al hematíe soportar fuerzas de cizallamiento (superiores a 2000 dyn/cm<sup>2</sup> en la eyección a través de la válvula aórtica) con la capacidad de adaptarse a los pequeños pasos de la microcirculación, con capilares y fenestraciones del lecho vascular esplénico de 2-3  $\mu$ m, calibre inferior a los 8  $\mu$ m de diámetro del eritrocito normal <sup>6,129,132</sup>. Existen varios determinantes de la propiedad del hematíe

intacto de deformarse y recobrar su forma original, entre ellos la viscosidad citoplásmica, la relación superficie/volumen y la deformabilidad de la membrana <sup>26</sup>, determinada por el esqueleto de la membrana eritrocitaria <sup>6,12,24,26,38,45,83,124,127,129,137,139</sup>.

La membrana es la principal estructura física del hematfe <sup>129</sup>. Ha sido muy estudiada, con las ventajas de ser fácilmente accesible y de sencilla obtención, y cuya estructura tiene un interés general para la investigación en las membranas celulares de otros tejidos más complejos <sup>8</sup>. Estos estudios han permitido conocer datos de la base molecular de los defectos de la membrana eritrocitaria como la EH, asociada a cambios en los genes codificadores de proteínas estructurales de la membrana en los trabajos más recientes.

### 1.3.1. Composición y organización estructural de la membrana eritrocitaria

La membrana eritrocitaria está constituida por una bicapa lipídica con una red submembranosa anclada de proteínas filamentosas, tapizando la superficie citoplásmica denominada esqueleto de la membrana, de papel primordial en el mantenimiento de la forma del hematfe y en la regulación de las propiedades de deformabilidad y estabilidad mecánica de la membrana <sup>26,108,127,129,149,159</sup> (figura 1.).

La membrana eritrocitaria está bien caracterizada tanto bioquímicamente como en cuanto a la organización estructural de sus componentes lipídicos y proteicos. Aproximadamente, un 52% de la masa de la membrana son proteínas, 40% son lípidos y 84 son carbohidratos <sup>129</sup>.

Los componentes lipídicos principales son el colesterol no esterificado y los fosfolípidos, que representan más del 95% del contenido total en lípidos de la membrana eritrocitaria, y que se hallan presentes en un índice molar colesterol/fosfolípidos de 0,85. Junto a ellos, existen también pequeñas cantidades de glicolípidos, glicéridos y ácidos grasos libres. Las concentraciones aproximadas de los fosfolípidos en la membrana son las siguientes: 30% de fosfatidilcolina, 28% de fosfatidiletanolamina, 14% de fosfatidilserina y 25% de esfingomielina; otros fosfolípidos como el ácido fosfatídico, fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-difosfato representan aproximadamente el 2-3% restante <sup>41,129,149</sup>.

Con la disposición en forma de bicapa, los grupos polares o hidróf-

licos de cada monocapa se orientan "hacia fuera" en contacto con los medios intra y extracelular, mientras que las cadenas laterales de los lípidos, apolares, se disponen "hacia dentro", formando un gran núcleo hidrófobo en la bicapa, que a temperaturas normales se encuentra en un estado líquido cristalino que permite las propiedades mecánicas de la membrana <sup>149</sup>. Los lípidos no se distribuyen simétricamente, de forma que los glicosfingolípidos y más del 75% de los apolares fosfolípidos de colina fosfatidilcolina y esfingomiélinina se disponen en la monocapa externa, mientras que el 80% de la fosfatidiletanolamina y toda la fosfatidilserina (fosfolípidos polares) y los fosfatidilinositoles se ubican en la monocapa interna, en la que existe un exceso de cargas positivas <sup>41,112,129,149,159</sup>.

La base bioquímica de esta asimetría lipídica de la membrana eritrocitaria es resultado de hechos físicos como el desplazamiento lento y simétrico de los fosfolípidos lateralmente en el plano de cada monocapa, y la interacción directa entre las proteínas del esqueleto de la membrana y los fosfolípidos polares, con consiguiente inmovilización de los mismos en la monocapa interna; sin embargo, el colesterol difunde rápidamente a través de la membrana. El hematfe maduro no puede sintetizar lípidos de novo, pero es capaz de generar una considerable renovación de fosfolípidos sin cambios sustanciales en su composición lipídica, merced a una serie de rutas metabólicas <sup>41,112,159</sup>. Por otra parte, el contenido de colesterol de la membrana se regula mediante intercambio con el colesterol plasmático <sup>112,129</sup>.

La función de la bicapa lipídica es proporcionar una continuidad física a la membrana, con impermeabilidad para los solutos a su vez, y actuar como matriz o soporte en que las proteínas integrales o transmembránicas (denominación debida a que tales proteínas se extienden en toda la anchura de la bicapa lipídica) se encuentran inmersas. Su fluidez depende de la composición lipídica <sup>129</sup>. Los lípidos de la membrana parecen tener una influencia limitada en la forma del hematfe, aunque bajo ciertas circunstancias pueden determinar interferencias, es conocido que una sobrecarga de colesterol determina acantocitosis, algunas drogas anifílicas como la lecitina y las sales biliares producen equinocitos al intercalarse preferentemente en la monocapa externa, y otros fármacos como la clor-

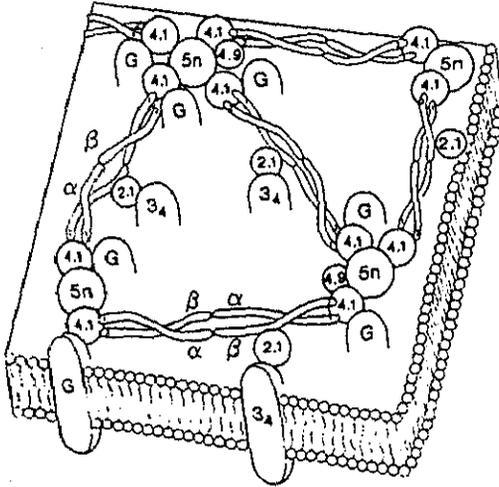


Figura 1.- Esqueleto del esqueleto de la membrana eritrocitaria (modificado de Palek, 1990<sup>157</sup>). Es una red proteica submembranosa constituida por una malla hexagonal de tetrameros de espectrina interconectados entre sí por complejos de unión. La espectrina está compuesta por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (bandas 1 y 2) como heterodímeros asociados por su cabeza para formar tetrameros cuyos extremos distales se unen a complejos de unión formados por actina oligomérica (5n) estabilizada por troponina, proteína 4.1, anquirina y cemaína (proteína 4.9). El esqueleto se une a las proteínas integrales por asociación de la cadena  $\beta$  espectrina con la anquirina (banda 2.1), a su vez unida al dominio citoplásmico del canal aniónico (banda 3) probablemente organizado especialmente como tetramero (3<sub>4</sub>), y de la proteína 4.1 con la glicoforina C (G).

promacina y la procaína, generan estomatocitos al infiltrarse en la monocapa interna; se desconoce cómo participa el esqueleto de la membrana en estos cambios <sup>41,159</sup>.

La composición proteica de la membrana eritrocitaria se estudia mediante hemólisis hipotónica <sup>43,50</sup> que permite obtener la membrana aislada o estroma con su esqueleto, seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS <sup>50,95,166</sup> (SDS-PAGE, figura 2), método que separa las proteínas de acuerdo con su peso molecular y que ha generado una nomenclatura uniforme de uso común que asigna un número a cada una de las 10 a 12 fracciones obtenidas según su orden de migración desde la más pesada banda 1, correspondiente a la cadena  $\alpha$  espectrina, de 240.000 daltons de peso molecular, hasta los restos de monómeros de globina de 16.000 daltons (figura 2).

Se han utilizado diversos procedimientos para deducir la ubicación en la membrana de estos polipéptidos; para determinar si una proteína se dispone hacia la superficie interna o externa, se han realizado preparaciones de membrana marcadas en una u otra superficie con yodo radioactivo, y los estudios de las asociaciones entre proteínas han permitido conocer su ordenación en la membrana <sup>149,159</sup>. Así pues, las proteínas de la membrana se dividen en dos grupos principales: integrales y periféricas <sup>41,112,129,149,159</sup>.

Las proteínas integrales o transmembránicas están estrechamente unidas a la membrana por medio de interacciones hidrofóbicas con la bicapa lipídica, abarcan en su extensión toda la anchura de la membrana y tienen diferentes dominios estructurales y funcionales, tanto dentro del espesor de la bicapa como a los lados de la misma. Son de este tipo de proteínas la banda 3 o canal aniónico y las glicoforinas.

Las proteínas periféricas de la membrana se encuentran en su cara citoplásmica, como espectrina, actina y proteína 4.1., integrantes del esqueleto de la membrana eritrocitaria. Estas proteínas pueden ser fácilmente extraídas de la membrana con soluciones de baja fuerza iónica o más completamente mediante altas concentraciones del detergente no iónico Tritón X-100 <sup>41,112,129,149,159</sup>. Existen otras proteínas periféricas que no forman parte del esqueleto, como la ankirina y la proteína 4.2,

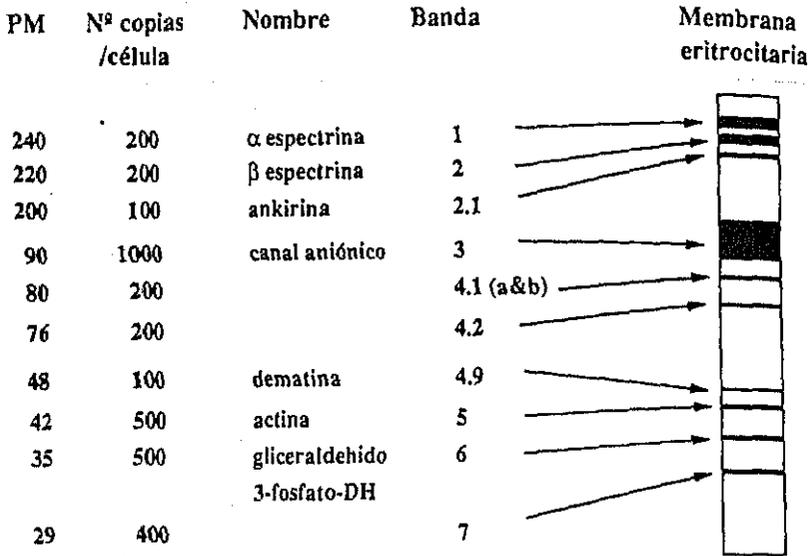


Figura 2.- Esquema de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de la membrana eritrocitaria según el sistema de Fairbanks y cols. (1971)<sup>50</sup>, con tinción para proteínas con azul de Coomassie. Las fracciones proteicas se separan según su peso molecular (PM) y se les asigna un orden numérico de menor a mayor migración, que obedece a su mayor a menor peso molecular.

que requieren condiciones muy especiales para su aislamiento de la membrana (obtención a partir de vesículas eritrocitarias con la superficie interior hacia fuera y libres de espectrina y actina)<sup>41</sup>.

### 1.3.2. Las proteínas de la membrana eritrocitaria. Estructura, genética, y función

Las proteínas integrales más abundantes y mejor estudiadas de la membrana eritrocitaria son las glicoforinas (una familia de sialoglicoproteínas) y la banda 3 o canal aniónico.

Las glicoforinas son un grupo formado por cuatro glicoproteínas ricas en ácido siálico denominadas A, B, C y D, que constituyen aproximadamente un 2% del contenido protéico total de la membrana<sup>9</sup>. Las glicoforinas A, B y C están constituidas por 131, 72 y 128 aminoácidos respectivamente y son producto de genes diferentes, sitos en el cromosoma 4 (q28-q31) para las glicoforinas A y B y en el cromosoma 2 (q14-q21) para la glicoforina C<sup>41,116,129,138</sup>. Estas proteínas están formadas por tres dominios: un dominio citoplásmico que contiene un acúmulo de residuos básicos próximo a la membrana, un dominio hidrofóbico que se dispone en  $\alpha$ -hélice extendida en la anchura de la bicapa lipídica, y un dominio extracelular muy glicosilado<sup>9</sup>. Las glicoforinas A, B y C son responsables de la especificidad antigénica de los grupos sanguíneos MN, Ss y Ge respectivamente<sup>41,112,129,138</sup>. La presencia de los carbohidratos confieren una fuerte carga negativa a la superficie celular, que funcionalmente reduce la interacción de los hematíes entre sí y con otras células, como el endotelio vascular<sup>9,129</sup>. La glicoforina C (28.000 daltons) juega un papel primordial en la unión del esqueleto de la membrana a la bicapa lipídica por su interacción con la proteína 4.1<sup>9,41,112,129,136,138,149,159</sup>. La glicoforina D parece ser una forma acortada de glicoforina C<sup>138</sup>. Este grupo de sialoglicoproteínas se identifican como bandas PAS positivas de la SDS-PAGE<sup>9</sup>.

La banda 3, canal aniónico o transportador aniónico es la principal proteína integral y representa un 25% del contenido protéico total de la membrana eritrocitaria<sup>41,129</sup> (figura 3). Está formada por 911 aminoácidos, con un peso molecular de 95.000 daltons (el 6-7% de la población es heterocigota para una variante funcionalmente normal de 96.000 daltons<sup>112</sup>) y está presente en aproximadamente 1 millón de copias/célula formando dímeros y tetrameros unidos no covalentemente tanto en la membrana como en solución<sup>41,112,138</sup>. Se ha demostrado que es producto de un gen localizado en el cromosoma 17 (q21-qter)<sup>114,116</sup>. La banda 3 está constituida por tres dominios estructural y funcionalmente diferentes (figura 3).

Comienza en un dominio citoplásmico hidrofílico de 43.000 daltons que contiene el -NH<sub>2</sub> terminal (aminoácidos 1 a 403), protruye unos 25 nm de la superficie interna de la membrana, exhibe una charnela flexible<sup>41,107</sup> y funciona independientemente interactuando con diversas proteínas citoplásmicas y de membrana, como la hemoglobina, varios enzimas

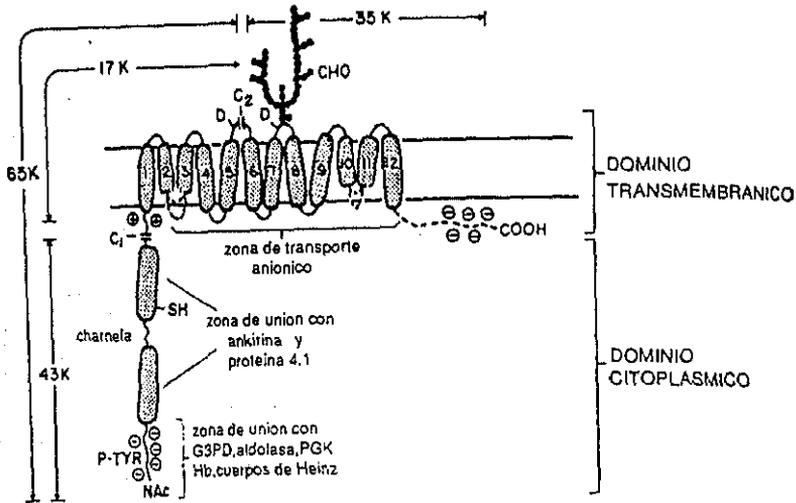


Figura 3.- Organización espacial del transportador aniónico o banca 3 (modificado de Luz, 1987<sup>112</sup>). Las líneas de puntos indican zonas de incertidumbre. C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> son los puntos de digestión quimotriptica. P denota áreas fosforiladas. D señala las localizaciones aproximadas de unión para el DIDS (un inhibidor del transporte aniónico) que se suponen situadas en o cerca de la entrada externa al canal aniónico. CHO se refiere al oligosacárido ramificado, un lactosaminoglicano complejo. G3PD y PGK son las abreviaturas de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato kinasa. SH representa un grupo sulfhidrilo reactivo.

glicolíticas (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa o banda 6, aldolasa y fosfofructokinasa), hemicromos y ankirina (cuyo lugar de unión abarca regiones no contiguas en la vecindad de la charnela flexible) proteína 4.1 y proteína 4.2. 41,107,112,138. Tras el dominio citoplásmico, la banda 3 atraviesa 12 veces el espesor de la bicapa lipídica y forma el hidrofóbico dominio transmembránico de 52.000 daltons (aminoácidos 404 a 882) que constituye el transportador aniónico, y el ácido dominio carboxiterminal (aminoácidos 883 a 911), también en el citoplasma y de función desconocida. La banda 3 contiene un oligosacárido ramificado unido a ella por enlace N-glicosídico, que protruye 5 nm de la superficie externa de la membrana 41 y que expresa especificidades antigénicas de los grupos sanguíneos ABH e II y el antígeno del envejecimiento eritrocitario 41,112,129. Existen dos funciones claramente establecidas de la banda 3 en la membrana del hematíe: el transporte de aniones, con intercambio con  $\text{Cl}^-$  y  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , y la unión física de la bicapa lipídica con el esqueleto de la membrana, principalmente que su unión con la ankirina y secundariamente por su interacción con las proteínas 4.1 y 4.2 41,107,112,129,138,149. La regulación de la unión banda 3 - ankirina no es bien conocida, y sólo una parte de la banda 3 está ocupada por ankirina (existe 1 millón de copias/célula de banda 3 y 100.000 copias de ankirina/célula) a pesar de que se sintetiza en exceso 138.

Existen otras proteínas integrales en la membrana eritrocitaria, como la acetilcolinesterasa, el transportador de glucosa, la ATPasa sodio-potasio, diversos receptores de hormonas, proteínas plasmáticas y drogas, y proteínas con determinantes antigénicos de grupos sanguíneos como Rh, Duffy y Kell. Estas proteínas aún no han sido bien caracterizadas en su totalidad y es posible que algunas tengan funciones de transporte o de fijación del esqueleto de la membrana subyacente 112,129.

Unida a la bicapa lipídica por algunas de las proteínas integrales, existe una red filamentosa de proteínas periféricas configurando el esqueleto de la membrana (figura 1), cuyos componentes primordiales son la espectrina, actina y proteína 4.1, que describiremos a continuación.

La espectrina (figura 4) es el componente más importante y abundante del esqueleto de la membrana, con 200.000 copias/célula, y está formada por dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$  (240.000 y 220.000 daltons respectivamente) estructuralmente relacionadas pero funcionalmente distintas. Ambas cadenas

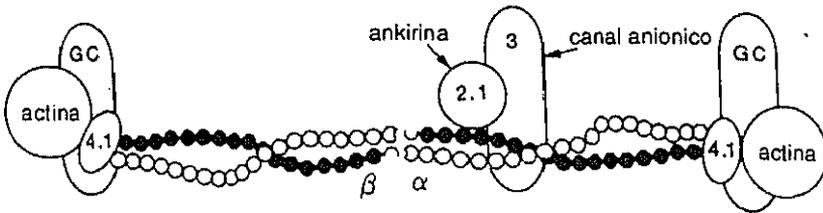


Figura 4.- Organización tetramérica de la espectrina y sus asociaciones (modificado de Palek <sup>138</sup>). Cada tetrámero de espectrina, formado por heterodímeros de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , se une a la membrana celular por asociación de las cadenas  $\beta$  espectrina con la ankirina (banda 2.1), unida a su vez directamente con el dominio citoplásmico del canal aniónico (banda 3) y por conexión de la proteína 4.1 con la glicoforina C (GC). Se ha demostrado que la proteína 4.2 estabiliza la unión entre la ankirina y el dominio citoplásmico de la banda 3.

se disponen entrelazándose alineadas de forma antiparalela para constituir los heterodímeros  $\alpha\beta$ , formaciones largas (97 nm), finas y vermiformes <sup>41,112,129,136,138,149,159</sup>, en donde se han identificado tres principales regiones funcionales: la cabeza o zona de contacto de heterodímeros, que se asocian merced a ella para formar tetrámeros, la región de unión con la ankirina, sita en la cadena  $\beta$ , y la cola o lugar de contacto con la actina y la proteína 4.1. <sup>136,138,165</sup>. La espectrina es una proteína muy flexible capaz de asumir diversas conformaciones, característica crítica para las propiedades mecánicas de la membrana normal <sup>112</sup>. Los genes que codifican sus cadenas se encuentran ubicados en el cromosoma 1 (q22-q25) <sup>79</sup> para la cadena  $\alpha$  y en el cromosoma 14 (q23-q24.2) en el caso de la cadena  $\beta$  <sup>59,143</sup>. Dichas cadenas están compuestas por una sucesión de subunidades repetitivas alineadas linealmente, de 106 aminoácidos. 12.000 daltons y 5 nm de longitud cada una, constituidas a su vez por tres segmentos antiparalelos y  $\alpha$  helicoidales <sup>165</sup>. Tales subunidades repetitivas están unidas entre sí por pequeñas regiones no helicoidales que confieren a la proteína su típica flexibilidad <sup>112</sup>. Asimismo, cuando la espectrina se somete a digestión trípica y subsiguiente análisis bidimensional con isoelectroenfoque y SDS-PAGE, se identifican una serie de domi-

nios, cinco en la cadena  $\alpha$  y cuatro en la cadena  $\beta$ , implicados en las regiones funcionales previamente descritas 41,112,136,138,149,159,164 (figura 5). Los heterodímeros de espectrina se asocian por medio de su cabeza para formar tetrámeros ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> de 194 nm de longitud que son las estructuras predominantes en el esqueleto de la membrana, aunque también pueden formarse oligómeros mayores 112,129. Las colas de los tetrámeros de espectrina se unen con oligómeros cortos de actina (figura 4).

La actina eritrocitaria, de 45.000 daltons y con unas 500.000 copias/célula, está configurada en oligómeros filamentosos cortos muy uniformes, de aproximadamente 35 nm de longitud, formados por unas 12 moléculas de actina organizadas en dos hileras paralelas y  $\alpha$  helicoidales que contienen cada una 6 unidades de actina globular 15,112,138, estructuras moduladas y estabilizadas por la tropomiosina eritrocitaria. Esta proteína, que migra en la SDS-PAGE en la región de la banda 7, es un dímero de dos subunidades de 27.000 y 29.000 daltons de la que existen alrededor de 80.000 copias/célula, cumpliéndose la estequiometría de 6 moléculas de actina por cada una de tropomiosina 15,112,138. Los datos disponibles permiten sugerir que cada oligómero de actina filamentososa se asocia con dos moléculas de tropomiosina, cada una de ellas en sendo eje de las dos  $\alpha$  hélices de monómeros de actina globular que configuran el oligómero de actina 15,112,138. Existen otras proteínas asociadas a la actina, como la dematina o proteína 4.9, la miosina y otras proteínas del sistema contráctil actomiosina 112,138. La dematina o proteína 4.9, de 48.000 daltons, es un trímero en su forma nativa que in vitro se une a la actina y polimeriza sus filamentos, pero su función en la membrana eritrocitaria se desconoce 112,138.

Como promedio, tres colas de espectrina se asocian con cada oligómero de actina para configurar una red irregular de disposición aproximadamente hexagonal 129. Cada unión entre espectrina y actina está estabilizada por la proteína 4.1. en ausencia de la que tales uniones son débiles e ineficaces 112,129,149 (figuras 4 y 6).

La proteína 4.1 es una estructura globular de 5,7 nm que coexiste en dos formas, 4.1a de 622 aminoácidos y 80.000 daltons y 4.1b de 78.000 daltons. La proteína 4.1b predomina en los reticulocitos y se transforma en proteína 4.1a según el hematíe envejece 70,112,138. Ambas formas son

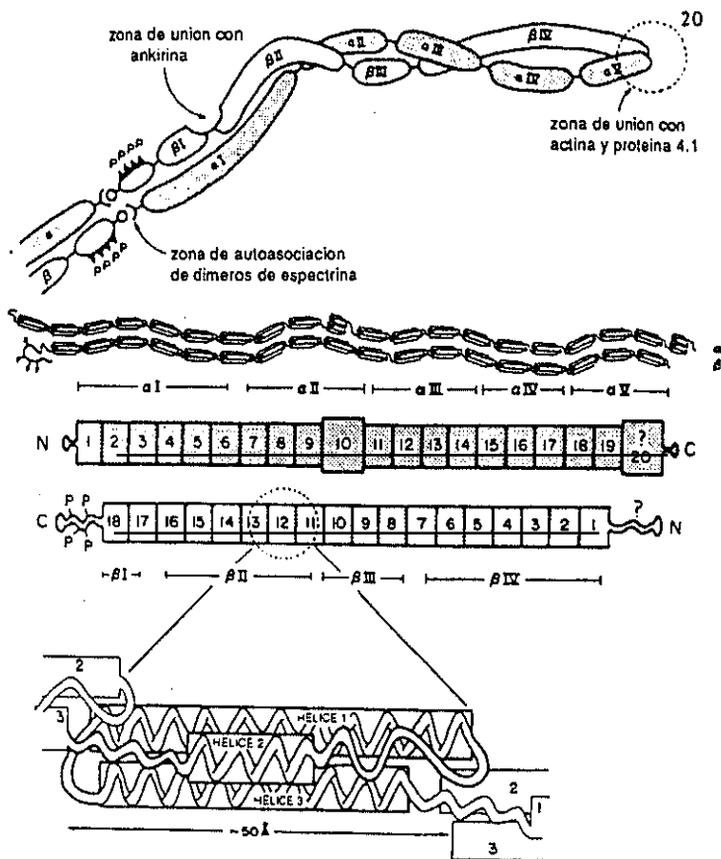


Figura 5.- Anatomía molecular de la espectrina (modificado de Lux, 1987<sup>112</sup>, y de Shohet, 1990<sup>155</sup>). La espectrina está constituida por unidades repetitivas homólogos (excepto la décima y probablemente la vigésima de la cadena  $\alpha$ ) alineadas, cada una de 106 aminoácidos en forma de tres segmentos antiparalelos y  $\alpha$  helicoidales. El carboxilo terminal de la cadena  $\beta$  está muy fosforilado. Se definen cinco dominios resistentes a la tripsina en la cadena  $\alpha$  y cuatro en la cadena  $\beta$ .

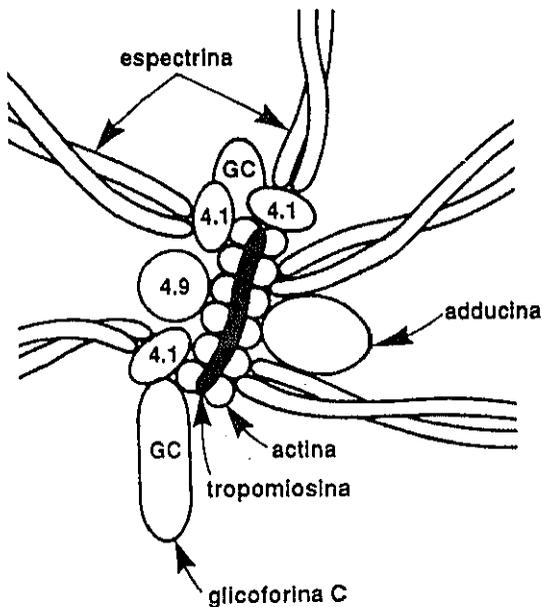


Figura 6.- Complejos de unión del esqueleto de la membrana eritrocitaria (modificado de Palek, 1990<sup>138</sup>). A ellos se unen los tetrámeros de espectrina. Están formados por oligómeros cortos de actina filamentosos estabilizados por tropomiosina, proteína 4.1, que promueve la unión de la espectrina a la actina y se une a la glicoforina C (GC) canal aniónico y lípidos de la bicapa interna, adducina, que facilita la conexión entre espectrina y actina, dematina (banda 4.9) que se une a la actina, y posiblemente otras proteínas relacionadas con el sistema contráctil actomiosina.

virtualmente idénticas tanto estructural como funcionalmente (el sistema de SDS-PAGE de Laemmli<sup>95</sup> es capaz de separarlas, a diferencia del método de Fairbanks<sup>50</sup> que identifica una sola banda 4.1) y se considera la proteína 4.1 como una única entidad<sup>112</sup>, con 200.000 copias/célula, codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (p32-pter) junto al locus Rh<sup>33,41,138</sup>. Se trata de una proteína muy asimétrica (figura 7) que exhibe cuatro dominios cuando sufre proteólisis limitada

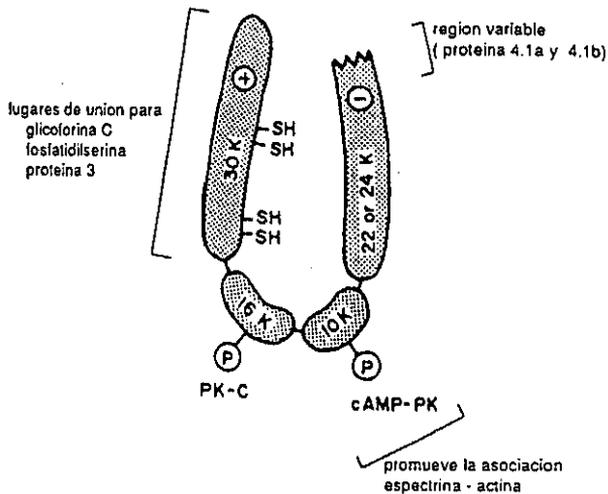


Figura 7.- Estructura de la proteína 4.1 (modificado de Lux, 1987<sup>112</sup>). El dominio aminoterminal de la molécula es básico y contiene cuatro tioles reactivos y los lugares de unión para el ATP, fosfatidilserina, banda 3 y glicoforina C. El dominio carboxilotermino es ácido y la heterogeneidad en esta zona es la responsable de las isoformas 4.1a y 4.1b. Situados entre ambos se encuentran sendos dominios fosforilados por la proteínkinesa C (PK-C) y por una kinasa AMPc dependiente (cAMP-PK), dominio éste promotor de la asociación espectrina-actina. La proteína 4.1 nativa probablemente sea globular; la organización propuesta en este esquema es especulativa.

con quimotripsina<sup>34</sup>. El dominio amino terminal, de 30.000 daltons y carga positiva, contiene la zona de unión de la proteína 4.1 con las glicoforinas A y C, la banda 3, los fosfatidilinosítoles y los lípidos de carga negativa de la monocapa interna de la membrana<sup>112,138</sup>. El dominio de unión con espectrina y actina, de 8.000-10.000 daltons, está en la vecindad del dominio carboxiloterminoal<sup>41,138</sup>. Esta proteína es susceptible de fosforilación en varios puntos, y cuando tiene lugar por la proteína quinasa C (PK-C) y la quinasa AMP<sub>c</sub> dependiente (cAMP-PK), se debilita la unión de la proteína 4.1 con la espectrina<sup>102,138</sup>. La unión de la proteína 4.1 con la glicoforina A sólo es posible si ésta forma complejo con fosfatidil inosítoles fosforilados<sup>108,138</sup>. La proteína 4.1 tiene al menos dos funciones esenciales (figuras 4 y 6), la primera es la estabilización de la unión entre espectrina y actina<sup>15</sup> y la segunda consiste en fijar los extremos distales de los tetrámeros de espectrina a la membrana en virtud de su unión con la glicoforina C, el canal aniónico y los lípidos negativamente cargados de la monocapa interna de la membrana<sup>112,138</sup>. La estabilización de la unión entre espectrina y actina está mediada por interacción directa de la proteína 4.1 con la espectrina pero sin unirse directamente con la actina<sup>15,138</sup>.

La adducina es otra proteína del esqueleto asociada a espectrina y actina. Se compone de dos subunidades de 105.000 y 100.000 daltons formando un heterodímero que cuenta con 30.000 copias/célula. Se une tanto a espectrina como a actina promoviendo la asociación entre ambas, según la estequiometría de dos moles de espectrina por cada mol de adducina<sup>123</sup> (figura 6). La unión de esta proteína al esqueleto queda inhibida por la proteína 4.1, cabe la posibilidad de que las dos proteínas compitan por un mismo lugar de la molécula de espectrina. La adducina está muy fosforilada y es la principal proteína de unión de la calmodulina en el esqueleto de la membrana eritrocitaria<sup>15,123,138</sup>. La unión de la calmodulina a la adducina inhibe su efecto estimulador de la interacción entre espectrina y actina<sup>15,123,138</sup>, con lo cual las concentraciones intracelulares de calcio poseen un rol primordial en la regulación de estas asociaciones<sup>129</sup>.

La ankirina o banda 2.1 (que comigra con la banda 2 en el sistema de SDS-PAGE de Laemmli<sup>95</sup>) es una proteína primordial en la fijación del esqueleto a la membrana eritrocitaria. Es grande y de forma piramidal,

con 1.879 aminoácidos, 210.000 daltons,  $8,3 \times 10$  nm de calibre y 100.000 copias/célula, es decir, una molécula de ankirina por cada tetrámero de espectrina. La ankirina es producto de un gen sito en el cromosoma 8 (p11.2) 27,96;116. Es una proteína globular, asimétrica y polar constituida por dos dominios funcionales separables mediante proteólisis suave 178; un dominio aminoterminal positivamente cargado de 90.000 daltons, responsable de la unión de la ankirina con el dominio citoplásmico de la banda 3, y un dominio de unión a la espectrina, neutro, de 72.000 daltons y muy fosforilado, con alta afinidad por la cadena  $\beta$  de la espectrina, fijándola a la membrana. La estructura primaria de la ankirina propone próximo al carboxilo terminal un tercer dominio regulador 74,138, cuya alteración determina la producción de polipéptidos menores tipo ankirina (sindefnas, como nombre genérico), que aparecen en la SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria como bandas adicionales 2.2, 2.3 y 2.6 74,112,138. La ankirina se une a la cadena  $\beta$  de la espectrina en una región de ella localizada a 20 nm del carboxilo terminal, involucrando los dominios  $\beta$  I y  $\beta$  II 112, 129, 164 (figura 5).

La proteína 4.2, de 72.000 daltons, está presente en la membrana eritrocitaria en el mismo número de copias que la ankirina, y se une de forma saturable a varias proteínas, como el dominio citoplásmico de la banda 3, ankirina y proteína 4.1 93,138, y se ha demostrado que la proteína 4.2 estabiliza la interacción entre ankirina y banda 3 138,148.

Una vez repasadas las proteínas integrales y periféricas de la membrana eritrocitaria, comentaremos su organización, constituyendo un esqueleto de la membrana fijado a la bicapa lipídica, estructura compuesta que dota a la membrana del hematíe de sus propiedades mecánicas únicas.

### 1.3.3. El esqueleto de la membrana eritrocitaria. Organización y modulación

El esqueleto de la membrana eritrocitaria es una red proteica submembranosa de 3 a 6 nm de grosor medio que tapiza directamente la cara citoplásmica de la bicapa lipídica, fijando un 60% de ella 112,138. Su unidad básica es una malla irregular aproximadamente hexagonal de tetrámeros de espectrina interconectados entre sí por complejos de unión 41, 104,112,129,136,138,149,159 (figura 8). Estos complejos de unión (figura 6) remedan los nudos de la red, dispuestos en los vértices de los hexá-

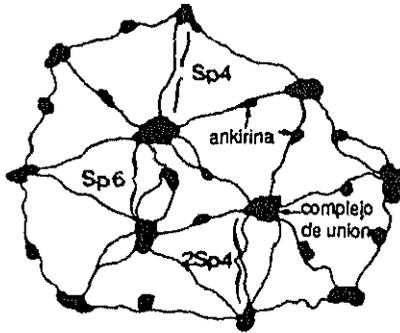


Figura 8.- Esquema de la anatomía ultraestructural del esqueleto de la membrana eritrocitaria (modificado de Iiu, 1987<sup>104</sup>). El esqueleto celular, aislado por extracción con Tritón X-100 de los lípidos y proteínas integrales de la membrana y artificialmente extendido, exhibe una configuración en malla dispuesta hexagonalmente aunque también con formación de pentágonos y heptágonos, en que los lados de los polígonos corresponden a tetrameros de espectrina (Sp4) y ocasionalmente dobles tetrameros (2Sp4) o hexámeros (Sp6) en cuya mitad aproximadamente se halla la ankirina. Los complejos de unión representan los nudos de la red esquelética.

gonos y formados por actina oligomérica, proteína 4.1 y otras proteínas asociadas, como la tropomiosina estabilizando los oligómeros de actina, proteína 4.1 y adducina, reforzando la unión de espectrina y actina, y dermatina y ciertas proteínas del sistema contráctil actomiosina<sup>15,112,129,136,138,149</sup>. Los tetrameros de espectrina (ocasionalmente hexámeros y tetrameros dobles) conforman los lados de los hexágonos, cuyos vértices corresponden a los complejos de unión (figuras 4 y 8), de forma que el tetramero formado por asociación de las cabezas de dos heterodímeros  $\alpha\beta$  de espectrina se une mediante sus dos colas a sendos complejos de unión. Tal organización estructural ha sido confirmada mediante microfotografía electrónica de alta resolución<sup>104</sup> y confiere al esqueleto de

la membrana su carácter bidimensional<sup>112</sup>. Las diferentes uniones y asociaciones entre proteínas dentro del plano del esqueleto de la membrana se han denominado interacciones horizontales<sup>41,136</sup>.

El esqueleto de la membrana eritrocitaria queda fijado a la bicapa lipídica mediante varias asociaciones (interacciones verticales), de las que dos son fundamentales:

- en la proximidad de su centro, y merced a una de sus cadenas  $\beta$ , cada tetrámero de espectrina se une a la ankirina, que a su vez se une directamente con el dominio citoplásmico del canal aniónico,
- por medio de sus extremos distales, los tetrámeros de espectrina se unen a la proteína 4.1, la cual se asocia a las sialoglicoproteínas transmembránicas, principalmente la glicoforina C y bajo ciertas condiciones la glicoforina A<sup>108,138</sup>,

asimismo se han descrito otras interacciones, aunque débiles, protagonizadas por la espectrina y la proteína 4.1 con la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina, fosfolípidos predominantes en la monocapa interna<sup>31,138, 147</sup>.

La biogénesis del esqueleto de la membrana eritrocitaria exhibe tres pasos limitantes en la configuración de una red esquelética estable<sup>99, 138</sup>:

- la síntesis del transportador aniónico, que posee zonas de alta afinidad para la ankirina,
- la disponibilidad de ankirina, con lugares de unión de alta afinidad por la cadena  $\beta$  espectrina, habiéndose comprobado que la cantidad de espectrina unida al esqueleto depende críticamente de la ankirina disponible,
- la síntesis de la cadena  $\beta$  espectrina, que es considerablemente más reducida que la de la cadena  $\alpha$  espectrina.

Esta biogénesis del esqueleto de la membrana, con la síntesis y asociaciones de sus proteínas entre sí y con la membrana tiene lugar en los normoblastos en diferenciación, persistiendo la producción de espectrina, ankirina y proteína 4.1 hasta el estadio de reticulocito<sup>76,138</sup>.

Pero la organización del esqueleto de la membrana no es fija en espacio y tiempo, puesto que durante su circulación el hematife constantemente sufre ciclos de deformación y recuperación de su forma original, cambios dinámicos necesariamente acomodados por el esqueleto de la

membrana, que probablemente se deben a una modulación o regulación dinámica de las interacciones entre proteínas.

Son mecanismos potenciales de regulación de las asociaciones de las proteínas del esqueleto entre sí y con las proteínas integrales de la membrana la fosforilación<sup>112,149</sup>, las variaciones de las concentraciones intracelulares de magnesio y de 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) en los ciclos de oxigenación-desoxigenación, y los efectos de la calmodulina consecutivos a un calcio intracelular elevado<sup>15</sup>. No se dispone de datos de las rutas metabólicas que siguen estos mecanismos moduladores, aunque existen evidencias de que la fosforilación en el caso de la proteína 4.1 determina una disminución de su afinidad por la espectrina y en su capacidad para promover asociaciones entre espectrina y actina (sin embargo, no se conocen efectos directos de la fosforilación de otras proteínas del esqueleto de la membrana). Paralelamente, el aumento de los niveles de 2,3-DPG y las concentraciones elevadas de calcio intracelular, junto con la calmodulina, parecen desestabilizar, respectivamente, las interacciones entre espectrina-actina-proteína 4.1 y entre espectrina-actina-adducina<sup>129</sup>. Por tanto, la membrana del hematíe es una estructura dinámica en la que las interacciones entre proteínas están siendo constantemente moduladas y cuya función esencial es dotar al hematíe de una membrana muy flexible y a la vez muy estable y resistente mecánicamente.

#### 1.3.4. Función del esqueleto de la membrana eritrocitaria

El hematíe ha de estar capacitado para ser muy deformable, pero resistente. Así pues, la deformabilidad de la membrana<sup>26,127</sup> se define como el grado de deformación que se induce en la membrana por una determinada fuerza aplicada, lo que significa que a mayor deformabilidad, menor fuerza es necesario aplicar para que la célula atraviese los capilares. La estabilidad de la membrana es el grado máximo de deformación que la membrana puede sufrir y sobrepasado el mal la célula ya no es capaz de recuperar completamente su forma inicial; la estabilidad de la membrana normal permite al hematíe circular sin fragmentarse; si la estabilidad disminuye supone fragmentación celular, a pesar de una dinámica circulatoria normal<sup>24,129</sup>.

Estas propiedades están reguladas por los componentes de la membrana (figura 9). En estado de reposo, las moléculas de espectrina se encuentran en una conformación plegada. Cuando cambia la forma geométri-

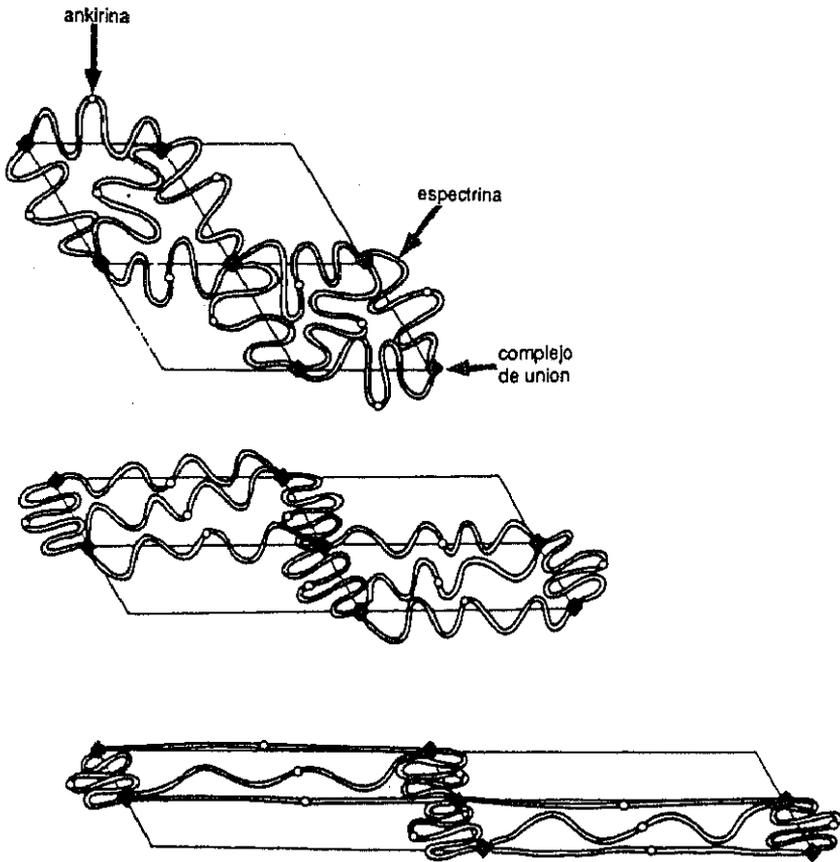


Figura 9.- Esquema de los reordenamientos del esqueleto de la membrana en la deformación reversible de los hematíes (modificado de Mohandas, 1991<sup>129</sup>). La deformación reversible se acompaña de cambio en la forma geométrica del hematí a superficie celular constante. Desde el estado de reposo, con la deformación se produce una extensión paulatina de la membrana. Sobrepasado su límite, requeriría un aumento de superficie que supondría la ruptura de los complejos de unión, con la consiguiente fragmentación celular.

ca del eritrocito, se produce una deformación reversible de su membrana, manteniendo su superficie constante, durante la cual se reorganiza la red esquelética de forma que ciertas moléculas de espectrina se estiran, mientras otras se repliegan y comprimen; si aumenta la deformación, la membrana se extiende más, llegando algunas moléculas de espectrina a alcanzar su extensión lineal máxima. Este punto es el límite de la deformabilidad reversible, y la subsiguiente aplicación de fuerza requeriría un aumento de superficie, con la ruptura de las interacciones de las proteínas del esqueleto entre sí y con la membrana, dando lugar a fragmentación celular; por tanto, la disrupción de dichas interacciones entre proteínas supondrían un deterioro fundamental de la estabilidad mecánica de la membrana eritrocitaria <sup>24,129</sup>. Sin embargo, para que la membrana se deforme normalmente, su esqueleto debe ser susceptible de reordenamiento con despliegue y repliegue de las moléculas de espectrina. Por ello, el aumento de las asociaciones de las proteínas del esqueleto entre sí y con la membrana reduciría esencialmente la deformabilidad de la membrana <sup>6,24,26,45,124,127,129</sup>.

La deformabilidad celular es la capacidad de deformación del hematíe mientras fluye. Esta propiedad depende de tres factores distintos <sup>6,24,26,45,124,129</sup>:

- la forma o geometría celular, que define su relación superficie/volumen,
- la viscosidad citoplásmica, definida por la concentración intracelular de hemoglobina,
- la deformabilidad de la membrana, que directa o indirectamente depende del esqueleto de la membrana.

Resulta fundamental para el eritrocito el mantenimiento de una relación superficie/volumen idónea para desempeñar óptimamente su función en el torrente circulatorio. La pérdida de membrana conlleva una reducción de la superficie celular, que determina una geometría celular esférica sin exceso de superficie, carencia que disminuye la deformabilidad celular y compromete tanto la función como la supervivencia del hematíe <sup>24,129</sup>. El esqueleto de la membrana, asociado a las proteínas integrales de la misma, son determinantes claves de la compleja conducta mecánica de la membrana eritrocitaria <sup>24,124,127,129</sup>.

### 1.3.5. Defectos moleculares en la EH

La base molecular de la EH es heterogénea y sus defectos primarios afectan a las proteínas de la membrana eritrocitaria <sup>12,136,138,139</sup> (tabla I). Sin embargo, el déficit parcial de espectrina es el elemento unificador de la mayor parte de los casos de EH <sup>3,4,6,12,136,138,139</sup> y los datos disponibles sugieren que puede ser resultado de defectos moleculares diversos <sup>136</sup>.

En las EH autosómico dominantes, forma clásica de la entidad, las anomalías primarias halladas son:

- el déficit leve a moderado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup> Ank<sup>+</sup>), que probablemente es el defecto primario más prevalente en este grupo de pacientes <sup>3,4,36,82,139</sup>, habiéndose constatado una relación directa entre la reducción del contenido de la membrana eritrocitaria en espectrina (con 63 a 81% del contenido normal), la gravedad del curso clínico de la enfermedad y la fragilidad osmótica de los hematíes, reflejando la reducción de la superficie respecto del volumen celular <sup>3,4</sup>, así como una reducción acompañante del contenido de la membrana en ankirina <sup>2,3,4</sup>, inicialmente considerado consecuencia y no causa del déficit de espectrina <sup>4</sup> y atribuido a degradación de la ankirina no fijada <sup>3</sup>. Posteriormente se ha demostrado la herencia de EH dominante ligada a un determinado polimorfismo del gen de la ankirina <sup>36</sup> en una gran familia cuyos 19 miembros afectos exhibían 82 a 90% del contenido normal en espectrina y ligeras reducciones del contenido en ankirina; existen casos similares con mayores disminuciones del mismo <sup>82</sup>. Además se han comunicado casos de EH asociados a deleciones intersticiales del cromosoma 8 (8p-) o translocaciones recíprocas heterocigotas que involucren 8p11.2, donde se encuentra el locus del gen de la ankirina <sup>27,116</sup>. También se ha demostrado que la transmisión de la EH dominante no está ligada a polimorfismos de los genes de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de la espectrina <sup>36,185</sup>.

Así pues, en este grupo de EH el déficit de espectrina es secundario a un defecto primario en el gen de la ankirina aún por caracterizar y que determinaría la alteración de la estructura o función de dicha proteína <sup>36-82,138</sup>.

- la anomalía del dominio  $\beta$  IV de la espectrina con unión defectuosa a la proteína 4.1 (HS  $\beta$  Sp-4.1) <sup>13,69,186</sup>, cuya prevalencia se conside-

ra no superior al 10% de las EH 112,137,139. Característicamente, los enfermos presentan células espiculadas o acantocitos en la extensión de sangre periférica 111,186. El defecto tiene la peculiaridad de ser susceptible de corrección *in vitro* por agentes reductores, sugiriendo que la cadena  $\beta$  de la espectrina es anormalmente sensible al daño oxidativo 13,112,138,139, agudizado por los radicales de oxígeno de los macrófagos en el condicionamiento esplénico 136,180. Por razones no aclaradas, estos pacientes son parcialmente deficientes en espectrina, exhibiendo alrededor del 80% de su contenido normal 12,112,136,137,138 139; probablemente la espectrina defectuosa se desliga fácilmente de la membrana y es degradada por proteasas que selectivamente afectan a la espectrina aislada 112,187.

La forma autosómico dominante de EH se ha estimado que afecta aproximadamente a un 75% de los pacientes 6,12,112. No se han descrito casos homocigotos, que se consideran incompatibles con la vida 112.

Un 25% de las EH carecen de afectación familiar aparente a los medios diagnósticos convencionales 6,12,112. Este grupo de enfermos es heterogéneo e incluye formas dominantes de penetrancia variable (existe evidencia de que gran parte de los progenitores de estos casos presentan un mínimo déficit de espectrina que sugiere su afectación por EH asintomática<sup>4</sup>), nuevas mutaciones y verdaderas formas autosómico recesivas de la entidad, sin posibilidad de distinguir definitivamente entre estas tres opciones en la mayor parte de los casos, y probablemente la última sea de escasa frecuencia. Se han encontrado los siguientes defectos en EH autosómico recesivas:

- el déficit severo de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup> Ank<sup>+</sup>)<sup>29</sup>, observado en pacientes con anemia hemolítica grave de respuesta parcial a la esplenectomía con importante microesferocitosis y poikilocitosis con marcadas alteraciones del contorno de los hematíes en la extensión de sangre periférica y que presentan aproximadamente la mitad de los contenidos normales de la membrana en espectrina y ankirina sin anomalías en su estructura o función<sup>29</sup>. Recientemente se ha constatado reducción del mRNA de la ankirina con reducción de su síntesis en los reticulocitos de un enfermos, siendo sin embargo normal la producción de cadenas  $\alpha$  espectrina e incluso aumentada caso de las

cadenas  $\beta$  77. Por tanto, el defecto primario supone una síntesis de ankirina disminuida con consiguiente menoscabo en su incorporación a la membrana eritrocitaria, conllevando una reducción de la unión de espectrina a la misma 77, cuyo contenido puede ser solamente un 30% de la normalidad 2,3,4,118. En algunos casos la herencia no pudo establecerse inequívocamente, puesto que no fue posible estudiar a los progenitores, si bien los hermanos de los pacientes fueron hematológicamente normales, incluido el estudio de los contenidos de la membrana en espectrina y ankirina 29,

- la alteración del dominio  $\alpha$  II de la espectrina, detectado en algunas familias mediante digestión trípica y análisis bidimensional (combinación de isoelectroenfoque y SDS-PAGE) de la espectrina 118,119. Este defecto se ha denominado  $\alpha$  IIa, se reconoce por la acidificación del punto isoelectrónico de los péptidos integrantes de dicho dominio  $\alpha$  II, y existen en forma homocigota en pacientes con anemia hemolítica y en forma heterocigota y asintomática en sus progenitores y descendencia. Dado que el paso limitante en la generación de los dímeros de espectrina es la síntesis de su cadena  $\beta$  76,99,138, los individuos heterocigotos  $\alpha$  IIa pueden compensar la anomalía con una adecuada producción de cadena  $\alpha$  espectrina merced al alelo normal 41,118.
- el déficit completo o parcial de la proteína 4.2 (HS 4.2+/4.2°) 81,138, 139,148, con la particularidad de que los casos descritos son japoneses, por la acción en la que el defecto quizá sea más prevalente 81. Es improbable que sea una verdadera anomalía primaria de la EH; en algún caso el déficit de proteína 4.2 se ha normalizado con la esplenectomía o con la solución quirúrgica de una ictericia obstructiva en los déficits asociados a ella 138,139. Recordando que esta proteína se une a la ankirina y al dominio citoplásmico del canal aniónico y estabiliza la unión de ambas 93,138,139,148, el déficit de proteína 4.2 puede ser secundario a alteración del dominio citoplásmico de la banda 3 y/o de la ankirina 138; se ha demostrado que la membrana de un paciente incorporaba deficitariamente la proteína 4.2 normal, sugiriendo que el defecto primario residiera en el lugar de unión que para esta proteína posee el dominio citoplásmico del canal aniónico 84,138, de patrón de digestión trípica anormal 84,
- la anomalía de la banda 3, enlazado con el epígrafe anterior, se ha descrito su migración electroforética anormal conformando una banda más estrecha, densa y anódica de lo habitual 131,138, conjuntamente

con su digestión trípica anormal sugestiva de una glicosilación deteriorada y asociada al déficit de proteína 4.1 en dos pacientes<sup>131</sup>. También se han comunicado casos de EH dominante con contenido de espectrina normal y déficit de banda 3<sup>85,115,121,122</sup> (con déficit probablemente asociado a él de la proteína 4.2, que en ciertos casos se ha relacionado con un defecto del dominio citoplásmico de la banda 3<sup>84</sup>). Es posible que los defectos moleculares del canal aniónico sean más comunes de lo sospechado y que casos de EH de estas características hayan sido incorrectamente diagnosticados.

De forma puntual, se han descrito en la EH otras alteraciones como tetramerización defectiva de la espectrina y espectrina no extractable<sup>112,137,139</sup>; posiblemente algunas de estas observaciones sean debidas a aspectos técnicos o correspondan a epifenómenos relacionados con otros factores inherentes a las células de la EH, como deshidratación intracelular, cambio en la edad media de las células o condicionamiento esplénico<sup>112</sup>.

Ante lo expuesto, se deduce que el defecto molecular primario causal del déficit de espectrina, común a la mayor parte de los casos de EH, radica en esta proteína solamente en dos grupos de pacientes: las formas de herencia autosómica recesiva del dominio  $\alpha$  IIa y aquellos enfermos afectados de formas dominantes con anomalía del dominio  $\beta$  IV de la espectrina con unión defectuosa a la proteína 4.1. En el resto de los casos de EH, el déficit de espectrina sería secundario a defectos moleculares primarios de otras proteínas de la membrana eritrocitaria, que anclan el esqueleto a la bicapa lipídica (interacciones verticales).

El déficit de espectrina típico de la EH determina que la membrana del hematíe sea inestable, con eliminación de la bicapa lipídica no fijada al esqueleto en forma de microvesículas<sup>7,83,136,138</sup>, generándose células de superficie reducida (figura 10), cuyo rasgo característico es el aumento de la fragilidad osmótica<sup>129,136</sup>, como comentaremos posteriormente.

#### 1.4. Fisiopatología de la hemólisis en la EH

La lesión celular esencial en la EH determina una pérdida de superficie del hematíe respecto de su volumen<sup>35,182</sup>, reflejo de una pérdida de lípidos de membrana<sup>35</sup>. In vitro se ha inducido un aumento de la liberación de vesículas lipídicas de las membranas de estos pacientes sometiendo los hematíes a incubación en condiciones de deplección intracelular de ATP<sup>35</sup>, a fuerzas de cizallamiento elevadas<sup>25</sup>, o a incubación de los es-

tromas eritrocitarios en medios isotónicos <sup>103</sup>. Las vesículas así liberadas contienen componentes lipídicos, proteínas integrales y pequeñas cantidades de hemoglobina, carecen de proteínas esqueléticas (excepto proteína 4.1) y son invisibles al microscopio óptico <sup>103,111</sup>. Además, los estudios de la superficie de los esferocitos mediante microscopía electrónica han demostrado evaginaciones de la misma <sup>7,83,138</sup>, que llegan a liberarse en forma de microvesículas, en las que se pierden pequeñas partes de la membrana celular (figura 10) <sup>7,136,138</sup>.

El proceso determinante de la pérdida de lípidos de membrana en la EH consiste en un sustento inadecuado del plasmolema por el esqueleto subyacente <sup>103</sup>, cuya base molecular se cimenta en su menor densidad a causa del déficit parcial de espectrina (figura 10) <sup>136,137,138</sup>. De hecho, se ha confirmado la reducción en la densidad de las proteínas esqueléti-

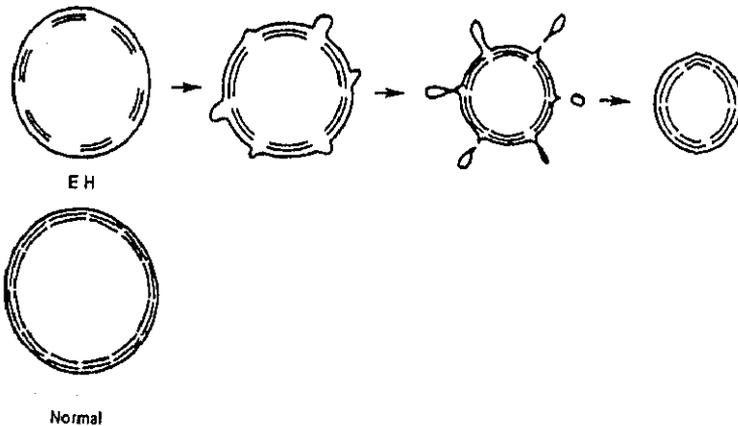


figura 10.- Esquema de la génesis de esferocitos en la EH (adaptado de Agre, 1989 7,8).  
Representa la hipótesis de la pérdida de superficie de membrana en hemáties deficientes parcialmente en espectrina.

cas en estromas eritrocitarios intactos de pacientes afectos de EH con déficits de espectrina moderados y graves<sup>105</sup>. En la mayoría de los pacientes con déficit parcial de espectrina, la integridad ultraestructural de los esqueletos de la membrana es prácticamente normal, aunque con menor cantidad de tetrámeros de espectrina interconectados con complejos de unión, disminución aparentemente proporcional al grado de déficit de espectrina que en las EH graves basta para producir disrupción de la arquitectura del esqueleto<sup>106</sup>. Tales hallazgos concuerdan con la ausencia de fragmentación celular en la microscopía óptica de las extensiones de sangre periférica de casos leves de EH y con la estabilidad mecánica casi normal de las membranas y los esqueletos eritrocitarios de la mayoría de los pacientes (a excepción de las  $\beta$  Sp-4.1 y las formas con déficit graves de espectrina)<sup>126,127</sup>. Además, la pérdida de superficie de la membrana, reflejada en la disminución de la resistencia osmótica, es proporcional al grado de déficit de espectrina<sup>3,4,25</sup> y con la gravedad de la hemólisis<sup>139</sup>.

Por tanto, el déficit parcial de espectrina causa disminución de la densidad del esqueleto, que al no fijar adecuadamente toda la membrana, produce desestabilización de la bicapa lipídica y se liberan pequeñas porciones de lípidos y proteínas integrales no sujetas en forma de microvesículas<sup>121,138</sup>, ocasionando con ello la pérdida de superficie respecto del volumen de los hematíes en la EH (figuras 10 y 11).

Los esferocitos son hematíes deshidratados<sup>137,139</sup>, hecho reflejado en su característico aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media<sup>83,137</sup>. Poseen un bajo contenido en agua y potasio con aumento de la permeabilidad pasiva al sodio<sup>12,83,137</sup>, cuya magnitud no se correlaciona con el grado de hemólisis<sup>182</sup> y que presuntamente es secundaria al defecto del esqueleto de la membrana<sup>87</sup>. La sobrecarga intracelular de sodio resultante se compensa con su extrusión por la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa, con el consiguiente aumento de metabolismo del ATP y estímulo de la glicolisis<sup>83,137</sup>; esta hiperactividad de la bomba produce deshidratación celular, puesto que contribuye a su empobrecimiento en cationes monovalentes<sup>83,137,139</sup>. Contribuye a la deshidratación la activación de otras rutas metabólicas, como la pérdida selectiva de potasio por daño oxidativo<sup>133</sup>, es posible que los esferocitos sufran in vivo tal agresión en su contacto temporal con los macrófagos productores de radicales libres, como sucede en el bazo<sup>83,137,139</sup>.



Figura 11.- Fisiopatología de la EH (modificado de Palek, 1990<sup>137</sup>).

Los esferocitos presentan una deformabilidad reducida<sup>127</sup>, proporcional al déficit parcial de espectrina<sup>25,179</sup> y principalmente motivada por la pérdida de superficie respecto del volumen celular<sup>25</sup> (sin embargo, la deformabilidad de la membrana eritrocitaria en la EH es normal o aumentada<sup>124,179</sup>), uniendo a ello su mayor viscosidad interna por la deshidratación intracelular<sup>28,124</sup>. Como consecuencia, los esferocitos no pueden atravesar las fenestraciones de las células endoteliales de la pared de los sinusoides esplénicos, de donde la sangre pasa a la circulación venosa<sup>83,180</sup>. Así los rígidos esferocitos quedan atrapados y se acumulan en la pulpa roja, dando lugar al característico hallazgo anatómico de congestión de la misma con senos venosos relativamente vacíos<sup>56,86</sup>.

Una vez atrapados en el bazo, los esferocitos sufren el denominado condicionamiento esplénico. Consiste en que la célula es sujeto de agresiones que determinan una mayor pérdida de superficie respecto de su volumen, con el consiguiente aumento de la densidad celular. Esta afectación

se ha constatado en hematíes obtenidos de la pulpa roja durante la esplenectomía, que son más esféricos, con mayor fragilidad osmótica y con menor contenido intracelular en cationes que los obtenidos de la circulación sistémica<sup>137</sup>. A ella vuelven parte de las células condicionadas, detectables in vitro, como la "cola" de la curva de fragilidad osmótica, indicando la existencia de células con marcada reducción de su superficie<sup>38</sup>, que son más frágiles. De hecho, la esplenectomía hace desaparecer esta población celular<sup>38,83,137,139</sup>.

Son factores condicionantes la hipoxia y acidosis de la sangre esplénica, así como la agresión de los hematíes por los radicales de oxígeno de los macrófagos, con el consiguiente daño a las proteínas intracelulares<sup>174</sup> y pérdida de potasio<sup>133</sup>; se ha demostrado in vitro, en condiciones de conservación y almacenamiento de hematíes, que la cuantía de la oxidación de la espectrina es proporcional al grado de vesiculación celular<sup>176</sup>. La deplección de glucosa motivada por éstasis esplénico, con el consiguiente deterioro en la producción de ATP, no parece ser un factor importante, puesto que se ha demostrado que el contenido de ATP es normal en los hematíes obtenidos del bazo en el momento de la esplenectomía de los pacientes<sup>137,139</sup>. Realmente el bazo puede inducir lesiones estructurales adquiridas en la membrana eritrocitaria en la EH<sup>190</sup>, producidas por la retención de los esferocitos dentro de los cordones esplénicos y su exposición a diversos factores adversos, como la acidosis, el stress oxidativo, la fagocitosis por macrófagos, el daño causado por enzimas lisosómicas granulocíticas y un aumento de la susceptibilidad de la espectrina a la autodigestión por proteasas endógenas<sup>120</sup>. De hecho, se ha comprobado por microscopía de fuerza atómica que la superficie de los hematíes en la EH es irregular exhibiendo pseudópodos de 50-80 nm<sup>190</sup>, que presumiblemente sean precursores de las evaginaciones visibles por microscopía electrónica<sup>7,83,138</sup>, que llegan a liberarse como microvesículas<sup>7,136,138</sup>.

El condicionamiento es producto de varios episodios de éstasis esplénico<sup>38,83,137,139</sup>. El flujo sanguíneo esplénico en la EH oscila entre 10-20% del volumen de eyección cardíaca<sup>83</sup> y sólo un 1-10% de la sangre que entra en el bazo queda retenida en sus cordones, mientras que más del 90% se incorpora rápidamente a la circulación venosa<sup>180</sup>. Con cada paso del esferocito a través del compartimento cordal aumenta su esfericidad y se favorece su reentrada en el mismo, y se ha calculado que se

precisan de 10 a 30 pasos por dicho compartimento para la formación del microsferocito a punto de ser destruido<sup>83</sup>.

La mayoría de los esferocitos son destruidos en el bazo, pero no es este órgano el lugar exclusivo de la hemólisis<sup>139</sup>. El final es la fagocitosis de la célula por los macrófagos, que a su vez aumentan el número en el bazo<sup>56,86</sup>. El cambio químico que desencadena la fagocitosis no se conoce; posiblemente esté implicada una anomalía en la orientación de los fosfolípidos de la bicapa lipídica; se ha demostrado que aquellos hematíes que exhiben fosfatidilserina en su superficie son rápidamente reconocidos y fagocitados por los macrófagos *in vitro*<sup>150</sup>. En algunos pacientes con formas clínicas graves de EH se ha demostrado dicha alteración de la distribución fosfolipídica<sup>109</sup>, que es posible que tenga lugar en los esferocitos ya repetidamente condicionados por el bazo.

Sin embargo, el déficit parcial de espectrina responsable de la desestabilización de la bicapa lipídica no necesariamente es el defecto molecular primario, que puede radicar en la ankirina<sup>30,36,77,82,116</sup> o en otras proteínas como la banda 4.2<sup>81</sup> o la banda 3<sup>84</sup>.

La figura 11 resume y esquematiza los aspectos fisiopatológicos de la EH.

### 1.5. Diagnóstico de la EH

La EH se descubre en cualquier edad de la vida, desde el nacimiento hasta la ancianidad, aunque la mayoría de los pacientes se detectan en la infancia o la juventud. La EH se diagnostica fácilmente, en general, mediante la historia clínica, exploración física y estudios hematológicos rutinarios dirigidos que comentaremos a continuación.

#### 1.5.1. Datos clínicos

Los rasgos clínicos clásicos de la EH son anemia, ictericia y esplenomegalia<sup>12,112,138</sup>, pero en muchos casos no es así y los pacientes no están icterícos ni anémicos. Esto se debe a la gran variabilidad de la enfermedad, cuya historia natural viene determinada por el equilibrio entre la eritropoyesis y la hemólisis<sup>83</sup>.

En los niños, la forma de presentación más frecuente (50% de los casos)<sup>112</sup> es la anemia, seguida de ictericia, esplenomegalia o historia familiar del defecto. Pero la mayoría de los pacientes se hallan asintomáti-

cos, con ocasional desarrollo de crisis anémicas e ictericia intermitente. Cuando existe esplenomegalia suele ser discreta (rara vez es masiva) y no existe correlación entre el tamaño del bazo y la gravedad de la EH <sup>112</sup>.

#### 1.5.2. Morfología eritrocitaria y datos hematológicos

La mayor parte de los casos de EH (aproximadamente un 80%) presentan hemólisis compensada con anemia mínima o ausente, con una cifra de reticulocitos anormal habitualmente superior a 6%. Esta reticulocitosis es un signo de hemólisis mucho más fiable que la hiperbilirrubinemia, que presentan sólo un 50% de pacientes.

La clave morfológica de la EH es el esferocito (figura 12), que en la extensión de sangre periférica aparece como un hematfe redondo sin zona pálida central, con menor diámetro celular medio y aparentemente mayor hemoglobinización que el hematfe normal <sup>12,112,139</sup>, características que traducen la geometría celular defectuosa por su reducida relación superficie/volumen, con el consiguiente aumento de la densidad celular respecto del discocito normal. De hecho, la microscopía electrónica demuestra que relativamente pocas células son verdaderamente esféricas, existiendo un abanico morfológico desde discos gruesos hasta varios estadios de esferoestomatocitos (figura 13) <sup>38,112,139</sup>, lo cual a veces puede intuirse en la extensión de sangre periférica. En las formas leves de la enfermedad, la morfología eritrocitaria puede parecer normal debido a que la pérdida de superficie celular puede ser tan pequeña que resulte inapreciable, dando la impresión de discocitos gruesos más que de esferocitos <sup>139</sup>. Además, en un 20-25% de los casos, los típicos microesferocitos resultantes del condicionamiento esplénico son relativamente escasos y la morfología eritrocitaria puede ser considerada normal incluso por observadores experimentados <sup>112</sup>.

Se han descrito otras anomalías morfológicas asociadas en EH atípicas con hemólisis grave, como la irregularidad en general del contorno celular, presencia de células con formas de champiñón ("pincered cells") y células espiculadas, éstas también descritas en las formas de EH autosómico dominante, designadas HS  $\beta$  Sp-4.1 <sup>12,38,112,137,139,186</sup>.

Esta morfología eritrocitaria coexiste con los clásicos signos de hemólisis, como la policromasia y ocasionalmente presencia de eritroblastos en sangre periférica, reticulocitosis e hiperplasia roja en la médula ósea.

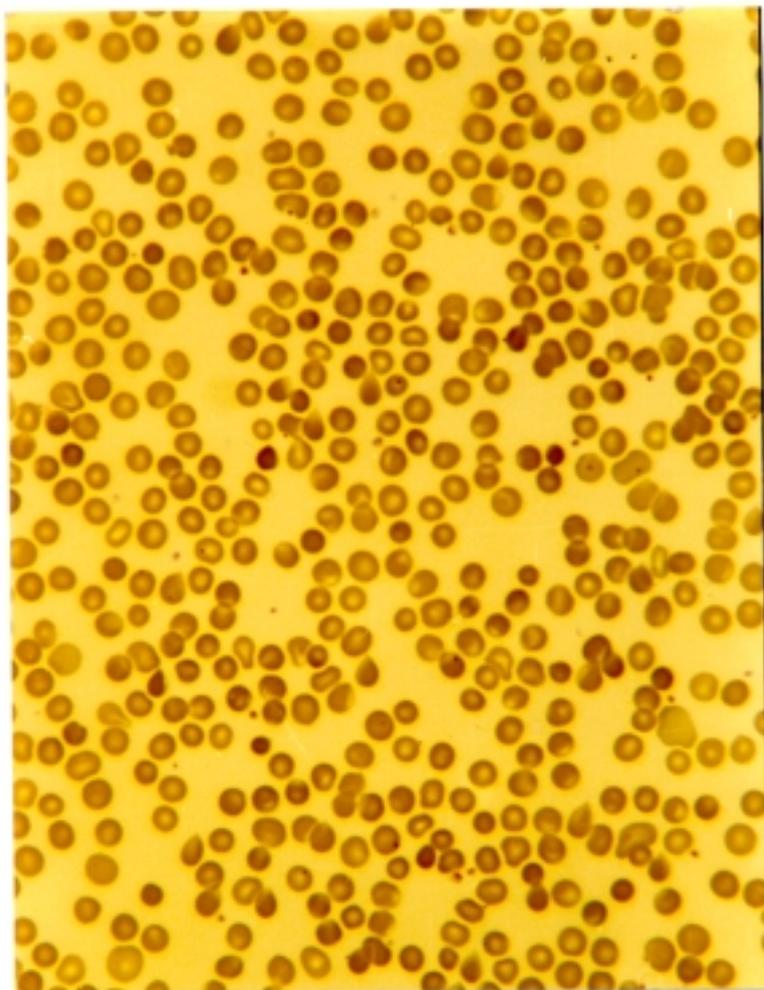
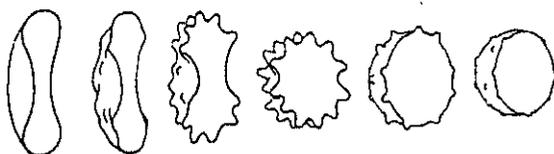


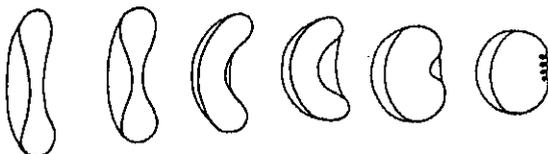
Figura 32.- Morfología eritrocitaria en la EM. La mayoría de las células son esferocitos, sin zona clara central y con diámetro celular medio menor, tridimensionalmente son esferopentamocitos que en ocasiones se aprecian como tales. A mayor gravedad clínica de la EM aparecen "pincerad cells" en forma de champiñón y otras irregularidades del contorno celular. En las PS  $\beta$  Sp-4.1 se han descrito hematies espiculadas o esferocinocitos.

junto con hiperbilirrubinemia no conjugada y elevación de la lactato deshidrogenasa (LDH), descenso de la haptoglobina y presencia de urobilinógeno en la orina 137-139. Estos datos pueden ser normales o sólo sutilmente anormales en los casos de EH leve o asintomática 137-139.

Hemocitométricamente se aprecia un volumen corpuscular medio (VCM) dentro de límites normales, pero que realmente es relativamente bajo si se tiene en cuenta el aumento de reticulocitos, cuyo volumen celular es superior al de los hematíes maduros 38,112,137. La hemoglobina corpuscular media es asimismo normal 38,112,137. Característicamente, existe un aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) por encima de 36 g/dL en la mitad de los casos aproximadamente 38,122, 137, como reflejo de una discreta deshidratación celular producida por unos contenidos intracelulares de agua y potasio descendidos y de sodio



Transformación discocito - esferocitocito



Transformación discocito - esferostomatocito

Figura 13.- Transformación de discocito a esferostomatocito y esferocitocito (modificado de Bull, 1990 22). En la EH se puede apreciar un abanico de formas celulares desde discocitos normales a estomatocitos, esferostomatocitos y densos microsferocitos. En las HS  $\beta$  Sp-4.1 se han descrito esferocitocitos.

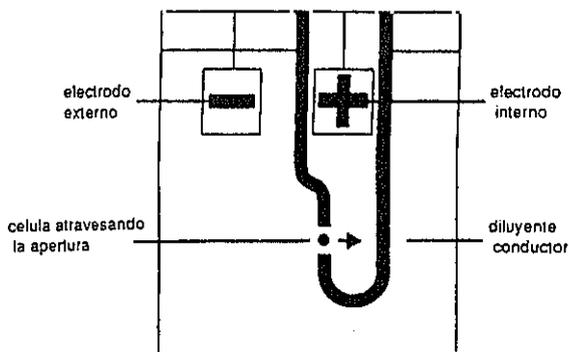


Figura 14.- Esquema de la citometría de apertura-impedancia. Según la célula atraviesa la apertura aumenta la resistencia entre los electrodos, generándose un pulso que se cuenta y mide.

normal o elevado <sup>12,112,137</sup>. Sin embargo, las EH leves y moderadas pueden no ser detectadas si el estudio hematológico se limita a la utilización de un citómetro convencional <sup>64,83,140</sup>, como los basados en el sistema de apertura-impedancia (figura 14), debido a que no ofrecen medidas exactas del volumen celular de los esferocitos por interferencia de su concentración de hemoglobina entre otros factores, y por consiguiente tampoco estiman adecuadamente la CHCM, que se computa a partir del VCM medido <sup>125,128,171</sup>. Estos citómetros convencionales son incapaces de estimar correctamente una CHCM superior a 35 g/dL <sup>125</sup> por su medida inexacta del volumen de las células deshidratadas <sup>128</sup>.

Por ello, resulta necesario recurrir a otros métodos, como la citometría por difracción de luz láser (figura 15), más adecuada para la evaluación de la EH <sup>64,140</sup> por su capacidad de medida directa, simultánea, exacta y libre de interferencias del volumen y concentración de hemoglobi-

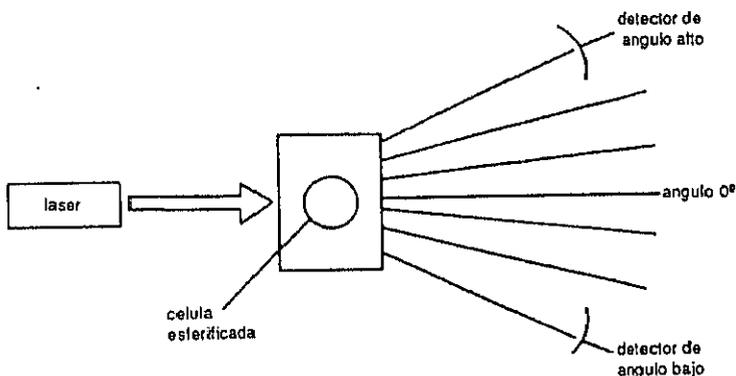


Figura 15.- Esquema de la citometría por difracción de luz láser (Sistemas H de Technicon <sup>TM</sup>). A lo largo de su flujo, la célula es iluminada por una fuente de luz láser. Se mide la difracción de la luz que produce cada célula en sendos ángulos alto y bajo.

na (HC) en hematíes esferificados isovolumétricamente y fijados con glutaraldehído <sup>173</sup>. Se ha demostrado que esta tecnología estima con exactitud valores de VCM comprendidos entre 30 y 120 fL y de CHCM entre 27 y 45 g/dL <sup>125,128</sup>. El método, además, cuantifica los hematíes con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL, computándolos en el parámetro denominado % Híper, que se ha demostrado orientativo de la presencia de esferocitos (junto con los parámetros concentración de hemoglobina corpuscular media medida directamente, HC, y desviación standard de la distribución según concentración de hemoglobina, HDW) <sup>64</sup>.

El estudio de la médula ósea en la EH, como hemos señalado anteriormente, revela hiperplasia roja, en la que los eritroblastos son morfológica y reológicamente normales, ya que el defecto celular de la entidad

se expresa solamente en los hematíes circulantes, en cuya patogenia, por tanto, no contribuye la eritropoyesis ineficaz<sup>112</sup>. Esta exploración de médula ósea es rara vez necesaria.

### 1.5.3. Resistencia globular osmótica. Otros tests diagnósticos

El test de Resistencia Globular y Osmótica (RGO), particularmente su versión incubada, ha sido probablemente la prueba más útil para el diagnóstico de la EH. Mide la lisis *in vitro* de los hematíes suspendidos en soluciones salinas progresivamente más hipotónicas. Está basado en que la membrana eritrocitaria normal es inextensible y permeable al agua, comportándose las células como verdaderos osmómetros<sup>142</sup>, de tal forma que se produce un paso rápido de agua a través de la membrana hasta el equilibrio del medio intracelular con la solución hipotónica en que el hematíe se encuentra suspendido, con el correspondiente aumento de volumen celular hasta su esfericidad. Alcanzado este volumen hemolítico crítico (mínima relación superficie/volumen), el eritrocito estalla al ser su membrana inextensible, liberándose la hemoglobina a la solución circundante. Por tanto, el determinante crítico de la fragilidad osmótica es la relación superficie/volumen de los hematíes<sup>6,12,16,112,139</sup>.

En el caso de la EH, los esferocitos presentan un defecto de superficie de membrana respecto del volumen celular, con la consiguiente deformidad esférica. Por ello su volumen hemolítico crítico está notablemente reducido y se hemolizan más que los hematíes normales en soluciones salinas hipotónicas<sup>12,112,139</sup>, y este aumento de la fragilidad osmótica es proporcional al déficit de espectrina<sup>4,136</sup> y generalmente traduce la gravedad clínica de la EH<sup>4,6</sup>. La discreta deshidratación de los esferocitos no influye en su fragilidad osmótica, a diferencia de otras patologías, debido a que en la EH predomina de forma absoluta el defecto de superficie respecto del volumen celular, y de hecho los esferocitos más densos y deshidratados son osmóticamente más frágiles<sup>14,137</sup>.

La curva de fragilidad osmótica en la EH (figura 16) muestra con frecuencia un aumento global de la misma (curva tipo normal), aunque en pacientes no esplenectomizados puede apreciarse una "cola" reflejo de la existencia de una población de hematíes particularmente frágiles por el condicionamiento esplénico (curva caudada), que desaparece con la esplenectomía<sup>38,83,137,139</sup>. Aquellos enfermos con formas clínicas moderadas y graves de la entidad exhiben una curva diagonal en la que tales poblaciones celulares

se solapan <sup>38,39,137,139</sup>. En los casos de EH leves y asintomáticos es donde se plantea la mayor dificultad diagnóstica dado que la RGO inmediata o no incubada es normal con cierta frecuencia; en tales casos el defecto resulta casi siempre evidente en la RGO postincubación <sup>38,112, 137,139</sup>. Este tratamiento de los hematíes previo al estudio de su fragilidad osmótica reproduce la eritrostasis, incubando las células en condiciones estériles y de privación de glucosa, lo cual acentúa su pérdida de superficie de membrana y eventualmente acrecienta su fragilidad osmótica <sup>12,16,39,139</sup>; sin embargo, aunque la incubación aumenta la sensibilidad de la técnica, in-

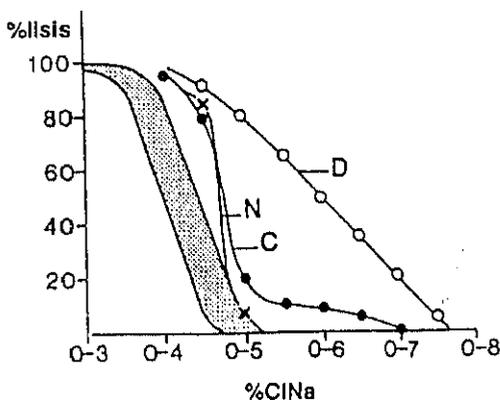


Figura 16.- Fragilidad osmótica de los hematíes en la EH (modificado de Palek, 1990<sup>137</sup>).

Perfiles de las curvas normal (N) indicativo de un aumento global de la fragilidad osmótica, caudada (C) o con una "ecia" de hematíes muy frágiles, y diagonal (D).

roduce un elemento de imprecisión que hace sus resultados menos uniformes, con pérdida de su especificidad<sup>38,66,137,139,163</sup>.

Se han utilizado otros tests diversos para el diagnóstico de la EH, que en general carecen de ventajas respecto de una RGO cuidadosamente realizada y que discutiremos brevemente a continuación:

- la autohemólisis, que estudia la hemólisis espontánea de los hematíes incubados en su propio plasma en condiciones estériles y estáticas<sup>38, 83</sup>, reproduciendo las condiciones de la eritrostasis<sup>83</sup>; con ello el hematíe pierde superficie de membrana, aunque el mecanismo de la hemólisis es más complejo<sup>17</sup>. En ausencia de glucosa añadida, la autohemólisis a las 48 h está aumentada en la EH, efecto que se previene con la adición de glucosa<sup>38,39</sup>. Esta técnica se consideró sensible en la detección de la EH<sup>38</sup>, pero las formas moderada y graves de la enfermedad con considerable reticulocitosis y abundantes esferocitos condicionados por el bazo no corrigen su mayor autohemólisis con la adición de glucosa<sup>83,112,167</sup>; también las EH muy leves y asintomáticas pueden no tener la autohemólisis aumentada<sup>38</sup>. Además, los resultados muestran cierta variabilidad entre los laboratorios e incluso al estudiar un mismo paciente, y hay aparente gran cantidad de falsos positivos entre la población normal, no siendo un test específico<sup>83,112</sup>. Esta prueba ha sido progresivamente menos utilizada y es menos sensible que la RGO postincubación<sup>137</sup>,
- los tests de lisis en glicerol, que miden el tiempo en producirse un 50% de hemólisis de una muestra de sangre fresca o incubada en un tampón glicerol-salino hipotónico<sup>39</sup>, y se basan en que el glicerol entorpece la entrada de agua a los hematíes suspendidos en dicha solución, de forma que se puede medir el tiempo hasta su lisis tras alcanzar un volumen hemolítico crítico<sup>39</sup>. En su versión standard, esta prueba carece de la suficiente sensibilidad y especificidad para ser útil en el diagnóstico de la EH<sup>54,112,137,139</sup>. La versión acidificada de este test tiene una sensibilidad relativa y cuestionable por depender de muchos factores<sup>21</sup>, a los que debe una baja reproductibilidad entre los laboratorios<sup>54,163</sup> y no es específica<sup>21,112,137,139,146,163</sup>.

El "pink test" es una adaptación de lo anterior, basada en la determinación de la hemólisis final en una solución con glicerol y acidificada que goza de una reproductibilidad y sensibilidad elevadas<sup>54</sup>,

175. Se ha demostrado que la RGO postincubación es superior al "pink test" en sensibilidad y especificidad diagnóstica de la EH<sup>21</sup>, o al menos equivalente<sup>54,89</sup>. Existen además modificaciones del "pink test"<sup>54,88,89</sup> que requieren mínimas cantidades de sangre capilar (10-20  $\mu$ L) sin necesitar venopunción, que se han recomendado para el estudio de neonatos y niños<sup>89</sup> y como método de screening de la población por su ejecución fácil<sup>54</sup>.

- el estudio de la estabilidad mecánica de los hematíes mediante ektaciometría<sup>25,28</sup>, método capaz de medir la relación superficie/volumen celular y el área de membrana, además de su índice de deformabilidad y estabilidad mecánica, habiendo sido propuesto como una alternativa sensible para el estudio de la pérdida de superficie celular en la EH<sup>25</sup>. Se ha demostrado que en esta enfermedad existe una reducción de la estabilidad mecánica de la membrana eritrocitaria directamente proporcional a la reducción de su superficie celular in vivo y su contenido en espectrina<sup>25,179</sup>.

El conjunto de los tests diagnósticos referidos está basado en la disminución de la relación superficie/volumen consiguiente a la esfericidad celular, cambio común a lo heterogéneo del defecto molecular subyacente en la EH. Por tanto dichos tests son indicadores útiles de tal esfericidad de los hematíes y la anomalía de los resultados no es diagnóstica de una entidad específica; pueden indicar la existencia de esferocitos, pero no la causa de la esferocitosis (que puede existir en otros estados hemolíticos) y en ocasiones es imposible establecer un diagnóstico definitivo de aquellos pacientes con resultados límite.

Con estas consideraciones se ha descrito recientemente la crichemólisis hipertónica<sup>169</sup>, una sencilla prueba diagnóstica basada en que los hematíes de la EH exhiben un patrón hemolítico específico y sin igual ante los cambios de temperatura cuando están suspendidos en soluciones hipertónicas<sup>168</sup>, comportamiento que es independiente de la relación superficie/volumen celular<sup>169</sup>, con una sensibilidad diagnóstica del 100% incluso de las EH leves y asintomáticas, y también muy alta especificidad. El mecanismo de la crichemólisis hipertónica no está aclarado, pero se ha sugerido que sea reflejo de modificaciones secundarias del esqueleto de la membrana eritrocitaria a causa de los defectos primarios determinantes de la EH<sup>168</sup>.

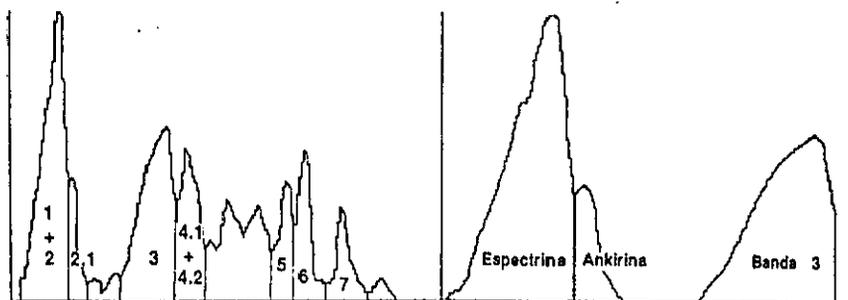
Es probable que en un futuro más o menos próximo estos tests diagnósticos sean sustituidos por la identificación directa del defecto molecular etiológico de la EH.

#### 1.5.4. Estudio del defecto molecular de la EH

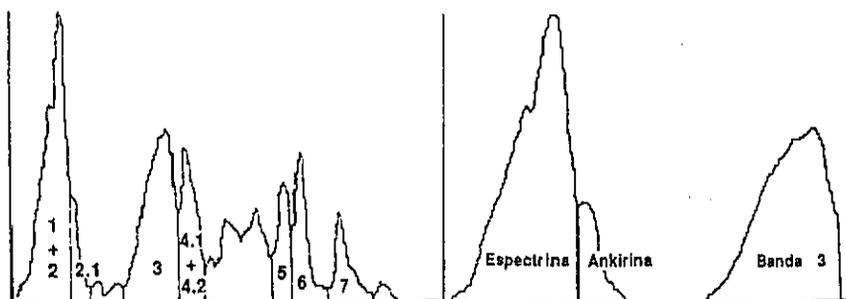
El déficit parcial de espectrina y otros defectos cuantitativos de las proteínas del esqueleto pueden estimarse mediante SDS-PAGE de las membranas eritrocitarias aisladas y densitometría de los geles teñidos (el sistema de Laemmli permite la separación de la banda 4.1 en sus isoformas 4.1a y 4.1b a costa de perder la resolución de las bandas 2 y 2.1, correspondientes, respectivamente, a cadena  $\beta$  espectrina y ankirina) <sup>50,95, 166</sup>; con este método se calculan los contenidos de la membrana en espectrina, ankirina y otras proteínas respecto de la banda 3 como los cocientes de sus áreas densitométricas versus el área de la banda 3 (figuras 2 y 17) <sup>3,4,30,131</sup>. El procedimiento está matizado por las variaciones del contenido de la membrana en banda 3, de forma que antes de la esplenectomía la cantidad es menor por liberación in vivo de porciones de la membrana con banda 3 como microvesículas, y particularmente durante el condicionamiento esplénico, lo que supone una sobreestima artefactual de los contenidos reales de las proteínas; por otra parte, la esplenectomía reduce tal pérdida de membrana in vivo con la posibilidad de infraestimar dichos contenidos de las proteínas al ser referidos a la banda 3 <sup>3,4,5,139</sup>.

Asimismo se ha realizado cuantificación de espectrina mediante radioinmunoensayo <sup>3,4,5</sup>, método que resulta más sensible para la detección de déficits ligeros <sup>137,139</sup> y que permite medir el número de moléculas de espectrina por hematíe.

La cromatografía de afinidad de extractos de espectrina sobre proteína 4.1 inmovilizada permite explorar el defecto HS  $\beta$ Sp-4.1 <sup>186</sup>. El análisis bidimensional (isoelectroenfoque combinado SDS-PAGE) tras digestión enzimática controlada de las proteínas permite advertir sus anomalías estructurales, y ha resultado útil para la evaluación de los defectos de la espectrina ( $\alpha$ IIa y HS  $\beta$ Sp-4.1 en el caso de la EH) <sup>13,118,119</sup>; también se ha aplicado a las alteraciones de la banda 3 <sup>84,131</sup> con resultados, por el momento, preliminares; sin embargo no ha ofrecido datos positivos en el estudio de la ankirina <sup>138</sup>. La microscopía electrónica <sup>104,106</sup> permite apreciar la reducida densidad del esqueleto de la membrana en la



Normal



Esferocitosis Hereditaria

Figura 17.- Densitometrías de SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria. Control y EH. Los trazacos ubicados a la izquierda comprenden la longitud total de la electroforesis. A la derecha se ha limitado la lectura a la espectrina, ankirina y banda 3, quedando amplificada la anchura de los picos (Densitómetro Helena 24-Process<sup>R</sup>).

EH, observándose en la mayoría de los casos de déficit de espectrina leve a moderado unas redes esqueléticas, sin otras anomalías que una reducción del número de tetrámeros de espectrina, que se unen a cada complejo de unión en correlación con la gravedad del déficit de dicha proteína<sup>104</sup>. El estudio de la longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos (RFPLs) del DNA ha permitido la vinculación de la herencia de la EH con un determinado polimorfismo del gen de la ankirina<sup>36</sup> en formas dominantes, con déficit de espectrina y ankirina; otros autores han evaluado los niveles de mRNA y la síntesis y unión a la membrana de espectrina y ankirina en reticulocitos<sup>77</sup>.

Esta investigación del defecto molecular básico de la EH puede ser tremendamente complicada, ya que los factores determinantes del déficit de espectrina, y su correspondiente expresión clínica, pueden ser al menos tan complejos como en los síndromes talasémicos<sup>138</sup>.

#### 1.6. Tratamiento y pronóstico

La esplenectomía es el único tratamiento de la EH<sup>6,12,112,139,154,163,183</sup> por su efecto "curativo" sobre la anemia y la hiperbilirrubinemia debido a que permite que los esferocitos permanezcan más tiempo en el torrente circulatorio, aunque su supervivencia pueda mantenerse discretamente acortada en un estado hemolítico compensado en general leve, con consiguiente reducción o desaparición de la hiperplasia roja; en aquellos pacientes más gravemente afectados con hemólisis crónica sintomática (síndrome anémico, retraso ponderoestatural) la esplenectomía produce una drástica mejoría clínica con corrección parcial de la hemólisis<sup>4,6,30,38</sup>, reduciendo o incluso suprimiendo en su caso el requerimiento transfusional<sup>163</sup>.

Evidentemente, la esplenectomía no revierte el defecto molecular primario causal de la enfermedad. Hemoperiféricamente, persiste la presencia de esferocitos y aparecen los clásicos cambios postesplenectomía, con leucocitosis, trombocitosis, cuerpos de Howell-Jolly y acantocitosis pronunciada aunque inofensiva, que puede llegar a afectar a un 10-20% de los hematíes de los enfermos asplénicos<sup>83</sup>. Asimismo se mantiene la característica de mayor fragilidad osmótica de los eritrocitos<sup>38,139,154,183</sup>, pero desaparece la cola de la curva correspondiente a las células condicionadas por el bazo<sup>38-139</sup>.

La esplenectomía no está exenta de riesgos, aunque son menores en la EH que en otras enfermedades hematológicas<sup>83,139,181</sup>, con morbilidad postoperatoria inmediata de 0 y 8,9%, versus 4 y 13,5%, respectivamente, en series recientes<sup>181</sup>, y sin olvidar la sepsis postesplenectomía, con una incidencia de 0,2 casos por 100 personas y año (siendo la incidencia de una infección grave, en general, de 7,2 casos por 100 enfermos y año)<sup>151</sup> y 2,2% de mortalidad, susceptibles de reducción con la profilaxis adecuada (vacuna antineumocócica polivalente y administración de penicilina<sup>117,163</sup>, riesgo que perdura muchos años después de la cirugía<sup>49</sup>. Por todo ello, no se justifica la esplenectomía indiscriminada, e incluso la tendencia actual se dirige a evitarla<sup>163</sup>.

Los propósitos principales de la esplenectomía son suprimir el menoscabo de la capacidad física y vitalidad de los pacientes, evitar la colelitiasis por la hemólisis crónica y prevenir crisis anémicas graves que precisen transfusión<sup>38,44</sup>. Así pues, la esplenectomía está indicada en todos los enfermos de EH con hemólisis sintomática o retraso del crecimiento (síntomas que se dan principalmente en las formas moderadas y graves)<sup>112,137,139</sup>, siendo aconsejable en este caso no realizarla antes de los 3-5 años de edad por el riesgo aumentado de infección postesplenectomía de los niños pequeños asplénicos<sup>38,112,139,183</sup>. La indicación es cuestionable en las EH leves o asintomáticas con colelitiasis o historia familiar de ella, dada la reducida probabilidad de que tal complicación produzca manifestaciones clínicas<sup>71</sup>; los resultados de la comparación de los riesgos de la esplenectomía electiva versus la actitud expectante en caso de colelitiasis asintomática favorecen esta última conducta<sup>117,181</sup>. En los pacientes mayores de 60 años no se recomienda, en general la cirugía por la mayor morbimortalidad quirúrgica y anestésica de los individuos de edad avanzada y que con frecuencia presentan enfermedades asociadas que aumentan el riesgo operatorio<sup>183</sup>, prefiriéndose en este grupo de enfermos la actitud conservadora<sup>58,154</sup>. La decisión final de la esplenectomía se basa en el criterio clínico y radica en la edad, sintomatología y quizá en la probabilidad de una profilaxis adecuada de las infecciones postesplenectomía<sup>184</sup>; algunos autores reclaman el rol en este sentido del grado de déficit de espectrina<sup>44</sup> como parámetro predictivo de la respuesta a la esplenectomía<sup>4,163</sup>, ya que aquellos enfermos con contenidos de espectrina superiores al 80% de los niveles normales no suelen precisar esplenectomía en la infancia o adolescencia<sup>44</sup>.

Si la esplenectomía está indicada y existe colelitiasis, debe realizarse la colecistectomía en el mismo acto operatorio<sup>38,154,163,183</sup>, en el cual también deben buscarse y retirarse bazos accesorios en caso de existir.

Clásicamente se afirma que los enfermos afectados de verdadera EH siempre responden a la esplenectomía<sup>112</sup>, cuyos fracasos obedecen a la coexistencia de la EH con otras anemias hemolíticas, o bien a la existencia de bazos accesorios (hasta en un 39% de los pacientes) y esplenosis<sup>38,139</sup>; estas dos últimas posibilidades pueden sospecharse por la ausencia de cambios hemoperiféricos postesplenectomía, aunque su diagnóstico requiere procedimientos de diagnóstico por la imagen, particularmente métodos isotópicos<sup>38,139</sup>.

Por otra parte, todos los enfermos con procesos hemolíticos tienen riesgo de déficit de ácido fólico, por lo que resulta recomendable prescribir suplementos del mismo.

Ante todo lo expuesto, queda patente que el pronóstico de la EH es muy variable de un paciente a otro, dependiendo de la magnitud del defecto, su curso clínico, complicaciones y necesidades terapéuticas de cada caso.

## 2. OBJETIVOS

La EH es el trastorno hemolítico hereditario más prevalente en la población, con herencia en general autosómico dominante, una amplia expresividad clínica y respuesta favorable a la esplenectomía cuando es necesaria. Se caracteriza por hemólisis, presencia de esferocitos en sangre periférica, elevación de la CHCM, aproximadamente en la mitad de los casos, y el típico aumento de la fragilidad osmótica de los hematíes que ha continuado siendo el test de confirmación diagnóstica desde las observaciones de Chauffard (1907)<sup>38</sup>, y que refleja la reducción de la relación superficie/volumen inherente al defecto intrínseco del eritrocito<sup>6,12,112,139,163</sup>. En la mayoría de los casos este defecto se ha relacionado con un déficit parcial de espectrina en la membrana eritrocitaria proporcional a la gravedad del curso clínico de la enfermedad<sup>2,3,4,121</sup> y que podría ser secundario a un déficit parcial de ankirina asociado recientemente descrito<sup>30,36,82</sup>.

Sin embargo, no todos los enfermos siguen este perfil clásico en que el diagnóstico es incuestionable. Aproximadamente un 25% de las EH<sup>2,112,163</sup> carecen de historia familiar evidente con los métodos diagnósticos convencionales y clínicamente suelen cursar con mayor afectación del curso clínico<sup>3,4,6,8,12,112,137,139,163</sup>, aunque rara vez con anemia hemolítica dependiente de transfusión<sup>2</sup> y respuestas parciales a una esplenectomía precoz<sup>2,4,6,12,30,113,137,139</sup>. Estos pacientes constituyen un grupo heterogéneo que incluiría casos esporádicos por nuevas mutaciones, formas de herencia recesiva y ejemplos de herencia dominante con penetrancia genética reducida<sup>112</sup>. A este respecto Agre (1989)<sup>6</sup> sostiene que la EH dominante y recesiva son enfermedades distintas y no la mera expresión homocigota o heterocigota de un defecto; por su parte, Delaunay y cols. (1990)<sup>41</sup> consideran que el fenotipo de la EH es el resultado de un gen mutado modulado por la actividad de su correspondiente alelo y/o la actividad de otros genes no alélicos, lo que explicaría la amplitud del espectro clínico de la entidad. Si los progenitores de estos enfermos sin historia familiar están afectados ha de ser muy levemente al pasar desapercibidos a los métodos diagnósticos convencionales.

Este problema enlaza con la dificultad diagnóstica que a menudo plantean los casos leves o asintomáticos a la metodología tradicional<sup>64</sup>,

112,140,163. Estos son un 20-30% de las EH<sup>112,163</sup>, aparecen frecuentemente en los estudios familiares de casos más evidentes y plantean una serie de problemas:

- presentan una pequeña cantidad de esferocitos en sangre periférica, cuya identificación morfológica es subjetiva y difícil<sup>140</sup> y su CHCM es anodino
- el grado de hemólisis es ligero
- la fragilidad osmótica no incubada es normal y la incubada acaso no está notablemente aumentada.

Disponer de otras técnicas que teóricamente fuesen capaces de cubrir el vacío de los métodos convencionales eliminaría la dificultad diagnóstica de la EH leves o asintomáticas, permitiendo discernir si los progenitores de casos sin historia familiar del defecto están o no afectados, lo que quizá aportase alguna solución sobre la herencia de tales enfermos. Hemos evaluado en este sentido la citometría de difracción de luz láser y la SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios aislados con estimación de los contenidos proteicos de la membrana, ambas son técnicas conocidas, sencillas y fácilmente disponibles.

La citometría de difracción de luz láser, según los sistemas H de Technicon<sup>TM</sup> (figura 15), mide de manera exacta, directa y simultánea la intensidad de la luz difractada por cada hematíe (previamente esferificado isovolumétricamente y ligeramente fijado con glutaraldehído) en dos intervalos angulares<sup>128-171</sup>. La tecnología ofrece medidas exactas de VCM entre 30 fL y 120 fL y de CHCM entre 27 g/dL y 45 g/dL<sup>128</sup>, y proporciona rápidamente información cuantitativa de la presencia de hematíes con el aumento de la concentración de hemoglobina característico de los esferocitos, al ser células deshidratadas<sup>12,112,128,139</sup>. Esta es una ventaja fundamental frente a los citómetros convencionales (figura 14), que no son capaces de estimar correctamente CHCM superiores a 35 g/dL por su medida inexacta del volumen de las células deshidratadas<sup>128</sup>; además la rigidez, esfericidad nativa y elevada concentración de hemoglobina del esferocito impiden la medida correcta de su volumen y de su CHCM, por ser un parámetro calculado a partir de VCM<sup>125,128,171,173</sup>, inconvenientes que dificultan la detección de casos leves o asintomáticos de EH<sup>64,140</sup>.

En cambio, la citometría de difracción de luz láser resulta óptima para el estudio de la EH por su facultad de medida directa, simultánea y

exacta del volumen y la concentración de hemoglobina de los hematíes, con información sobre la presencia de esferocitos en la curva de distribución de los hematíes, según concentración de hemoglobina (figura 18) y sus parámetros derivados HC (concentración de hemoglobina corpuscular media estimada directamente) HDW (desviación standard de la distribución) y particularmente % Hiper o porcentaje de hematíes de concentración de hemoglobina mayor de 41 g/dL. Dichas variables son verdaderos indicadores de esferocitosis, entendida como la existencia de esferocitos en una muestra dada, hecho no exclusivo ni patognomónico de la EH.

El rol diagnóstico de la citometría de difracción de luz láser en la EH sólo se ha evaluado en dos estudios <sup>64,140</sup>. Pati y cols. (1989) <sup>140</sup> han considerado básicamente su aspecto cualitativo y han encontrado muy específico del problema el perfil de las curvas de distribución de los hematíes. Gilsanz y cols. (1989) <sup>64</sup> han demostrado en un trabajo preliminar del actual la utilidad de HC, HDW y % Hiper en la detección de esferocitosis en la EH. Pero el número de pacientes no esplenectomizados incluidos ha sido pequeño en ambos estudios (12 y 22 casos, respectivamente). Por otra parte, nadie ha evaluado la eficacia estadística del método como prueba diagnóstica de esferocitosis aplicada a la EH, que en caso afirmativo resolvería dos problemas:

- sustituiría la subjetividad y dificultad de la identificación de esferocitos en una muestra por parámetros cuantitativos indicadores de esferocitosis obtenidos de modo rápido y sencillo,
- representaría una alternativa real al clásico estudio de fragilidad osmótica y variantes, que con frecuencia no son lo suficientemente sensibles en el diagnóstico de la entidad y que en definitiva son también indicadores de esferocitosis, al estar basados en la pérdida de la relación superficie/volumen del esferocito.

Estos argumentos tienen especial trascendencia sobre todo en el diagnóstico de las formas clínicas leves y asintomáticas. Además, el procedimiento permitiría cuantificar el grado de esferocitosis inherente a la gravedad de la EH, hecho ya demostrado en un pequeño número de enfermos <sup>64</sup>.

La SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria es conocida desde los trabajos de Fairbanks y cols. (1971) <sup>50</sup>. Su aplicación al estudio de la EH ha permitido apreciar en la mayoría de los enfermos un déficit parcial de

espectrina directamente proporcional al grado de afectación clínica 2,3,4, 12,44,139, al que posteriormente se han asociado déficits parciales de ankirina (tanto en EH dominantes<sup>36,82</sup> como recesivas<sup>30,116</sup>), de proteína 4.2 ocasionalmente<sup>81,138,139,148</sup> (relacionado en ciertos casos con un defecto del dominio citoplásmico de la banda 3<sup>84,138</sup>) y recientemente de la banda 3<sup>115,121,122,131</sup> (tabla I). Se ha descrito en progenitores de EH sin historia familiar que el contenido de espectrina menor del 97% de la normalidad se asocia a un aumento de la fragilidad osmótica<sup>4</sup>. A pesar de que el contenido de la membrana eritrocitaria en ankirina se ha explorado en varias ocasiones, siempre ha sido en series muy cortas<sup>30,36,82</sup>, y se ha sugerido que el déficit combinado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup>Ank<sup>+</sup>) es el más prevalente en la EH<sup>3,4,36,82,116,139</sup>, aunque no existen estudios confirmatorios en grupos mayores de enfermos. Si la técnica se incorporase a la rutina diagnóstica de la EH, se aminoraría la dificultad diagnóstica de las formas leves y asintomáticas<sup>163</sup>, y por ende de los progenitores de las EH sin afectación familiar aparente, probablemente proporcionando datos que contribuyan a esclarecer la herencia del defecto en estos pacientes.

Ante el estado del problema decidimos estudiar un colectivo de 62 casos de EH y 12 progenitores de enfermos sin historia familiar con los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar subgrupos homogéneos según edad, herencia, gravedad del curso clínico y antecedentes de esplenectomía, y analizar sus características.
- 2.- Respuesta a la esplenectomía.
- 3.- Valorar la contribución de la citometría de difracción de luz láser al diagnóstico de la EH merced a sus indicadores de esferocitosis, discutiendo varios aspectos:
  - . su eficacia estadística en el diagnóstico de la EH
  - . si traduce la intensidad de la esferocitosis inherente a la afectación del curso clínico, considerando el problema de los casos leves o asintomáticos y el cambio tras la esplenectomía
  - . su relación con otros parámetros de hemólisis
  - . si puede reemplazar en la metodología diagnóstica de la EH a las técnicas de fragilidad osmótica y variantes, que resultan laboriosas y no lo suficientemente sensibles.
- 4.- Evaluar la contribución al diagnóstico de la EH de la SDS-PAGE de

las membranas eritrocitarias aisladas y el cálculo de sus contenidos proteicos, analizando:

- . su eficacia estadística
  - . la frecuencia de los déficits proteicos, su variabilidad con la gravedad de la EH y su relación con otros parámetros de hemólisis.
- 5.- Estudiar a los progenitores de EH con las dos técnicas anteriores en busca de signos objetivos de esferocitosis y de defectos proteicos de la membrana eritrocitaria, reflexionando sobre la información obtenida y su posible repercusión en la herencia en los enfermos sin afectación familiar aparente.
- 6.- Clasificar la EH según su grado de expresión clinicobiológica, integrando los indicadores de esferocitosis ofrecidos por la citometría de difracción de luz láser y los indicadores de déficit proteico de la membrana eritrocitaria.

### 3. MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Enfermos y controles

El presente estudio se ha llevado a cabo en los Hospitales "12 de Octubre" y "Príncipe de Asturias" sobre 62 pacientes previamente diagnosticados de EH. Cincuenta y tres casos presentaban clara historia familiar y procedían de 21 familias. En 2 pacientes no fue posible el estudio familiar. Siete casos carecían de historia familiar y el estudio de padres y hermanos, si los había, no permitió en ellos el diagnóstico de EH; decidimos incluir en el presente estudio a sus progenitores, de los cuales fue posible acceder a 6 parejas.

Cuarenta y dos enfermos proceden del Hospital "12 de Octubre" y veinte (2, 8, 29, 30, 35, 36, 48, 49, 59-69, y 74) del Hospital "Príncipe de Asturias". El diagnóstico previo de EH se había realizado en base al hallazgo de esferocitos en la extensión de sangre periférica, test de Coombs directo negativo, elevación de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), aumento de la cifra de reticulocitos y LDH sérica con descenso de haptoglobina, y aumento de la fragilidad osmótica de los hematíes incubada (tras 24 h a 37°C en condiciones estériles) 12,38,83,112, 137,139. Diecinueve pacientes habían sido esplenectomizados.

La valoración de la historia familiar y personal de los pacientes, de edades comprendidas entre 4 meses y 66 años, se realizó mediante consulta retrospectiva de las historias clínicas y entrevista personal con todos ellos en el momento del comienzo del estudio, de octubre de 1989 a marzo de 1990. Se evaluaron los siguientes aspectos: sexo, pedigrée, edad actual y al diagnóstico, motivo del diagnóstico (habiendo contemplado dentro de este apartado posibilidades como anemia crónica, ictericia neonatal o no neonatal, esplenomegalia, crisis anémicas y estudio familiar por existencia de parientes afectados; en el caso número 33 el diagnóstico de EH fue casual y debido a estudio por trombocitopenia), antecedentes de crisis anémicas, documentación de colelitiasis y edad en el momento de la esplenectomía en caso de haberla sufrido. Tales datos permitieron agrupar a los pacientes en categorías según el curso clínico del defecto 12,38, 44,83,112,137,139.

A continuación de la entrevista, se obtuvo muestra de sangre de los pacientes por venopunción limpia, destinándose una parte a determina-

ciones bioquímicas séricas como bilirrubina total LDH, sideremia, ferritina, haptoglobina y eritropoyetina (EPO). La segunda parte de la muestra obtenida se anticoaguló con EDTA tripotásico y se sometió al exámen hematológico consistente en la realización de hemograma con estudio de la morfología de la serie roja, recuento de reticulocitos, resistencia globular osmótica (RGO) inmediata y postincubación de la sangre durante 24 h a 37°C en condiciones estériles, y estudio de la membrana eritrocitaria mediante SDS-PAGE e inmunoblot antiespectrina de los estromas aislados. El estudio ha incluido también una ecografía abdominal en todos los pacientes de al menos 4 años de edad, dirigida a valorar esplenomegalia no palpable y/o colelitiasis.

Se evaluaron asimismo 12 progenitores de 6 pacientes que carecían de historia familiar; sus muestras de sangre fueron estudiadas exactamente de la misma forma que en el caso de los enfermos.

Como referencia para el estudio, se obtuvo muestra de sangre de 140 controles adultos sanos (6 de ellos esplenectomizados por rotura traumática del bazo) y se anticoaguló con EDTA tripotásico. Sus hemogramas tuvieron por objeto el cotejo de los parámetros hemocitométricos con pacientes y progenitores. Veinticuatro controles no esplenectomizados fueron procesados simultáneamente con los casos para el estudio de la membrana eritrocitaria mediante SDS-PAGE e inmunoblot antiespectrina desde la comparación de los estromas.

### 3.2. Citometría de difracción de luz láser

Se eligió la citometría por difracción de luz láser como método de realización de todos los hemogramas, utilizando para ello el autoanализador H-1 Technicon<sup>TM</sup>.

En el sistema de apertura-impedancia (figura 14), la magnitud del impulso generado por una célula no sólo depende de su volumen, sino también de su forma, que está determinada por su deformabilidad cuando atraviesa la apertura<sup>11</sup>. Este factor depende de la viscosidad citoplásmica, a su vez influido por la concentración de hemoglobina. Esto significa que en este sistema la medida del volumen está afectada por la concentración de hemoglobina<sup>128,173</sup>. En la EH la rigidez de la célula supone un factor superficie relativamente elevado en este sistema, determinando, en consecuencia, sobreestima del volumen e infraestima de la concentración de hemoglobina<sup>171</sup>.

Los citómetros convencionales por difracción de luz miden el volumen de los hematíes en la luz difractada a un determinado intervalo angular <sup>173</sup>. En este sistema la orientación de las células en el haz de luz es un factor primordial en la valoración de su tamaño, como también lo es la concentración de hemoglobina intracelular, que determina la densidad óptica e índice de refracción del hematíe, y en consecuencia la cantidad y dirección de la luz difractada <sup>171,173</sup>. Por ello, para una señal de difracción dada, la desconocida concentración de hemoglobina falsea el volumen asociado a dicha señal <sup>128</sup>.

El método elegido evita el problema de la interferencia de la concentración de hemoglobina en la medida del volumen de los hematíes, debido a su capacidad para determinar directa, simultánea e independientemente volumen y concentración de hemoglobina en cada célula mediante medida de la luz monocromática difractada en dos diferentes intervalos angulares <sup>128</sup>. La dependencia de la difracción de los cambios de forma y orientación de la célula queda abolida por esferificación isovolumétrica de los hematíes por un método similar al descrito por Ponder <sup>142</sup> hace aproximadamente medio siglo. La preparación citoquímica requiere un solo reactivo tamponado (que incluye 1 mg/dL de SDS y 0,1% de glutaraldehído en PBS 290 mosm/Kg, pH 7,4), según método de Kim y Ornstein <sup>91</sup>, que rápidamente encoge la membrana hasta la formación de una esfera sin alteración del volumen total de la célula, esfera que queda ligeramente fijada para ser presentada al detector <sup>128,171</sup>, evitando así los cambios en la forma inducidos por fuerzas generadas en el fluido durante el flujo celular <sup>128</sup>. Así los hematíes esféricos se comportan como simples esferas dieléctricas homogéneas <sup>173</sup>, objetos en que es muy sencillo medir la luz difractada porque es uno de los pocos casos en que las ecuaciones de Maxwell para los fenómenos electromagnéticos pueden resolverse completamente, y la teoría de Mie <sup>90</sup> describe de forma precisa su difracción. Para ello, el sistema de detección óptica mide la intensidad de la luz difractada en dos intervalos angulares (figura 15), uno de ellos bajo, entre 2º y 3º, y otro intervalo angular más alto, entre 5º y 15º, y partiendo de este par de intensidades, un procesador electrónico de datos basado en la teoría de difracción de Mie deriva el correspondiente par de valores para el volumen y el índice de refracción (verdadera función lineal de la con-  
do <sup>128,171,173</sup>. De esta forma, se determinan de modo directo, simultáneo,

independiente, preciso y exacto volumen y concentración de hemoglobina para cada hematíe en una muestra de sangre, construyéndose los correspondientes histogramas según volumen y según concentración de hemoglobina, y a partir de los histogramas se computan volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), coeficiente de variación de la distribución por volumen (RDW) y desviación standard del histograma según concentración de hemoglobina (HDW)<sup>128, 171,173.</sup>

Se ha comprobado que este método cubre con exactitud un amplio rango de medidas de VCM (30-120 fL) y de CHCM (27-45 g/dL) en contraste con los citómetros convencionales, en los cuales un CHCM superior a 35 g/dL no puede ser estimado correctamente<sup>125</sup> por su medición inexacta del volumen de las células deshidratadas<sup>128</sup>, como son los esferocitos<sup>12,38,83,112,137,139.</sup>

La rigidez, esfericidad nativa y característico incremento en la concentración de hemoglobina de los hematíes de la EH no permiten en citómetros convencionales obtener medidas exactas de volumen por interferencia de la concentración de hemoglobina, entre otros factores, ni de CHCM, valor computado a partir del VCM<sup>125,128,171,173</sup>, con lo que pueden pasar desapercibidas formas leves o moderadas de dicho defecto<sup>64, 140.</sup> Nuestro método por tanto, resulta más adecuado para el estudio de la EH, por su capacidad de medida directa y libre de interferencias, independiente, simultánea y exacta de volumen y concentración de hemoglobina (HC)<sup>64,140.</sup>

Utilizando el autoanalizador H-1 Technicon<sup>TM</sup> se evaluó la serie roja de pacientes, progenitores y controles mediante los siguientes parámetros: número de hematíes, hemoglobina, VCM, hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media calculada (CHCM) y medida directamente (HC), tanto por ciento de hiper Cromía o porcentaje de hematíes con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL (% Hiper) y RDW.

En un intento de evaluar la posibilidad de una mejor sensibilidad diagnóstica del método seleccionando como umbral para la detección de esferocitos concentraciones de hemoglobina inferiores a 41 g/dL (valor por encima del cual el autoanalizador define el parámetro % Hiper), se calculó la proporción de estos hematíes directamente de las curvas de distribución según concentración de hemoglobina, dada la imposibilidad de ac-

ceso a la computadora. La superficie bajo dicha curva se dividió en 3 áreas (figura 18) en casos y controles:

- Area I: eritrocitos con concentraciones de hemoglobina entre 35 y 37,5 g/dL,
- Area II: hematíes con concentraciones de hemoglobina de 37,5 a 40 g/dL,
- Area III: hematíes cuya concentración de hemoglobina supera 40 g/dL.

La superficie de estas áreas se midió en un Mop Videoplan Kontron<sup>R</sup> y se expresó como porcentaje del área total bajo la curva.

### 3.3. Morfología de la serie roja

Se examinaron mediante microscopía óptica extensiones de sangre periférica (anticoagulada en EDTA tripotásico) de cada uno de los pacientes y progenitores teñidas en tinción panóptica de Wright<sup>184</sup>. Se buscó la existencia de esferocitos, policromasía y poikilocitosis, en particular formas con superficie espiculada o acantocitos en ausencia de esplenectomía, cuya presencia ha sido detectada en pacientes con EH por defecto genético en la unión de la proteína 4.1 con la  $\beta$  espectrina (HS  $\beta$ Sp-4.1)<sup>186</sup>, y marcadas irregularidades del contorno celular, apreciadas en enfermos con déficit combinado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup>AnK<sup>+</sup>)<sup>30</sup>.

### 3.4. Reticulocitos

En todos los pacientes y progenitores se practicó recuento de reticulocitos, partiendo de sangre total anticoagulada en EDTA tripotásico. Se utilizó como colorante supravital el nuevo azul de metileno<sup>37</sup> por su superioridad sobre otros agentes tintoriales<sup>48</sup>. La tinción se realizó en los treinta minutos siguientes a la extracción de sangre, procediendo según la técnica habitual y con recuento de 1000 hematíes<sup>37,48</sup>.

### 3.5. Resistencia globular osmótica

Se realizó el test de la resistencia globular osmótica (RGO) en muestras de sangre de pacientes y progenitores como método de evaluación de la relación superficie/volumen de los hematíes<sup>16</sup>, tanto de forma inmediata en muestras recientes anticoaguladas con EDTA tripotásico como postincubación a 37°C durante 24 h en condiciones estériles; las determinaciones inmediatas se llevaron a cabo dentro de las dos primeras horas de la extracción de las muestras de sangre.

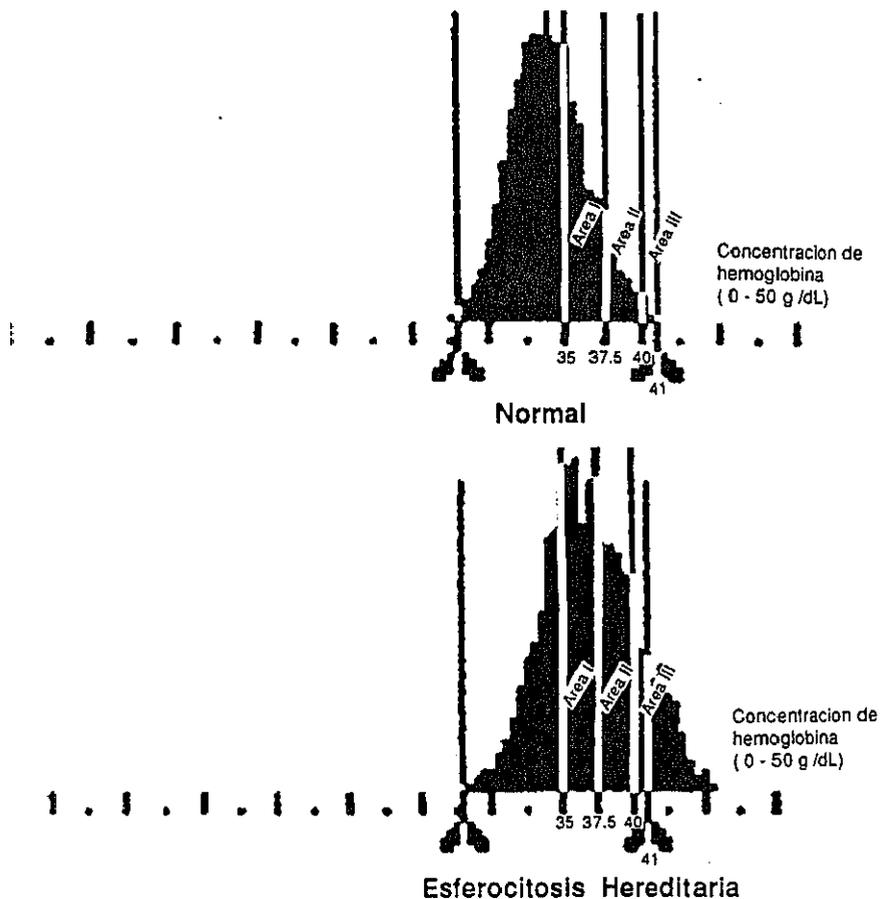


Figura 18.- Distribuciones de los hematíes según concentración de hemoglobina por citometría de luz láser. Control y EH. Se especifican las Areas definidas bajo la curva. En la EH la distribución se amplía y desplaza con mayores valores de Areas I y II y con aparición de células de concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL (% Hiper).

Se procedió siempre de forma habitual 16,39. Muy brevemente, se preparó una batería de soluciones salinas hipotónicas a pH 7,4 en un rango de concentraciones de 1 a 10 g/L ClNa (para el estudio de las muestras incubadas se incluyó adicionalmente la concentración de 12 g/L de ClNa); tras su distribución en sendas alícuotas se añadió sangre total a cada una de ellas en proporción 1 a 100 y una vez agitado todo suavemente por inversión se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 1200-1500 g durante 5 minutos y se separaron los sobrenadantes. El grado de hemólisis producida se midió espectrofotométricamente a 540 nm en cada sobrenadante, utilizando para ello un aparato Spectronic 70 (de Bausch and Lomb <sup>R</sup>). Se consideró como 100% de hemólisis la producida en la alícuota con 1 g/L de ClNa y 0% de hemólisis la correspondiente a 9 g/L de ClNa, utilizando ésta como blanco (en caso de hemólisis en ella se consideró como blanco el sobrenadante de la fracción con 12 g/L de ClNa). Se cuidó que la absorbancia de la alícuota 100% de hemólisis no excediese 0,5 unidades, diluyendo con ClNa 1 g/L en caso de ser necesario. El porcentaje de hemólisis en cada tubo se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{\text{OD muestra}}{\text{OD tubo 1g/L ClNa}} \times 100,$$

con los resultados se confeccionaron las curvas de fragilidad osmótica, representando cada concentración de ClNa versus el porcentaje de hemólisis producida por ella; en condiciones normales se obtiene una curva sigmoide casi simétrica.

En nuestro trabajo, hemos expresado la RGO definiéndola por tres puntos: lisis inicial o concentración de ClNa a la cual comienza a producirse hemólisis, lisis completa o concentración de ClNa en la que se ha producido la máxima hemólisis y fragilidad media o concentración de ClNa causante del 50% de hemólisis. En todos los estudios se construyó la curva completa y se examinó su trazado normal, diagonal o caudado (figura 16) 38,39,127,129.

### 3.6. Estudio de la membrana eritrocitaria

Se realizó en todos los pacientes, progenitores y 24 controles. A continuación describiremos los procedimientos empleados para la preparación

de los estromas eritrocitarios, estimación del contenido proteico total de los mismos, estimación del contenido de espectrina y ankirina de la membrana del hematíe e inmunoblot antiespectrina.

### 3.6.1. Preparación de los estromas eritrocitarios

Partiendo de sangre venosa de casos y controles recogida en EDTA tripotásico, como máximo a las 48 horas de su obtención y conservando siempre las muestras a 4°C hasta el momento de procesarlas, se prepararon membranas eritrocitarias según se ha descrito previamente<sup>3,29,43,50, 51</sup>. Para ello, se desleucotizó la sangre venosa mediante una columna de celulosa microcristalina en suero salino fisiológico (SSF), y tras lavar los hematíes 6 veces en SSF fueron sometidos a lisis hipotónica a 4°C en 20-40 volúmenes de  $\text{PO}_4\text{Na}_3$  5 mM, EDTA 1 mM a pH 8, con fenilmetil-sulfonilfluoride (PMSF) 0,3 mM como inhibidor de las proteasas con el fin de minimizar las proteolisis, centrifugando a continuación a 0-4°C a 300.000 g durante 15-20 minutos en centrifuga refrigerada Sorvall<sup>R</sup>, con posteriores 2-3 lavados más en la misma solución de lisado hasta que los estromas eritrocitarios aparezcan blancos o de aspecto cremoso.

Las membranas obtenidas se repartieron en alícuotas de 0,1 ml y se conservaron congeladas entre -40 y -70°C hasta su utilización (en los casos y controles en que ésta no fue inmediata a su preparación) como máximo al cabo de 1 semana.

### 3.6.2. Determinación del contenido proteico total

Se determinó la cantidad de proteína total contenida en las membranas eritrocitarias obtenidas mediante Bio-Rad<sup>R</sup> Protein Assay<sup>R</sup>, según su procedimiento standard, sobre muestras no diluidas y con albúmina sérica bovina (BSA) como standard proteico. Al cabo de 5 a 60 minutos de la adición del reactivo colorante (contiene ácido fosfórico y metanol) en proporción 50 a 1 volúmenes, se midió en espectrofotómetro Gifford 260 la densidad óptica a 595 nm (OD. 595) de standard y problemas, una vez construida la curva standard (representando gráficamente OD<sub>595</sub> versus concentración de los standards) se extrapolaron a partir de ella las concentraciones proteicas de los problemas.

Este método está basado en que la absorbancia máxima de una solución ácida de azul de Coomassie G-250 vira de 465 nm a 595 nm cuando

tiene lugar su unión a las protefnas <sup>155</sup>, de forma que permite la aplicación de la ley de Beer para cuantificar protefnas con exactitud, manteniendo la adecuada proporción entre reactivo colorante y muestra, y ha sido utilizado por otros autores para estimar el contenido proteico de los estromas eritrocitarios <sup>29,97</sup>.

### 3.6.3. Estimación del contenido de espectrina y ankirina

Para ello las membranas eritrocitarias obtenidas se sometieron a electroforesis desnaturalizante con 1% de dodecil sulfato sódico (SDS) en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) homogéneo al 5,6%, en placas de 1 mm de espesor y 8 x 8 cm, según el sistema continuo de Fairbanks y cols. (1971) <sup>50</sup> y utilizando material de Biometra <sup>R</sup>. Brevemente, la solución formadora de gel se elaboró con 5,6% de poliacrilamida (partiendo de una solución acuosa de acrilamida al 40% y bisacrilamida 1,5%, utilizando resina Amberlite MB-6 <sup>R</sup> para su purificación y desionización), SDS 1%, y acetato sódico 0,02 M, EDTA 0,002 M, tris 0,04 M a pH 7,4, con persulfato amónico 0,15% y N, N, N', N' tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,025% como catalizadores de la polimerización; 10 mL de esta solución permite obtener una placa de gel en el material utilizado. Una vez vertida la solución formadora de gel entre sus soportes de vidrio, se permitió polimerizar a temperatura ambiente durante al menos 12 a 24 horas en posición vertical antes de su utilización; este procedimiento va dirigido a que la polimerización sea completa tras una primera fase rápida de gelificación <sup>51</sup>; por tanto, de forma habitual, los geles en plaza fueron preparados el día anterior al de la correspondiente electroforesis.

De cara a la electroforesis, las muestras de estromas eritrocitarios fueron suspendidas en un volumen de "sample buffer" (SDS 1%, sucrosa 10%, tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, dithiothreitol 0,04 M, a pH 8 con ClH y con azul de bromofenol 1% como colorante trazador) <sup>50</sup>, incubando a continuación a 37°C durante 20-25 minutos; con ello se consigue disrupción de la membrana y unión del SDS a las protefnas <sup>51</sup>, con reducción de los puentes disulfuro mediante el dithiothreitol (DTT) <sup>50</sup>.

Una vez preparadas las muestras de membranas eritrocitarias de pacientes y controles para SDS-PAGE se realizaron las electroforesis en una cubeta vertical Minigel-Electrophoresis de Biometra <sup>R</sup> con una fuente EC 600 (4.000 Volts. Constant Power Supply) de E-C Apparatus Corporation. Se utilizó un tampón con SDS 1%, tris 0,04 M, acetato sódico 0,02 M,

EDTA 0,002 M a pH 7,4 como buffer de electroforesis<sup>50</sup>, y se trabajó a temperatura ambiente. Cada gel en placa preparado según el método y material descrito contenía 10 pocillos para aplicación de muestras, de forma que en cada ensayo se incluyó un control y nueve problemas (pacientes y progenitores) distintos. La aplicación de las muestras se realizó mediante una pipeta Hamilton Microliter<sup>R</sup> Syringe 705 dispensando aproximadamente 25  $\mu$ g de proteína<sup>3</sup> en cada pocillo, con rapidez, sin producir turbulencias y evitando la mezcla de la muestra con el buffer de electroforesis para no perder una buena delimitación de las bandas, lo que sucedería si se aumentase la altura de la columna de muestra aplicada<sup>51</sup>. Tras una electroforesis inicial de 5-10 minutos de duración a 70 V y 20 mA, destinada a que la muestra aplicada penetre en el interior del gel, se llevó a cabo la SDS-PAGE a 40 mA y 170 V como condiciones (siendo siempre la intensidad la función dominante). Las electroforesis se dieron por concluidas cuando el colorante trazador alcanzaba el borde inferior del gel en placa, transcurriendo hasta ello 80-100 minutos. No se realizó refrigerado del gel porque no es necesario, incluso si se aprecia cierto calentamiento al tacto cuando la electroforesis tiene lugar a temperatura ambiente, ya que se ha constatado que el calor generado en los geles raramente es fuente de artefactos significativos en SDS-PAGE<sup>51</sup>.

Después de desmoldar los geles, se tiñeron y destiñeron por difusión a temperatura ambiente en bandejas de acero inoxidable bajo agitación continua aproximadamente a 30 sacudidas por minuto<sup>51</sup>, utilizando para ello un agitador rotatorio Immunetics<sup>R</sup> Rocking Platform (de Reliable Scientific<sup>R</sup>), manteniendo como regla la proporción de 20 volúmenes de solución de tinción o destinción por cada volumen de gel<sup>51</sup>. La tinción se realizó por inmersión del gel durante 45 minutos en una solución con azul de Coomassie R 250 0,1%,  $\text{SO}_4\text{Cu}$  0,1% (mejora la calidad de la tinción) con metanol 30% y ácido acético 10%; para su elaboración, previamente se disolvieron los solutos en agua destilada, añadiendo inmediatamente antes de teñir los geles los volúmenes correspondientes de metanol y ácido acético. La destinción se llevó a cabo en una solución de metanol 25% y ácido acético 10%, que iba siendo renovada aproximadamente cada 15-20 minutos hasta conseguir una decoloración del fondo del gel, transcurriendo aproximadamente 120-160 minutos en total. El azul de Coomassie utilizado en el sistema presumiblemente se une a las proteínas por

medio de interacciones, tanto iónicas como hidrofóbicas, pero no tiñe los complejos SDS-proteína eficientemente por competición con el SDS para la unión a las proteínas; por ello los pasos de la tinción y destinción requieren un ajustado equilibrio, en el que el alcohol ha de tener al menos cuatro funciones, la primera por producir una precipitación directa de las proteínas desnaturalizadas por el SDS, la segunda por extracción del SDS de los complejos proteicos inmovilizados<sup>50</sup>, la tercera por deshidratación y encogido del gel, contribuyendo, por tanto, a su fijado al reducir el tamaño efectivo de poro disponible para la difusión, y una cuarta función consistente en mantener el colorante en forma monomérica para facilitar su penetración en el gel encogido. En este esquema no está claro si el ácido acético tiene una función especial; se considera como razón de su uso que promueve la fijación y estabiliza la unión del colorante (aniónico) a las proteínas por mantener en éstas una carga positiva<sup>51</sup>.

Los geles tratados según este procedimiento exhibían un patrón de bandas teñidas por azul de Coomassie similar al descrito clásicamente<sup>50, 166</sup> (figura 19). Se estimó el contenido proteico de las mismas mediante densitometría<sup>29,30,51,106,166</sup> a 540 y 570 nm en un aparato Helena Process - 24 (figura 17), con integración del área bajo los picos de la espectrina (bandas 1 y 2), de la ankirina (banda 2.1), de la banda 4 (no conseguimos una neta definición de las bandas 4.1 y 4.2, por lo que consideramos globalmente banda 4) y de la banda 3, y se expresaron los contenidos de los estromas eritrocitarios en espectrina, ankirina y banda 4 como el cociente entre el área de cada una de ellas y el área calculada para la banda 3 (por ejemplo, cociente espectrina/banda 3)<sup>3,4,30</sup> (figura 17). Se realizaron cuatro determinaciones para cada caso (pacientes y progenitores) y control, considerando como valor definitivo su media aritmética.

Todos los ensayos de determinación del contenido de espectrina, ankirina y banda 4 de los estromas eritrocitarios se realizaron por duplicado, en dos días distintos.

Los geles teñidos se conservaron mediante secado entre dos hojas de celofán<sup>177</sup> utilizando un Gel-Drying Frame<sup>R</sup> de JKA-Biotech Aps (distribuido en España por Menarini). Este sencillo aparato consta de un marco con cuatro patas y cuatro pinzas, con cuatro listones de plástico que encajan perfectamente en las muescas que para ello presenta el marco; se completa con una placa cuadrada de 22 x 22 cm que se dispone - -

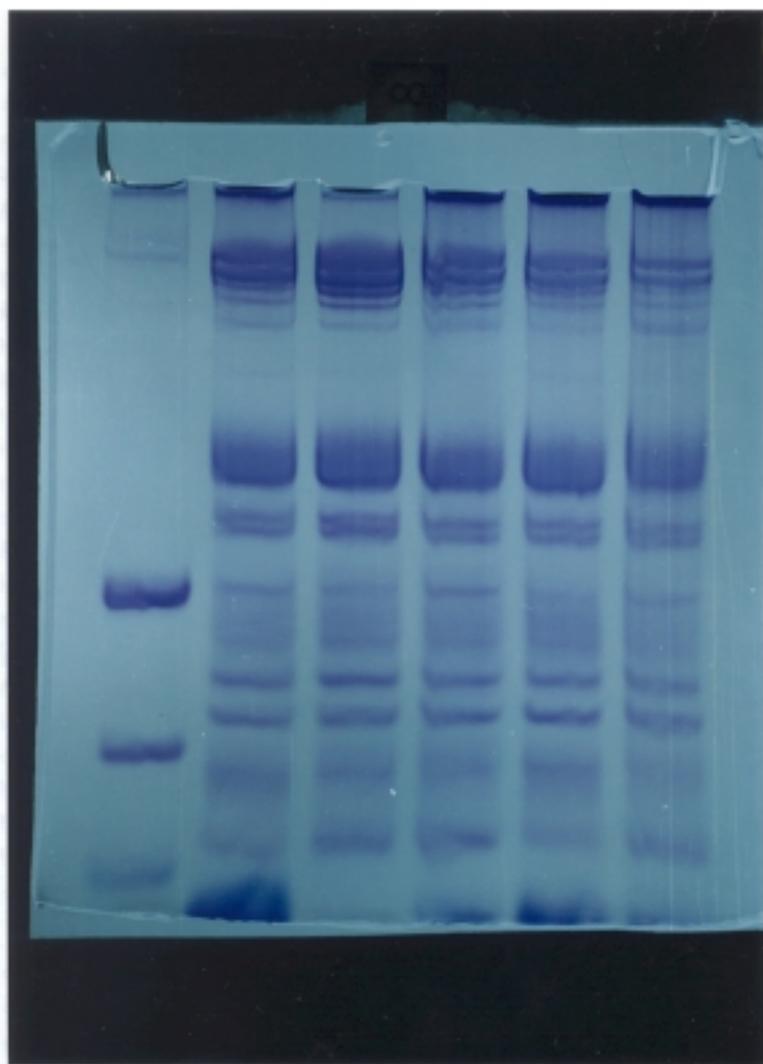


Figura 19.- SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria. Patrón de peso molecular, control y (E).

en el interior del marco destinada a sujetar el gel en placa mientras se está montando entre las hojas de celofán (de JKA-Biotech Aps). Este aparato permite el secado simple y rápido de los geles en placa, habiendo sido preconizado por Kyhse-Andersen por ser el método de secado de mejores resultados en sus manos<sup>94</sup>. El procedimiento es sumamente sencillo: en primer lugar se equilibraron los geles de poli(acrilamida durante toda la noche en glicerol al 3% (como alternativa se ha propuesto incluirlo en el agua del último lavado); este paso previene la rotura del gel durante el secado. A continuación se ablandan dos hojas de celofán en agua destilada, y una vez colocado el Gel-Drying Frame<sup>R</sup> en una superficie lisa, con las patas hacia arriba y la placa cuadrada en su interior, se dispone encima una hoja de celofán cubriendo las cuatro muescas que presenta el marco. Seguidamente se coloca el gel sobre la hoja de celofán, en el centro de la placa cuadrada y sobre él la segunda hoja de celofán. En este momento es conveniente frotar suavemente, con los dedos protegidos por guantes hasta eliminar todas las burbujas de aire entre el gel y el celofán. El siguiente paso supone tensar y sellar la pila de celofán y gel mediante encajado de los listones de plástico en las muescas del marco y su posterior fijado con las pinzas. Una vez separado el Gel-Drying Frame<sup>R</sup> de la placa cuadrada, se coloca sobre sus patas, de forma que puede ser secado por aire a través de sus dos caras. El tiempo de secado de los geles es de una noche a la temperatura ambiente del laboratorio, pero puede reducirse a 1 hora si el aparato se sitúa frente a una fuente de calor. Los geles secos no se doblan y presentan una superficie lisa que ofrece resultados óptimos en la densitometría<sup>94, 17</sup>, pudiendo conservarse sin deterioro indefinidamente.

#### 3.6.4. Inmunoblot antiespectrina

Para evaluar la existencia de productos de degradación de la espectrina en la membrana eritrocitaria, los estromas de pacientes, progenitores y controles fueron sometidos a análisis inmunoquímico mediante inmunoblot, también conocido como Western-blotting<sup>23</sup>. Es un método sensible para detectar fragmentos de degradación derivados de una proteína mayor<sup>5</sup>. Para llevar a cabo este estudio en pacientes con EH se ha utilizado un método<sup>2,29,30</sup> derivado del descrito por Towbin et al<sup>172</sup>; en nuestro caso se ha aplicado un método similar, modificado<sup>156</sup> del descrito por Elkon<sup>46</sup>.

Partiendo de unas SDS-PAGE recién realizadas, se equilibraron los geles desmoldados en fosfato buffer salino (PBS) pH 7,2-7,4 durante no más de 1-2 minutos, disponiendo a continuación la transferencia de las proteínas, separadas por pesos moleculares en el gel, a una hoja de nitrocelulosa como medio de soporte, según el siguiente procedimiento y en el siguiente orden: sobre la superficie de una bandeja metálica se colocó el gel equilibrado, y aplicada directamente sobre él una hoja de nitrocelulosa (Biometra<sup>R</sup>, tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ), recortada exactamente al tamaño del gel y previamente mojada en PES por flotación. A continuación se colocaron 3 capas de papel de filtro para blotting (Biometra<sup>R</sup> B3/B51) mojadas en PBS y un paquete de hojas secas de papel absorbente corriente, todo ello recortado siempre a la dimensión exacta del gel, disponiendo seguidamente encima una placa de cristal y sobre ella 0,5 Kg de peso; el grosor total de esta unidad de transferencia descrita fue de 2 cm aproximadamente. Se cuidó escrupulosamente en cada uno de los pasos evitar y eliminar burbujas de aire, y se trabajó con guantes para no dañar especialmente geles y hojas de nitrocelulosa. De esta forma, siempre a temperatura ambiente, la transferencia se completó en 3 horas, al cabo de las cuales se levantó cuidadosamente la membrana de la superficie del gel y se procesó para detección inmunológica de la espectrina transferida. Los geles residuales de la transferencia fueron teñidos con azul de Coomassie y conservados según se ha descrito en la estimación del contenido de espectrina y ankirina, aunque sin valorarlos densitométricamente por razones obvias.

Una vez inmovilizadas las proteínas esqueléticas en la membrana de nitrocelulosa, se procedió a la inmunodetección de espectrina, según el sistema ProtoBlot<sup>R</sup> Western Blot AP Regular System, Rabbit (Promega<sup>R</sup>), utilizando como anticuerpo primario un antisero policlonal de conejo, anti-espectrina eritrocitaria de ratón (Chemicon<sup>R</sup>). En todo momento se trabajó a temperatura ambiente, realizando todas las incubaciones y lavados en un contenedor de vidrio ligeramente mayor que la membrana y con agitación suave, evitando siempre que quedaran secas las hojas de nitrocelulosa. Para las incubaciones con el anticuerpo y la reacción de color, se utilizó la cantidad de solución justamente suficiente para sumergir la membrana con la superficie de la transferencia hacia arriba, volumen habitualmente de 0,1-0,15 mL/cm<sup>2</sup> de área de la membrana y que en nuestro caso se mantuvo en 0,15-0,25 mL/cm<sup>2</sup> para asegurar la adecuada

Inmersión de la hoja de nitrocelulosa en la solución. En el caso de la etapa de bloqueo (explicada posteriormente) y lavados, se realizaron con al menos el doble del volumen referido a nuestro supuesto.

Para llevar a cabo este proceso, el primer paso consiste en el bloqueo del exceso de los lugares de unión de las proteínas en el cual la membrana de nitrocelulosa recién separada del gel tras finalizar la transferencia, se equilibra y aclara en TBST (Tris 10 mM, ClNa 150 mM Tween 20 0,05%, y pH 8 con ClH), siendo incubada a continuación en Solución Bloqueante (TBST con albúmina sérica bovina, BSA, 1%) durante 30 minutos, con lo que se consigue saturar los lugares de unión inespecíficos de proteínas. No resulta conveniente reutilizar la Solución Bloqueante usada, puesto que pierde esta capacidad.

La segunda etapa fue la unión del anticuerpo primario adecuadamente diluido en TBST (según la dilución de trabajo para Western-blotting recomendada por el fabricante para cada lote de antisuero), reemplazando la Solución Bloqueante por dicha dilución e incubando 30 minutos; finalizado este tiempo se realizaron 3 lavados de la hoja de nitrocelulosa en TBST de 5-10 minutos de duración cada uno, con el fin de retirar el anticuerpo no unido, quedando lista para el siguiente paso.

La tercera etapa consistió en la unión del segundo anticuerpo, en nuestro caso anti IgG (Fc) de cabra anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (ProtoBlot<sup>R</sup>) a 1:7500 como dilución recomendada en TBST, con incubación aquí de la membrana de microcelulosa 30 minutos, y una vez transcurridos, se lavó de nuevo la membrana 3 veces durante 5-10 minutos cada vez en TBST para retirar el anticuerpo no unido. Llegado este punto, se secó la hoja de nitrocelulosa mojada en papel de filtro para dar comienzo a la reacción reveladora de color.

La cuarta etapa fue la reacción de color, transfiriendo la membrana a la Solución Reveladora de Color, preparada sobre una base de buffer para fosfatasa alcalina (AP buffer constituido por Tris 100 mM, ClNa 100 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, pH 9,5 con ClH) sobre la que se añadió por cada 10 mL de AP buffer, 66 µL de sustrato nitroazul de tetrazolio (NBT, 50 mg/mL en dimetil formamida, Promega<sup>R</sup>) y una vez mezclado, 33 µL de sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP, 50 mg/mL en dimetil formamida, Promega<sup>R</sup>), mezclando también a continuación; esta solución se protegió de la luz fuerte y se utilizó en el plazo de 1 h de haber sido

elaborada. En esta solución las áreas reactivas de la membrana de nitrocelulosa tomaron color púrpura en 1 a 15 minutos, considerándose el resultado óptimo al cabo de 50 minutos de reacción, que permitió la mejor intensidad de color de las bandas de espectrina sin aumento de la coloración de fondo (el desarrollo de color aún podía haber tenido lugar durante al menos 4 h, pero a expensas de una coloración de fondo progresivamente mayor). En este punto se interrumpió el desarrollo de color, aclarando la hoja de nitrocelulosa en agua desionizada durante al menos 15 minutos, con cambio del agua al menos 2 veces.

Para su conservación, la membrana de nitrocelulosa se dejó secar al aire sobre papel de filtro. Una vez seca, se mantuvo almacenada protegida de la luz.

### 3.7. Bioquímica Sérica

Se estudió la bioquímica sérica general en muestras frescas de suero de pacientes y progenitores mediante los autoanalizadores Technicon SMAC<sup>R</sup> e Hitachi 717 Automatic Analyzer<sup>R</sup> (Boehringer Mannheim en los 20 casos correspondientes al Hospital "Príncipe de Asturias" de Alcalá de Henares, números 2, 8, 30, 31, 36, 37, 49, 50, 62-72 y 77). Se computaron los parámetros siguientes: lactato deshidrogenasa (LDH, U/L), bilirrubina total (BT mg/dL) y sideremia ( $\mu\text{g/dL}$ ), con LDH 230-380 U/L, bilirrubina total 0-1 mg/dL y sideremia 37-158  $\mu\text{g/dL}$  como valores de referencia. La evaluación de las cifras de haptoglobina, ferritina y EPO se realizó según se describe a continuación:

- la haptoglobina se cuantificó mediante nefelometría, utilizando el Array<sup>TM</sup> Protein System, de Beckman<sup>R</sup> (42 casos procedentes del Hospital "12 de Octubre") y el sistema de antisuero N y nefelómetro de Behring<sup>R</sup> (20 casos correspondientes al Hospital "Príncipe de Asturias"). Con este procedimiento, tras una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos, la haptoglobina forma inmunocomplejos, de forma que las concentraciones existentes pueden ser determinadas cuantitativamente mediante la medición de la difusión luminosa<sup>145</sup>. La evaluación se realizó mediante una curva standard trazada con la ayuda de diluciones standard, con 13-163 mg/dL como rango de valores de referencia, expresando siempre los resultados en mg/dL,
- la ferritina se determinó, en los 42 casos pertenecientes al Hospital "12 de Octubre" mediante un ensayo en fase sólida por IRMA<sup>1</sup>, en el

que la radioactividad unida a dicha fase sólida fue registrada por un contador gamma, y los resultados se refirieron a los correspondientes standards de calibración recomendados por el fabricante del Kit TANDEM-R-FER<sup>R</sup> (Hybritech Europe S.A.). En los 20 casos procedentes del Hospital "Príncipe de Asturias", el valor de ferritina sérica se determinó con un ensayo IMxFerritina de Abbott<sup>R</sup>, consistente en un inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA)<sup>57</sup> utilizando como sustrato fosfato de 4-metil-umbeliferona. En todos los casos, los resultados se expresaron en ng/mL, con los siguientes valores de referencia: varones 17-230 ng/mL, mujeres 14-150 ng/mL con método IRMA, y 27-300 ng/mL y 15-130 ng/mL, respectivamente, con método MEIA;

- la EPO se midió en todos los casos en muestras frescas de suero mediante un radioinmunoensayo competitivo<sup>63</sup> que utiliza eritropoyetina humana recombinante como trazador y standard, según procedimiento de aplicación del Kit EPO-Trac<sup>TM</sup> 125/RIA (INCSTAR Corporation). Los resultados se expresaron en mU/mL, con los siguientes valores de referencia: varones  $17,2 \pm 5,5$  mU/mL y mujeres  $18,8 \pm 6,2$  mU/mL.

La tabla II compendia estos valores normales.

### 3.8. Tratamiento estadístico

Será desglosado en los apartados correspondientes a control de calidad, estudio de la curva de distribución de los hematíes, según concentración de hemoglobina, análisis estadístico general aplicado a casos y controles, y evaluación de la eficacia estadística de las pruebas diagnósticas aplicadas.

#### 3.8.1. Control de calidad

La citometría de difracción de luz láser se sometió a los habituales controles de calidad internos y externos según el Programa de Control de Calidad Externo en Hematología (PCEH, Comité de Estandarización en Hematología, Asociación Española de Hematología y Hemoterapia), cuidándose asimismo la calibración del haz de luz láser con OTM (Optical Test Material). El control interno fue la única posibilidad de control de calidad aplicable a los parámetros derivados de la curva de distribución según concentración de hemoglobina, cuya precisión o reproducibilidad (grado de concordancia entre una serie de resultados obtenidos con el mismo método por repetición sobre una misma muestra) se calculó, siendo expresada como coeficiente de variación (CV)<sup>47</sup>.

También se realizó control de calidad del sistema utilizado para SDS-PAGE mediante el cálculo de precisión del método. La precisión o reproductibilidad intraensayo se obtuvo repitiendo una determinación sobre la misma muestra en el mismo ensayo, en el caso de los estromas eritrocitarios, llevando a cabo la electroforesis de una misma muestra aplicada varias veces en el mismo gel en placa. La precisión o reproductibilidad interensayo se calculó repitiendo el estudio de una misma muestra en varios ensayos sucesivos y con varias muestras; en nuestro supuesto se realizó SDS-PAGE de unas muestras determinadas en días y geles en placa distintos. Así la precisión intraensayo se evaluó sometiendo a un mismo control 10 veces a SDS-PAGE en el mismo día y ensayo, aprovechando los 10 pocillos para aplicación de la muestra de los geles en placa de trabajo, calculando a continuación los cocientes  $Sp/B3$ ,  $AnK/B3$  y  $B4/B3$  correspondientes a cada una de las 10 carreras obtenidas; estos valores fueron analizados estadísticamente, y se obtuvo su media aritmética ( $\bar{x}$ ), desviación standard (SD), CV e intervalo de confianza del 95% (IC 95%). La variabilidad interensayo se estudió sobre 15 controles, cada uno de los cuales fue sujeto de SDS-PAGE en dos días y ensayos distintos; una vez calculados los cocientes  $Sp/B3$ ,  $AnK/B3$  y  $B4/B3$  se analizaron estadísticamente sus resultados con comparaciones emparejadas entre medias<sup>67</sup> mediante el test de Student-Newman-Keuls de comparación múltiple de medias y el contraste t de Student, precedidos por el análisis de la varianza (ANOVA) F de Snedecor.

### 3.8.2. Estudio de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina

Se ha realizado en enfermos y progenitores de EH sin afectación familiar aparente, versus 140 controles con los parámetros % Hiper y valores de las áreas I, II y III bajo la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina obtenida por citometría de difracción de luz láser. Comprobada la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles aplicando contrastes no paramétricos (U de Mann-Whitney previo ANOVA H de Kruskal-Wallis), se estudió la eficacia diagnóstica del método definiendo su sensibilidad y especificidad respecto de los parámetros HC, % Hiper y Área II de la curva (elegida en función de su distribución de frecuencias, que apuntó una capacidad discriminativa superior al Área I). Se prescindió del Área III para este análisis

por ser prácticamente equivalente por su definición al % Hiper, parámetro éste obtenido directamente del citómetro con exactitud y precisión a diferencia del Area III bajo la curva de distribución referida, cuya medida con frecuencia resultó errónea por lo reducido de su superficie y por lo indirecto de su estimación.

### 3.8.3. Análisis estadístico general de casos y controles

Los datos fueron procesados por el Departamento de Bioestadística de la "Clínica Puerta de Hierro" (Madrid), con un ordenador MICROVAX II (digital) mediante un paquete informático BMDP standard <sup>42</sup>.

Los parámetros discretos o cualitativos se presentan en forma de distribuciones de frecuencias y las variables continuas se han tabulado ofreciendo la media aritmética, desviación típica y rango de valores de los datos de cada muestra.

A partir de estas cifras se ha realizado un contraste de Kolmogorov (muestras grandes) para verificar la normalidad de las poblaciones en cuento a la distribución de sus variables, prueba que calcula la diferencia entre los porcentajes acumulados correspondientes a los valores de la muestra y los respectivos al mismo valor en el supuesto de que la población fuera de distribución normal. La diferencia será tanto mayor cuanto más se aleje la distribución obtenida de la curva normal. Esta comprobación de normalidad tiene el objeto de disminuir el error asociado a las pruebas de comparación de medias y varianzas, que presuponen una distribución normal y de varianzas homogéneas (verificable mediante el ANOVA F de Snedecor) del parámetro estudiado. La aceptación de ambas hipótesis de normalidad y de homogeneidad de varianzas ha determinado la aplicación de contrastes paramétricos; el rechazo de la primera hipótesis o de la segunda (en caso de ser aceptada la primera) ha supuesto la realización de contrastes no paramétricos.

El estudio de los pacientes se ha realizado en dos partes: en primer lugar, los análisis intragrupo y en segundo los estudios intergrupo.

Los análisis intragrupo han consistido en la aplicación a todos los parámetros de la correlación lineal de Pearson y regresión mínimo cuadrática entre dos variables, con el cálculo de sus rectas de regresión lineal, según la ecuación  $y=ax+b$  (donde b es la pendiente de la recta y a el valor de y para  $b=0$ , punto en que la recta corta el eje y) y de sus co-

respondientes coeficientes de correlación  $r$ , cuya significación viene dada en función del error  $p$  que se pretenda y de los grados de libertad correspondientes a  $n-M$ , siendo  $n$  el número de casos y  $M$  el número de variables. Se habla de relación de dependencia o tendencia si  $r$  supera 0,5, relación cuya intensidad se acerca a la verdadera correlación cuanto más se aproxime el valor absoluto de  $r$  a 1, ya que  $r$  mide la intensidad de la relación si ésta es significativa y al menos una de las distribuciones ligadas es normal, condiciones no necesarias si la muestra es grande <sup>152</sup>.

Los análisis intergrupo se han realizado preferentemente mediante tests no paramétricos <sup>162</sup>, practicando comparaciones de medias según las pruebas  $U$  de Mann-Whitney para muestras con datos independientes y  $T$  de Wilcoxon para series con datos relacionados o apareados, previo ANOVA  $H$  de Kruskal-Wallis; estos contrastes se han aplicado cuando las distribuciones de las variables en las poblaciones no satisfacían la hipótesis de normalidad o, en caso de cumplirla, rechazaban la hipótesis de homogeneidad de varianzas. En los supuestos con aceptación de ambas hipótesis la comparación de medias se realizó mediante la prueba  $t$  de Student, precedida por el ANOVA  $F$  de Snedecor y el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls <sup>46,152</sup>.

Todos los tests se valoraron con dos colas y se consideraron estadísticamente significativos los resultados con niveles de significación  $p$  inferiores a 0,05.

#### 3.8.4. Evaluación de la eficacia estadística de las pruebas diagnósticas

Se estudió la eficacia en la detección de esferocitosis de los parámetros derivados de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina obtenida por citometría de difracción de luz láser aplicada al grupo de EH no esplenectomizadas por su expresión sin modificar de la enfermedad. Asimismo se evaluó la eficacia diagnóstica de los déficits parciales de espectrina y ankirina en la membrana eritrocitaria por medio de la SDS-PAGE aplicada a la EH.

La eficacia estadística se define como la capacidad de la prueba diagnóstica para indicar la presencia o ausencia de un determinado problema <sup>144</sup>. Se expresa estadísticamente en los siguientes cuatro índices <sup>62, 68, 144</sup>, cuyo valor máximo es 1 (ó 100%):

- la sensibilidad o probabilidad de que la prueba sea positiva en un sujeto enfermo,

- la especificidad, probabilidad de que el test sea negativo si el individuo no presenta tal problema,
- el valor predictivo del test positivo, o exactitud de la predicción positiva, que hace referencia a la probabilidad de estar afecto por la enfermedad si el test es positivo,
- el valor predictivo del test negativo o exactitud de la predicción negativa, como probabilidad de estar libre del problema si el test es negativo.

Los dos últimos índices no sólo dependen de los primeros sino también de la prevalencia de la entidad <sup>62,68,144</sup>.

Los valores de estos índices pueden estar distorsionados por el tipo de pacientes incluidos en el estudio y por los sesgos inherentes a la evaluación del resultado del test y de la situación de los sujetos respecto de la enfermedad <sup>144</sup>. Para descartarla es preciso que la prueba sea muy sensible, sensibilidad que ha de explorarse en un amplio rango de enfermos afectados por la entidad. De forma análoga, su diagnóstico requiere de un test de elevada especificidad probada en un extenso espectro de pacientes libres del problema <sup>144</sup>.

Por otra parte, cuando la prevalencia o probabilidad de tener una determinada enfermedad se desconoce, resulta adecuado completar el estudio de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas aplicadas con el estudio de su precisión o reproductibilidad y la descripción de los rangos de normalidad <sup>68</sup>, ya que la evaluación de sus valores predictivos es imposible sin dicha prevalencia <sup>62,68,144</sup>. Este es el caso de la EH, cuya prevalencia descrita de 1:5000 <sup>6,12,65,112,139,163,191</sup> muy probablemente subestima la realidad ante la frecuencia desconocida de casos leves o asintomáticos no detectados por los métodos diagnósticos convencionales <sup>64,140</sup>. Por ello el estudio de la eficacia estadística de los parámetros indicadores de esferocitosis y de los déficits parciales de espectrina y ankirina como medios diagnósticos de la EH ha incluido el análisis de la sensibilidad, especificidad, precisión y rango de normalidad exploradas en un amplio espectro clínico de la enfermedad, sobre todo respecto de su extremo leve, con un grupo control de sujetos sanos.

#### 4. RESULTADOS

Las abreviaturas de los parámetros analizados, las unidades y los valores de referencia se describen en la tabla II. Los datos de los 43 pacientes no esplenectomizados constan en la tabla IV (características clínicas y parámetros bioquímicos y de membrana) y tabla V (parámetros hematológicos); análoga información de los 19 pacientes esplenectomizados se especifica en las tablas VI y VII, y en las tablas VIII y IX se encuentran recopilados los correspondientes datos de los 12 progenitores de enfermos sin historia familiar de EH.

Los puntos básicos del análisis estadístico (media aritmética, desviación standard, intervalos de confianza y rangos de valores) se muestran en forma de tablas de medias. Así pues, la tabla X refleja tal análisis de los datos hemocitométricos y del estudio de la membrana eritrocitaria en los controles. Las tablas XII y XI exhiben, respectivamente, los estudios estadísticos básicos de los parámetros hematológicos y de los datos bioquímicos y estudio de la membrana eritrocitaria de los casos, incluyendo bajo esta denominación genérica tanto pacientes no esplenectomizados y esplenectomizados como progenitores de EH sin afectación familiar aparente.

#### 4.1. Estudio de los controles. Control de calidad

El análisis de los datos hematológicos de los casos (a excepción de la prueba de fragilidad osmótica) se realizó versus 140 controles, mientras que el estudio de los datos de la membrana eritrocitaria se llevó a cabo respecto de 24 controles. Tales controles siempre fueron sujetos adultos de ambos sexos, sin antecedentes patológicos significativos, cuya analítica formaba parte del estudio preoperatorio de una cirugía menor; 6 de los 140 controles habían sido esplenectomizados años antes por rotura traumática del bazo. Los datos de este colectivo control se hallan descritos en la tabla X.

Los parámetros hemocitométricos fueron objeto del control de calidad habitual tanto interno como externo (Programa de Control de Calidad Externo de Hematología, PCCEH, Comité de Estandarización en Hematología, Asociación Española de Hematología y Hemoterapia), siendo aquél el único factible en el caso de los parámetros derivados de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina, cuya precisión o reproductibilidad ha respondido a los valores considerados típi-

cos en la serie roja descritos previamente <sup>47,73</sup>, con CV por debajo de 2% para HC y CHCM. Por otra parte, la medida y cuantificación del Area III fue muy imprecisa debido al escaso número de hematíes con concentraciones de hemoglobina superiores a 40 g/dL y a la estimación indirecta del parámetro, por lo que se decidió su exclusión del análisis (véase Materiales y Métodos).

Desde el punto de vista de los parámetros de la membrana eritrocitaria, se definieron inicialmente como objeto del análisis los cocientes Sp/B3, Ank/B3 y B4/B3 (considerando globalmente la banda 4, dado que nuestro sistema nunca fue capaz de resolver netamente las bandas 4.1 y 4.2). El control de calidad de la técnica de SDS-PAGE aplicada demostró que es un procedimiento preciso y reproducible respecto de los cocientes Sp/B3 y Ank/B3. La variabilidad intraensayo fue muy pequeña, con CV de 7,6, 0,5 y 3,3% para Sp/B3, Ank/B3 y B4/B3, respectivamente. En cuanto a la reproductibilidad interensayo, las comparaciones emparejadas de medias mediante el contraste t de Student y análisis de la varianza (ANOVA) F de Snedecor no mostraron diferencias estadísticamente significativas para Sp/B3 (t 0,73; 14 g.l.) y Ank/B3 (t 1,64; 14 g.l.), con sendos CV inferiores a 6 y 4%; sin embargo, en el caso de B4/B3 existió diferencia estadísticamente significativa entre las determinaciones del parámetro (t 3,73; 14 g.l.) para  $p=0,002$ , por lo que consideramos que B4/B3 carecía de precisión o reproductibilidad interensayo y se prescindió de este dato en el análisis de enfermos y progenitores de EH sin afectación familiar aparente.

#### 4.2. Estudio de los enfermos

El rango de EDAD de los pacientes afectados de EH fue amplio, incluyendo desde los 4 meses a los 66 años, con una media aritmética de 23,03 años globalmente. Veinte enfermos no esplenectomizados eran menores de 15 años y 23 superaban esta edad; respecto de las 19 EH esplenectomizadas, 6 casos fueron menores y 13 mayores de 15 años (gráfica 1).

La representación de ambos SEXOS fue equilibrada en ambos grupos de pacientes, con una relación varón/mujer de 1 (gráfica 2).

Considerando la forma de herencia del defecto (gráfica 3), 53 casos eran de herencia dominante (36 EH no esplenectomizadas y 17 EH esplenectomizadas) y procedían de 21 familias; 7 enfermos carecían de historia familiar y el estudio familiar de sus ascendientes con metodología

convencional fue negativo, clasificándose como formas no dominantes (incluyendo 6 EH no esplenectomizadas y 1 EH esplenectomizada). En 2 enfermos, uno de ellos esplenectomizado, no fue posible llevar a cabo un estudio familiar.

Según el CURSO CLINICO de la EH se clasificaron los pacientes en tres categorías (gráfica 4). Se definió la categoría leve-asintomática como la integrada por aquellos 23 casos que nunca presentaron anemia ni reticulocitosis por encima de  $200 \times 10^9/L$ , ninguno de ellos había sufrido esplenectomía. De curso clínico moderado se consideraron las 31 EH, 15 de ellas esplenectomizadas, que padecieron anemia ocasional que no precisó transfusión y con reticulocitosis igual o superior a  $200 \times 10^9/L$ . Como formas graves se incluyeron aquellos 8 casos de EH con anemia hemolítica crónica, 4 de los cuales habían sido esplenectomizados.

Se eligió la ESPLENECTOMIA como cualidad definitiva y divisoria de dos grandes grupos de enfermos en nuestro estudio por el radical cambio que determina en la evolución de la EH al minimizar la hemólisis. Así pues, se han evaluado 43 enfermos no esplenectomizados y 19 pacientes esplenectomizados.

El análisis realizado se expondrá desglosándolo en los siguientes tres bloques: estudios intragrupo de los enfermos no esplenectomizados y esplenectomizados, y comparaciones intergrupo de ambos bloques de pacientes y entre ellos y el grupo control.

#### 4.2.1. Enfermos no esplenectomizados. Estudio intragrupo

En esta población de 43 sujetos ( $N=43$ ), el test de Kolmogorov rechazó la hipótesis de normalidad ( $p < 0,05$ ) de las variables continuas ferritina, haptoglobina, EPO y RGO incubada inicial, aceptándola en todas las demás. La aplicación de la correlación lineal de Pearson y regresión mínimo-cuadrática entre dos variables cuantitativas ha demostrado tendencias y correlaciones entre diversos parámetros, que se comentarán brevemente.

La edad se hallaba lógicamente relacionada con los valores hemocitométricos, como la cifra de hemoglobina (coeficiente de correlación  $r$  0,546;  $p < 0,001$ ), hematocrito ( $r$  0,590;  $p < 0,001$ ) y VCM ( $r$  0,536;  $p < 0,001$ ).

Los parámetros hemocitométricos exhibieron tendencias y correlaciones entre sí, en general esperadas dada su interrelación e interdependencia, que se describen a continuación:

- el número de hematíes mostraba correlación con las cifras de hemoglobina, hematocrito y RDW (con  $r$  de 0,842; 0,834 y -0,729, respectivamente, siempre con  $p < 0,001$ ),
- la cifra de hemoglobina presentó correlación con el hematocrito y HC (con sendos  $r$  de 0,961 y 0,636;  $p < 0,001$ ),
- el hematocrito con VCM ( $r$  0,574;  $p < 0,001$ ),
- la CHCM con HC y Área II (con  $r$  de 0,725 y 0,608;  $p < 0,001$ , gráficas 5 y 6),
- la HC con el % Hiper y con el Área II (sendas  $r$  de 0,829 y 0,826;  $p < 0,001$  siempre, gráficas 7 y 8), tratándose de verdaderas correlaciones significativas por ser parámetros definidos a partir de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina,
- el % Hiper exhibía una relación de tendencia con la cifra de reticulocitos y el Área II ( $r$  de 0,508 y 0,567;  $p < 0,001$ ),
- el RDW con la cifra de reticulocitos ( $r$  0,558;  $p < 0,001$ , gráfica 9).

Es un detalle importante a señalar que el % Hiper muestra correlación estadísticamente significativa con el parámetro HC y no con CHCM (gráfica 10), explicable por ser el CHCM un valor calculado a diferencia de HC, cuya medida es directa.

Los datos del estudio de RGO exhibieron las siguientes relaciones de tendencia entre sí y con datos hematológicos y bioquímicos:

- la RGO inmediata inicial con RDW (gráfica 11) haptoglobina y Área I (con  $r$  de 0,537; 0,515 y -0,525, respectivamente, con  $p < 0,001$ ),
- la RGO inmediata media con la RGO incubada inicial ( $r$  0,644;  $p < 0,001$ ),
- la RGO incubada inicial con RDW, reticulocitos, y RGO inmediata media (con sendos  $r$  de 0,518, 0,526 y 0,505, siempre con  $p < 0,001$ ),
- la RGO incubada media con % Hiper (gráfica 12) RDW (gráfica 13) reticulocitos (gráfica 14), haptoglobina, RGO inmediata inicial y media y RGO incubada inicial (con  $r$  correspondientes de 0,531, 0,603, 0,593, -0,529, 0,590, 0,547 y 0,797. con  $p < 0,001$  en todas ellas),
- la RGO incubada total con la RGO inmediata total ( $r$  0,525;  $p < 0,001$ ).

Estas relaciones descritas reflejan un vínculo entre la distribución de los hematíes según volumen y la prueba de fragilidad osmótica, que indica que las EH no esplenectomizadas poseen una población de hematíes heterogénea integrada por reticulocitos y células maduras de fragilidad osmótica variable, según su grado de condicionamiento esplénico. A este hecho puede atribuirse que la correlación esperada entre parámetros de esferocitosis (que solamente traducen la presencia de esferocitos en una muestra, sin aportar información sobre su causa) como HC y % Hiper y datos del estudio de fragilidad osmótica se limite a la relación de tendencia entre % Hiper y RGO incubada media, aunque de acuerdo con la observación de que las células hiperocrómicas son susceptibles a la hemólisis osmótica <sup>14, 137</sup>. La relación de la fragilidad osmótica con la haptoglobina resulta obvia al tratarse de un parámetro indirecto de hemólisis.

El análisis de los datos bioquímicos ha ofrecido relaciones de tendencia entre las siguientes variables:

- la cifra de bilirrubina total con RDW ( $r = 0,513$ ;  $p < 0,001$ ),
- el valor de ferritina sérica con VCM y HCM (con sendos  $r$  de  $0,513$  y  $0,536$ , con  $p < 0,001$  en ambos casos),
- la haptoglobina con el número de hematíes (gráfica 15), RDW, RGO inmediata inicial y RGO incubada media ( $r$  de  $0,688$ ,  $-0,517$ ,  $0,515$  y  $-0,529$ , siempre con  $p < 0,001$ ),
- la EPO con el número de hematíes, hemoglobina hematocrito y RDW (con  $r$  de  $-0,675$ ,  $-0,694$ ,  $-0,672$  y  $0,759$ , respectivamente, y  $p < 0,001$ , gráficas 16, 17, 18 y 19).

Ello traduce la relación entre parámetros de hemólisis y la consecuente eritropoyesis compensadora.

Los datos del estudio de la membrana eritrocitaria mediante SDS-PAGE no han mostrado asociaciones con otros valores según la correlación lineal de Pearson y regresión mínimo cuadrática entre variables.

Descrito el análisis de los datos cuantitativos, es esencial realizar mención especial al estudio de la variable GRAVEDAD, que siendo un parámetro discreto o cualitativo podría considerarse como una variable semicuantitativa. La correlación lineal de Pearson y regresión mínimo-cuadrática entre dos variables mostró relaciones de tendencia y correlación con los parámetros número de hematíes, hemoglobina, hematocrito, RDW, reti-

culocitos, bilirrubina total, EPO y RGO incubada media (con sendos  $r$  de -0,598, -0,530, -0,540, 0,761, 0,530, 0,595, 0,651 y 0,556, siempre con  $p < 0,001$ , gráficas 20 a 27) indicando la asociación entre el estado hemolítico y eritropoyesis compensadora, fragilidad osmótica y gravedad del curso clínico de la enfermedad.

Con el fin de estudiar el comportamiento de los parámetros asociados a esferocitosis respecto de la gravedad, se aplicó un contraste no paramétrico (U de Mann-Whitney para datos no emparejados, previo ANOVA H de Kruskal-Wallis) comparando las EH leves-asintomáticas versus las EH moderadas y graves globalmente, puesto que son solamente 4 los enfermos graves no esplenectomizados incluidos, número insuficiente para ser analizado de forma independiente. De este modo se constataron diferencias estadísticamente significativas respecto de las variables % Hiper, RDW, RGO inmediata inicial y EPO, con  $p < 0,001$ , y Área II, RGO inmediata media y Sp/B3, con  $p < 0,05$ , demostrando que estos parámetros se modifican de acuerdo con la gravedad de la EH (tabla XIII), cuya magnitud traducen.

El motivo de pormenorizar tan exhaustivamente este análisis intra-grupo radica en el hecho de que es en los enfermos no esplenectomizados en quien la EH se manifiesta fisiopatológicamente con plenitud. Ante el conjunto de datos comentado, hemos elaborado una clasificación de la entidad según su expresividad biológica (tabla XIV), en la que relacionamos los valores de los parámetros hematológicos, bioquímicos y del estudio de la membrana eritrocitaria por SDS-PAGE con la evolución clínica más común de cada una de las categorías de enfermos no esplenectomizados definidas por su gravedad.

#### 4.2.2. Enfermos esplenectomizados. Estudio intragrupo

En este colectivo de 19 pacientes (N=19), 15 de curso clínico moderado y 4 graves, se aplicó la correlación lineal de Pearson y regresión mínimo-cuadrática entre dos variables cuantitativas para analizar parámetros asociados a esferocitosis y datos de los estudios de fragilidad osmótica y de membrana eritrocitaria, observándose las siguientes relaciones de tendencia y correlación:

- la HC con RDW, % Hiper, Área II y RGO inmediata inicial (con  $r$  0,536, 0,904, 0,598 y 0,662 respectivamente, con  $p < 0,01$  en todas ellas

- excepto  $p < 0,001$  para la relación con % Hiper, gráficas 28, 29, 30 y 31),
- el % Hiper con RDW ( $r 0,710$ ;  $p < 0,001$ , gráfica 32) y RGO inmediata inicial ( $r 0,680$  y  $p < 0,01$ , gráfica 33),
  - el Area II con la RGO inmediata total ( $r 0,616$ ;  $p < 0,05$ ).

En este grupo de enfermos se pone de manifiesto la relación entre parámetros indicadores de esferocitosis, hemólisis y fragilidad osmótica, reflejando que las células más hipercrómicas son las más frágiles osmóticamente<sup>14,137</sup>. De forma análoga a las EH esplenectomizadas, los contenidos de la membrana eritrocitaria en espectrina y ankirina tampoco han presentado asociaciones estadísticas con otros parámetros.

Basándose en los estudios intragrupo de ambos bloques de enfermos, resulta importante señalar la naturaleza de las interacciones de la variable RDW, asociada en las EH no esplenectomizadas con la reticulocitosis y la RGO inmediata inicial e incubada media (ésta a su vez relacionada con el % Hiper), mientras que en las EH esplenectomizadas la asociación se produce con el % Hiper y la RGO inmediata inicial. Esto se debe a que en los enfermos no esplenectomizados la amplitud de la curva de distribución de los hematíes según volumen obedece a una población eritroide heterogénea a expensas de reticulocitosis y de células más o menos hiperchromas, según su grado de condicionamiento esplénico, cuya hemólisis osmótica puede facilitarse con un tratamiento de incubación que aproxime su volumen hemolítico crítico. En cambio, en los enfermos esplenectomizados, la amplitud de dicha distribución corresponde a una población de hematíes más homogénea por predominio de células hiperchromas osmóticamente frágiles, como se ha descrito previamente<sup>4,14,136,139</sup>. Tal efecto se produce, sin duda, en el grupo de EH no esplenectomizados, pero la reticulocitosis enmascara su repercusión en el estudio estadístico.

#### 4.2.3. Respuesta a la esplenectomía

De los 19 enfermos integrantes del grupo EH esplenectomizados, se dispuso en 11 casos (8 de curso clínico moderado y 3 graves) de parte de sus datos hemocitométricos previos a la esplenectomía, principalmente número de hematíes, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM, CHCM y cifra de reticulocitos (tabla XV). Con el fin de evaluar la respuesta terapéutica habida en estos 11 pacientes se aplicó un contraste no paramétrico T de Wilcoxon para datos emparejados (procedentes de un mismo gru-

po), que demostró diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,001$  entre los valores pre y post esplenectomía únicamente de las variables número de hematíes, hemoglobina y hematocrito (tabla XVI), hecho consistente con la afirmación de que la esplenectomía produce corrección de la anemia crónica o episódica. Cabe mencionar otros efectos, como la reducción de la reticulocitosis (sin diferencias estadísticamente significativas entre sus valores previos y posteriores a la esplenectomía) y del RDW (no analizado por disponer de sus cifras pre esplenectomía solamente en 3 casos).

#### 4.3. Enfermos y controles. Estudios intergrupos

La comparación de los pacientes no esplenectomizados y esplenectomizados entre sí y versus el grupo control se realizó mediante pruebas no paramétricas<sup>162</sup> aplicando el contraste U de Mann Whitney, datos no emparejados (precedido por el ANOVA H de Kruskal-Wallis) a los parámetros hemocitométricos y del estudio de la membrana eritrocitaria, únicas variables comunes con los controles; en la tabla XVII se detallan las diferencias halladas y su significación estadística. Estos resultados denotan varios hechos:

- los parámetros hemocitométricos y del estudio de la membrana eritrocitaria presentan diferencias estadísticamente significativas al cotejar los enfermos no esplenectomizados versus el grupo control,
- la esplenectomía produce resolución de la anemia crónica o episódica con reducción de la reticulocitosis y la normalización del RDW; la comparación entre pacientes no esplenectomizados y esplenectomizados de la misma gravedad (formas moderadas y graves) exhibe descensos del % Hiper, RDW, RGO incubada media y Area II ( $p < 0,05$  en todos los casos) como efectos de la esplenectomía al desaparecer el condicionamiento esplénico y reducirse la hemólisis,
- a pesar de la esplenectomía persisten las diferencias estadísticamente significativas entre las EH y el grupo control respecto de aquellas variables derivadas de la curva de distribución de los hematíes, según concentración de hemoglobina medida directamente: HC, % Hiper, Area y Area II, parámetros, por tanto, realmente indicadores de la existencia de esferocitosis en sangre periférica,
- los datos del estudio de la membrana eritrocitaria conservan sus diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control, independientemente de la esplenectomía, comportamiento lógico por el carácter de defecto estructural y genético de la EH.

Los parámetros hemocitométricos definidos a partir de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina estimada directamente mediante citometría de difracción de luz láser varían, dependiendo del curso clínico de la enfermedad o gravedad, y mantienen diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en el caso de los enfermos esplenectomizados, por lo que aparentemente permiten discriminar la existencia de esferocitosis, calidad morfológica en modo alguno patognomónica o exclusiva de la EH. La evaluación de la eficacia diagnóstica de estos parámetros y de esta tecnología en la EH se ha realizado en el grupo de enfermos no esplenectomizados, en quienes el defecto ofrece al completo su genuina fisiopatología (tabla XVIII).

La distribución de frecuencias de la variable HC (gráfica 34) muestra que en el 95% de los controles (133 de 140) es inferior a 35 g/dL, mientras que en un 72% de las EH (31 de 43) excede esta cifra, existiendo superposición de ambas distribuciones. La definición de 35 g/dL como el umbral de HC por encima del cual se sospecha esferocitosis, supone una especificidad de la prueba aceptable que se pierde sin mejoría sustancial de la sensibilidad si dicho punto de corte se desplaza a valores de HC menores de 35 g/dL. La medida de este parámetro resulta precisa o reproducible, con CV por debajo del 2%; su variabilidad dentro del grupo control fue discreta, con CV de 2,64%, algo mayor en el colectivo de EH no esplenectomizados, cuyo CV fue de 4,78%. HC constituye la media aritmética de las concentraciones corpusculares de un número de hematíes dado y proporciona una orientación global sobre la distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina, curva de la que derivan los parámetros comentados a continuación.

La distribución de frecuencias del parámetro % Hiper (gráfica 35) ha demostrado que aunque en las EH leves y asintomáticas puede ser inferior a 2%, en los controles es excepcional que supere esta cifra y nunca sobrepasa 3%. Considerando como nivel para la detección de esferocitosis valores de % Hiper mayores de 1,5, 2 y 3%, la sensibilidad diagnóstica de la prueba fue de 90,7, 79 y 62,8%, respectivamente, con sendas especificidades de 94,3, 98,6 y 100%. La precisión de la medida del % Hiper responde a un CV máximo de 30% (mayor cuanto más alta es la cantidad de hematíes con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL en la muestra estudiada) y su variabilidad dentro de los grupos control y EH no esplenectomizados ha obedecido a sendos CV de 67,4 y 100,4%.

Respecto de las áreas definidas en la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina (gráficas 36 y 37), con el fin de mejorar la utilidad diagnóstica del método, sobre todo en las EH leves y asintomáticas, la capacidad discriminativa del Área II es superior a la del Área I, según sus distribuciones de frecuencias, aunque con mayor solapamiento de enfermos y controles que con el parámetro % Hiper, siendo, por tanto, el Área II menos eficaz que él en la detección de esferocitosis. Al situar los puntos de corte para ello en Áreas II superiores a 9 y 10%, la sensibilidad diagnóstica de la técnica fue de 88,4 y 81,4%, con especificidad correspondiente de 91,4 y 90,7%. El estudio de la reproductibilidad o precisión del cálculo del Área II ofrece un CV medio del 11%, y la modificación del parámetro dentro de los grupos control y de enfermos no esplenectomizados ha tenido lugar según CV de 71,3 y 45,4%, respectivamente.

La combinación de % Hiper+Área II en la definición de la esferocitosis se traduce en una discreta reducción de la sensibilidad sin mejoría real de la especificidad; si esta combinación diagnóstica se considera como % Hiper y/o Área II se produce un aumento de sensibilidad con ligera disminución de especificidad.

El estudio de la membrana del hematíe en los enfermos mediante SDS-PAGE arroja un descenso de ambas variables Sp/B3 ( $\bar{x}$  0,990, SD 0,117) y Ank/B3 ( $\bar{x}$  0,195, SD 0,003) estadísticamente significativo respecto del control normal (tabla XVII) demostrativos de un déficit parcial de espectrina y anklrina de la membrana eritrocitaria en la EH.

La eficacia diagnóstica de dichos parámetros del estudio de la membrana eritrocitaria se describe también en la tabla VIII. Las distribuciones de frecuencias de los enfermos (considerados globalmente enfermos no esplenectomizados y esplenectomizados, ya que no se han apreciado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos respecto de estas variables) y controles respecto de los cocientes Sp/B3 (gráfica 38) y Ank/B3 (gráfica 39) exhibe notable superposición aunque resulta definitivo el hecho de que ningún control presenta Sp/B3 inferior a 1,04 ó Ank/B3 por debajo de 0,197. La medida de estas variables en nuestro sistema es precisa o reproducible, como se ha expuesto previamente (véase estudio de los controles y control de calidad), con una variabilidad en los grupos control y EH consideradas globalmente según CV de 4,7 y 11,85%,

respectivamente, para Sp/B3, y de 0,5 y 11,84%, a su vez, en el caso de Ank/B3. En cuanto a eficacia diagnóstica del método, la combinación de ambos parámetros en el sentido de detectar al menos un cociente defectivo supone una mejoría de la sensibilidad sin detrimento de la especificidad. El contenido proteico total de los estromas eritrocitarios estudiados obtenidos tanto de casos como de controles osciló entre 1 y 2 mg/mL.

Como dato adicional, el inmunoblot antiespectrina fue normal en todos los casos, descartando la fragmentación de esta proteína como causa de su déficit.

#### 4.4. Estudio de los progenitores de EH sin historia familiar

Este conjunto incluye seis parejas progenitoras de sendos casos de EH sin antecedentes familiares del defecto (enfermos con número de orden 1, 7, 8, 31, 41 y 58). El contraste de este grupo frente a las EH no esplenectomizadas mediante pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney precedido por el ANOVA H de Kruskal-Wallis) arroja diferencias estadísticamente significativas en todas las variables cuantitativas (hemoglobina, CHCM y Área I con  $p < 0,05$ ; número de hematíes, hematocrito, RDW, bilirrubina total, LDH, EPO, RGO inmediata inicial y media, Sp/B3 y Ank/B3 con  $p < 0,01$ , y HC, % Hiper, reticulocitos, Área II haptoglobina y los tres parámetros de la RGO incubada con  $p < 0,001$ ) excepto VCM, HCM, sideremia, ferritina y RGO inmediata total. Si esta comparación se realiza solamente versus las EH no esplenectomizadas de gravedad leve-asintomática, con quien el grupo de progenitores ofrece mayor similitud ante la escasa expresividad del defecto, continúan existiendo las diferencias estadísticamente significativas respecto de las variables número de hematíes, hematocrito, CHCM, LDH y Ank/B3 con  $p < 0,05$ ; HC, reticulocitos, haptoglobina, RGO incubada inicial y total y Sp/B3 con  $p < 0,01$  y % Hiper, Área II y RGO incubada media con  $p < 0,001$ .

El análisis no paramétrico de los progenitores frente al grupo control (tabla XVII) no pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas al valorar los parámetros hemocitométricos; en cambio, sí las presenta respecto de las variables del estudio de la membrana eritrocitaria mediante SDS-PAGE, con  $p < 0,01$  para ambas Sp/B3 y Ank/B3 a pesar de la superposición de sus distribuciones de frecuencias (gráficas 38 y 39) en progenitores y controles. Este hecho demuestra que en el grupo

de progenitores de EH sin afectación familiar aparente existe un pequeño grado de defecto no detectable por otros medios diferentes al SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria, sugiriendo que al menos uno de los miembros de cada pareja presenta una forma de EH asintomática e imperceptible por métodos diagnósticos convencionales e incluso por citometría de luz láser. Este hecho apunta la rareza de las verdaderas formas clínicas recesivas de la EH.

El perfil biológico de este colectivo se indica en la tabla XIV junto con análogos datos de las EH no esplenectomizadas clasificadas según la gravedad del curso clínico de la entidad.

## TABLAS

T A B L A I  
DEFECTOS MOLECULARES PRIMARIOS EN LA EH

Herencia	Defecto	Nombre	Prevalencia	Observaciones
Autosómico dominante	Déficit	HS Sp+ Ank+	Común	Asociado al gen de la ankirina
	Sp y Ank			
Autosómico recesiva	Sp $\beta$ IV	HS $\beta$ Sp-4.1	$\pm$ 10 % EH	Corregido "in vitro" por ags. reductores
	Déficit severo	HS Sp+ Ank+	Raro	Poikilocitosis
	Sp y Ank			
	Sp $\alpha$ II	Sp $\alpha$ II a	Raro	
	Déficit 4.2	HS 4.2+/4.2°	Raro (Occidente)	
	Banda 3		Raro	

Sp: Espectrina.

Ank: Ankirina.

T A B L A I I

ABREVIATURAS, UNIDADES Y VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARAMETROS CUANTITATIVOS

Nº	NOMBRE	ABREVIATURA	UNIDADES	VALORES DE REFERENCIA	
1	Número de hematíes	Htíes	$10^{12}/L$	V: $5,5 \pm 1$	M: $4,8 \pm 1$
2	Hemoglobina	Hb	g/dL	V: $15,5 \pm 2,5$	M: $14 \pm 2,5$
3	Hematocrito	HCT	%	V: $47 \pm 7$	M: $42 \pm 5$
4	Volumen corpuscular medio	VCM	fL	$86 \pm 10$	
5	Hemoglobina corpuscular media	HCM	pg	$29,5 \pm 2,5$	
6	Concentración Hb corpuscular media	CHCM	g/dL	$32,5 \pm 2,5$	
7	CHCM medido directamente	HC	g/dL	igual que CHCM	
8	% de hematíes con HC > 41 g/dL	% Hiper	%	$0,7 \pm 0,1$	
9	CV de la distribución según volumen	RDW	%	$13 \pm 1,5$	
10	Reticulocitos	Retic	$10^9/L$	100	
11	Resistencia globular osmótica	RGO	% ClNa	inmediata	incubada
	lisis inicial	RGO <sub>I</sub>		$0,53 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,05$
	lisis media (50% de lisis)	RGO <sub>50</sub>		$0,43 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,03$
	lisis total	RGO <sub>T</sub>		$0,17 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,07$
12	% hematíes con $35 \leq HC \leq 37,5$ g/dL	Area I	%	$18,76 \pm 1,7$	
13	% hematíes con $37,6 \leq HC \leq 40$ g/dL	Area II	%	$4,65 \pm 0,73$	

Los valores de referencia descritos son para sujetos adultos, para niños en referencia 110.

Los valores de referencia de % Hiper, Area I y Area II corresponden a los intervalos de confianza del 99% del grupo control.

CV: coeficiente de variación.

T A B L A I I (continuación)

ABREVIATURAS, UNIDADES Y VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARAMETROS CUANTITATIVOS

Nº	NOMBRE	ABREVIATURA	UNIDADES	VALORES DE REFERENCIA
14	Bilirrubina total	BT	mg/dL	0,2 - 1
15	Lactato deshidrogenasa	LDH	u/L	230 - 380
16	Sideremia	Fe	g/dL	37 - 158
17	Ferritina	Ferrit	ng/mL	V: 17 - 300      M: 14 - 150
18	Haptoglobina	Hp	mg/dL	13 - 163
19	Eritropoyetina	EPO	mu/mL	V: 17,2 <sub>±</sub> 5,5      M: 18,8 <sub>±</sub> 6,2
20	Contenido de la membrana eritrocitaria en espectrina	Sp/B3	-	1,128 <sub>±</sub> 0,031
21	Contenido de la membrana eritrocitaria en ankirina	Ank/B3	-	0,200 <sub>±</sub> 0,003

Los valores de referencia de Sp/B3 y Ank/B3 corresponden a los intervalos de confianza del 99% del grupo control.

T A B L A I I I

ABREVIATURAS Y CODIGOS DE LOS PARAMETROS CUALITATIVOS ESTUDIADOS

Nº	NOMBRE	ABREVIATURA	CODIGO
1	Sexo	-	V: varón M: mujer
2	Herencia	H	D: dominante ND: no dominante NS: desconocida
3	Gravedad clínica de la EH*	G	L: leve o asintomático M: gravedad moderada G: grave
4	Familia	F	una letra del alfabeto mayúscula o minúscula para cada familia
5	Acantocitos en sangre periférica	Ac	SI o NO
6	Esplenomegalia	Em	SI o NO
7	Coleditiasis	Clit	SI o NO
8	Inmunoblot antiespectrina	Iblot	N: normal AN: anormal

\* Véase texto.

T A B L A I V  
ENFERMOS NO ESPLENECTOMIZADOS. DATOS CLINICOS, BIOQUIMICOS Y DE MEMBRANA

NO	Edad	Sexo	B	G	F	Ca	Clil	BT	LDH	Fe	Ferril	Hp	EPO	Sp/B3	Ank/B3	Ibiot
1	13	M	ND	M	B	SI	NO	1,6	305	97	166,2	<5	59,99	0,954	0,193	N
3	31	V	D	M	E	SI	SI	6	213	93	413,9	<5	22,07	0,944	0,195	N
4	5	V	D	M	E	NO	NO	3,7	238	81	76	<5	47,09	1,115	0,191	N
5	0,4	V	D	L	G	NO	-	0,2	272	56	119,4	31,2	15,71	0,979	0,195	N
6	4	M	D	L	G	SI	-	0,5	210	126	66,6	114	7,49	0,952	0,192	N
7	4	V	ND	G	H	NO	NO	1,4	274	78	166,1	<5	77,2	0,975	0,195	N
8	3	M	ND	G	I	SI	NO	2	1067	100	90	84	204,49	0,979	0,195	N
9	6	V	D	M	J	SI	NO	0,6	245	88	135,9	<5	33,49	0,971	0,193	N
10	10	M	D	L	J	SI	NO	1,9	282	85	63	<5	21,38	0,994	0,198	N
11	44	V	D	M	J	-	-	2,7	138	156	903,5	43	68,89	1,132	0,199	N
12	46	V	D	L	J	NO	NO	1,8	161	221	1231,4	<5	31,47	0,998	0,191	N
14	4	M	D	L	K	SI	NO	1,1	305	79	24,7	<5	37,64	1,004	0,197	N
15	16	V	D	M	L	SI	NO	5,6	210	140	95,4	<5	62,91	1,013	0,205	N
16	13	V	D	M	L	SI	NO	3,2	328	87	84,1	<5	106,72	1,124	0,203	N
17	35	V	NS	M	M	SI	NO	1,9	157	114	423,9	-	54,41	1,002	0,194	N
18	3	V	D	L	N	NO	-	0,3	324	94	10,8	<5	13,33	0,986	0,195	N
19	25	M	D	L	N	NO	NO	1,5	160	91	178	<5	33,83	0,988	0,193	N
21	7	M	D	L	P	NO	NO	1,4	255	85	98,5	<5	72,60	0,968	0,191	N
22	33	M	ND	M	O	NO	NO	0,4	108	10	25,8	49	224,77	0,953	0,189	N
24	41	H	D	L	I	SI	NO	0,7	146	74	59,4	<5	55,58	0,996	0,194	N
25	45	V	D	L	I	NO	NO	0,5	66	97	412	99	9,98	0,997	0,194	N
27	27	M	D	L	G	NO	NO	0,5	131	89	30,2	81	7,04	1,000	0,191	N

Casos nos. 11 y 12 afectados de hepatopatía crónica.

T A B L A I V (continuación)  
ENFERMOS NO ESPLENECTOMIZADOS. DATOS CLINICOS, BIOQUIMICOS Y DE MEMBRANA

NR	Edad	Sexo	H	G	F	Em	Clit	BT	LDH	Fe	Ferrit	Hp	EPO	Sp/83	Ank/B3	Iblot
31	4	V	NO	G	W	SI	NO	5,5	125	109	46,2	<5	678,94	0,871	0,185	N
32	65	M	D	L	X	NO	SI	0,6	125	61	53,7	48,7	17,80	1,012	0,194	N
35	20	M	D	L	Z	NO	NO	0,6	340	136	46	113	8,98	1,130	0,199	N
36	46	V	D	M	Z	SI	SI	1,9	350	166	1124	20	41,01	0,981	0,197	N
37	6	M	D	M	Y	SI	NO	0,7	226	60	145,8	13,1	32	1,020	0,196	N
38	2	M	D	M	S	NO	-	0,5	459	82	12	<5	68,31	0,978	0,195	N
39	6	M	D	M	U	SI	NO	2,1	372	37	123,5	<5	79,48	0,934	0,192	N
48	29	V	D	L	D	NO	NO	0,5	277	154	127	131	4,42	1,033	0,198	N
49	28	M	D	L	D	NO	NO	0,4	334	88	63	163	8,45	1,019	0,195	N
58	5,6	M	NO	G	A	SI	NO	3,2	466	90	88,8	<5	412,03	0,995	0,194	N
59	54	V	D	L	C	NO	NO	0,5	132	115	187	70	31,97	1,049	0,198	N
60	16	M	D	L	C	SI	NO	1,3	112	127	18,1	73	19,74	1,049	0,200	N
61	21	V	D	L	C	NO	NO	0,9	236	178	42,4	87	23,25	1,001	0,198	N
62	6	M	D	L	D	NO	NO	0,6	562	142	20	45	6,19	1,152	0,195	N
63	12	V	D	L	D	NO	NO	0,9	391	117	35	23	7,23	1,194	0,195	N
65	2	M	D	L	F	NO	NO	0,3	618	111	18	50	6,41	1,090	0,196	N
68	17	V	D	M	R	SI	NO	5,3	493	128	112	<5	32,01	1,003	0,197	N
69	16	V	D	L	R	NO	NO	2,8	384	99	104	26	38,81	1,003	0,194	N
70	22	M	D	M	b	SI	NO	3,2	177	129	78,3	25	74,17	1,031	0,198	N
71	54	V	D	M	b	-	-	1,3	170	102	179,5	66	48,48	1,031	0,193	N
74	43	V	D	L	R	NO	NO	0,6	276	91	74	108	4,31	1,069	0,196	N

T A B L A V  
ENFERMOS NO ESPLENECTOMIZADOS. DATOS HEMATOLOGICOS

NO	Htias	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	HC	HIPER	RDW	Retic	RGO <sub>I</sub> ( I N M E D I A T A )			RGO <sub>I</sub> ( I N C U B A D A )			Ac	I	II
											RGO <sub>50</sub>	RGO <sub>I</sub>	RGO <sub>I</sub>	RGO <sub>50</sub>	RGO <sub>I</sub>				
1	4,16	11,1	33,6	80,8	26,8	33,1	37,9	23,9	17,7	203,8	0,65	0,50	0,30	0,90	0,69	0,50	NO	15,26	27,28
3	4,32	14,9	40,6	93,9	34,4	36,6	35,8	3,9	14,1	362,9	0,50	0,42	0,35	0,80	0,68	0,50	NO	28,88	18,17
4	3,24	9,9	27,6	85,2	30,5	35,8	37,5	9,7	17,6	505,4	0,50	0,42	0,30	0,80	0,75	0,60	NO	31,54	32,58
5	3,99	11,2	32,5	81,5	28,2	34,6	34,1	1,1	12,5	71,8	0,40	0,40	0,30	0,80	0,66	0,40	NO	25,38	9,93
6	5,21	13,8	40,5	77,6	26,4	34,0	33,5	1,1	12,9	109,4	0,55	0,51	0,40	0,90	0,67	0,55	NO	19,82	6,71
7	3,73	10,9	32,2	86,3	29,2	33,8	38,7	23,9	21,1	555,7	0,60	0,58	0,45	0,90	0,81	0,50	NO	20,19	21,91
8	4,25	10,9	29,6	69,7	25,7	36,9	39	28,8	21,8	1164,5	0,50	0,45	0,35	0,90	0,75	0,55	NO	19,96	21,94
9	3,91	12,2	34,7	88,8	31,2	55,1	34,7	3,6	15,9	304,9	0,65	0,53	0,40	0,90	0,75	0,45	NO	25,09	11,84
10	4,24	13,3	34,8	82,2	31,4	38,3	39,1	22,4	14,8	587,7	0,50	0,43	0,35	0,90	0,65	0,50	SI	12,58	27,08
11	4,30	15,5	43,6	101,4	36	35,5	36,6	6,6	15,8	253,7	0,55	0,47	0,40	0,90	0,73	0,50	NO	36,95	26,12
12	4,01	15,8	46,2	115,2	39,5	34,3	34,8	2,6	15,2	268,6	0,70	0,51	0,35	0,80	0,64	0,50	NO	26,09	7,98
14	4,17	13,5	36,5	87,6	32,3	36,9	37,1	11,5	14,2	417	0,65	0,49	0,35	0,90	0,72	0,55	NO	31,17	23,04
15	4,60	16,2	47,4	103,1	35,3	34,2	36,6	7,6	16,5	887,8	0,60	0,48	0,30	0,90	0,72	0,30	NO	32,76	22,26
16	3,72	11,9	34,9	93,9	32	34	35,5	5,5	19,9	561,7	0,65	0,50	0,30	0,90	0,72	0,30	NO	22,01	15,80
17	4,86	14,7	38,9	80,1	30,3	37,8	38,7	20,9	16,5	304,8	0,70	0,44	0,30	0,90	0,75	0,50	NO	26,44	27,76
18	4,11	12,1	33,2	80,6	29,4	36,5	37,8	8,8	13,4	73,9	0,45	0,42	0,30	0,90	0,65	0,45	NO	32,65	38,67
19	4,09	14,1	38,2	93,5	34,4	36,8	38	10,6	14,5	310,8	0,50	0,43	0,35	1,00	0,67	0,55	NO	29,58	37,42
21	4,34	11,7	33,7	77,5	26,9	34,7	36,2	8,9	17	143,2	0,55	0,51	0,20	0,90	0,73	0,45	NO	25,89	20,67
22	4,09	13,2	35,3	86,5	32,2	37,3	37,8	11,4	12,3	94,3	0,45	0,43	0,30	0,80	0,62	0,40	NO	35,71	25,88
24	3,71	11,8	39,9	107,8	31,8	29,5	32,5	0,5	16,4	44,2	0,80	0,49	0,35	0,90	0,64	0,45	NO	6,98	0,92
25	5,14	15,7	48,2	93,7	30,5	32,5	35,6	2,4	12,2	149,1	0,50	0,57	0,20	0,80	0,60	0,35	NO	32,14	11,62
27	4,26	12,6	37,7	88,6	29,6	35,4	33,9	0,8	12,2	93,7	0,55	0,49	0,20	0,70	0,62	0,35	NO	18,84	7,57

Casos nos. 11 y 12 afectados de hepato patía crónica.

T A B L A V (continuación)  
ENFERMOS NO ESPLENECTOMIZADOS. DATOS HEMATOLOGICOS

NO	Rtíes	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	HC	RÍPER	RDW	Retic	RGO <sub>I</sub>			RGO <sub>50</sub>			Ac	I	II
											( I M M E D I A T A )	( I N C U B A D A )							
31	2,72	6,5	19,9	73,3	23,8	32,5	32,8	3,5	27,7	625,6	0,70	0,55	0,30	0,90	0,73	0,45	NO	15,77	9
32	5,03	14	41,2	81,9	27,9	34,1	33,4	1,6	14,3	316,9	0,55	0,54	0,40	0,90	0,75	0,45	NO	14,86	7,60
35	5,56	16,6	50,5	90,8	29,8	32,8	34,7	1,6	13,7	83,4	0,45	0,43	0,35	0,70	0,59	0,50	NO	28,12	9,48
36	4,33	14,6	42	97	33,8	34,8	36,2	6,7	15,7	1021,9	0,50	0,46	0,40	0,90	0,68	0,55	NO	33,33	19,32
37	4,08	11,8	37,5	91,7	28,08	31,4	33,9	4,4	19,5	652,8	0,50	0,49	0,30	0,90	0,69	0,35	NO	16,89	14,34
38	4,38	11,9	32,3	73,8	27,2	36,9	38,1	23,6	18,9	490,2	0,60	0,48	0,35	0,90	0,81	0,60	SI	26,56	20,31
39	4,19	12,1	35,4	84,5	29,8	34,1	37,2	15,5	18,8	590,8	0,70	0,53	0,35	1,00	0,85	0,60	NO	21,75	23,99
48	5,42	15,7	46,8	86,4	29	33,6	35,3	1,7	12,3	130,1	0,45	0,44	0,40	0,70	0,60	0,50	NO	31,21	10,62
49	5	14,7	43,1	86,1	29,4	34,1	36,2	2,4	11,3	110	0,45	0,39	0,20	0,70	0,57	0,45	NO	46,95	13,34
58	2,14	5,6	18,1	84,4	26,2	31,0	33,7	3,9	27	173,3	0,55	0,46	0,30	0,80	0,66	0,45	NO	20,90	16,00
59	4,52	15,2	43,5	96,2	33,6	34,9	35,5	2,8	13	99,4	0,45	0,43	0,35	0,70	0,58	0,50	NO	27,21	13,63
60	4,32	14,9	42,3	98	34,6	35,3	35,8	2,9	12,7	142,5	0,45	0,43	0,35	0,70	0,57	0,50	NO	33,63	18,06
61	5,02	16,8	48,2	96	33,5	34,9	35,7	2,3	12,5	100,4	0,45	0,42	0,35	0,70	0,58	0,50	NO	35,46	16,37
62	4,32	12,5	34,8	80,6	28,8	35,7	36,2	4,4	12,3	90,7	0,40	0,38	0,30	0,65	0,50	0,45	NO	31,60	22,60
63	4,72	14,2	41,4	87,7	30,0	34,2	35,1	1,9	11,7	75,5	0,45	0,42	0,35	0,65	0,56	0,45	NO	33,52	12,56
65	4,68	13,3	38,2	81,7	28,4	34,7	34,6	1,6	12,3	79,56	0,45	0,48	0,30	0,70	0,53	0,40	NO	23,43	13,47
68	4,23	14,3	38,2	90,2	33,7	37,3	37,9	25,5	19,7	501,5	0,65	0,49	0,40	0,90	0,65	0,50	NO	18,31	18,83
69	4,14	13,7	37,4	90,4	33,1	36,6	36,8	13,5	16,6	144,9	0,55	0,45	0,35	0,90	0,65	0,50	NO	23,04	20,11
70	3,76	11,6	34,9	92,8	30,9	33,2	36,4	7,8	16	338,4	0,50	0,47	0,40	0,80	0,70	0,50	NO	27,98	23,09
71	4,46	14,1	42	94,2	31,7	33,6	35,7	5,1	14,6	151,6	0,55	0,46	0,40	0,90	0,68	0,55	NO	24,63	16,51
74	5,42	16,5	46,9	86,6	30,4	35,1	35,2	2,1	11,7	65	0,45	0,42	0,30	0,70	0,55	0,40	NO	26,60	13,33

T A B L A   Y   I  
 ENFERMOS ESPLENECTOMIZADOS. DATOS CLINICOS, BIOQUIMICOS Y DE MEMBRANA

NR	Edad	Sexo	H	G	F	Em	Clit	BT	LDH	Fe	Ferrit	Hp	EPO	Sp/83	Ank/83	Iblot
2	7,9	V	D	G	D	-	NO	0,6	479	102	89	64	10,3	0,871	0,195	N
13	39	V	D	M	K	-	SI	0,5	84	115	556,9	40	9,87	0,973	0,202	N
20	31	V	NS	M	O	-	NO	0,8	220	-	384,3	33,8	20,81	1,013	0,195	N
23	22	M	D	M	S	-	SI	0,5	153	150	75,7	186	28,49	0,935	0,193	N
26	45	M	D	G	L	-	NO	1,1	107	151	613,7	74,2	28,08	1,023	0,193	N
28	37	M	D	M	U	-	NO	1,1	149	228	341	60	21,60	0,941	0,195	N
29	9,11	V	D	M	V	-	NO	1,3	474	81	87	< 5	16,27	1,029	0,192	N
30	34	V	D	M	V	-	NO	3,2	951	114	704	< 5	26,19	1,064	0,193	N
33	66	V	D	M	Y	-	NO	0,7	141	173	944,2	86,8	19,87	0,935	0,193	N
34	34	M	D	M	Y	-	NO	0,6	204	-	94,8	51,8	22,91	0,910	0,191	N
40	30	M	D	G	a	-	-	0,5	304	79	97,3	81	21,83	0,879	0,190	N
41	12	V	NO	M	c	-	NO	0,5	196	76	70,5	87,6	20,49	0,942	0,188	N
42	36	V	D	M	d	-	NO	0,7	152	180	1920,9	67,5	14,59	0,987	0,200	N
43	9	M	D	M	d	-	NO	0,7	208	107	51,7	26,2	9,69	0,999	0,200	N
44	12	M	D	M	d	-	NO	0,6	192	119	37,2	22,4	8,80	0,965	0,197	N
45	12	M	D	G	a	-	NO	0,6	211	117	42,4	23	11,85	0,879	0,191	N
64	57	M	D	M	F	-	SI	0,6	392	83	9	166	21,21	1,072	0,195	N
66	27	M	D	M	F	-	SI	1,3	334	96	75	77	22,88	1,247	0,195	N
67	18	V	D	M	F	-	NO	1,9	319	135	76	68	22,88	1,062	0,194	N

T A B L A V I I  
ENFERMOS ESPLENECTOMIZADOS. DATOS HEMATOLOGICOS

NO	Hctes	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	HC	HIPER	RDW	Retic	RGO <sub>I</sub> RGO <sub>50</sub> RGO <sub>T</sub>			RGO <sub>I</sub> RGO <sub>50</sub> RGO <sub>T</sub>			Ac	I	II
											( I N M E D I A T A )			( I N C U B A D A )					
2	4,98	13	35,5	71,4	26,2	36,6	39,3	25,1	14,5	224,1	0,55	0,47	0,40	0,90	0,80	0,55	SI	20,85	30,39
13	5,03	15,6	44,2	87,9	31	35,2	36	2,8	11,7	145,8	-	-	-	0,90	0,80	0,45	SI	33,79	18,79
20	4,95	16,9	51,4	103,8	34,1	32,8	32,1	0,2	13,4	267,3	-	-	-	-	-	-	NO	6,50	2,26
23	4,87	15,1	41,3	84,9	31	36,6	36,8	5,7	12,5	41,7	0,55	0,48	0,40	0,90	0,75	0,55	SI	36,01	26,28
26	4,22	15	43,3	102,7	35,5	34,5	35,9	2	12	80,2	0,55	0,45	0,30	0,90	0,81	0,60	SI	37,18	13,90
28	4,78	15,9	45,5	95,2	33,2	34,9	36,1	3,5	12,2	248,5	0,60	0,54	0,40	1,00	0,95	0,45	SI	36,13	17,21
29	4,67	15,1	40,1	85,9	32,3	37,5	39,5	23,3	12,5	1004	0,80	0,49	0,30	1,00	0,80	0,45	NO	31,18	8,55
30	4,62	16,2	43	93,1	35,1	37,7	39,6	25,1	14,4	974,8	0,80	0,45	0,30	1,00	0,86	0,70	NO	31,66	8,76
33	5,13	16	47	91,7	31,3	34,1	34	0,6	10,9	287,3	0,50	0,43	0,30	0,90	0,80	0,50	SI	21,84	5,67
34	4,30	14,2	43,1	100,3	33	2,9	32,9	0,3	11,6	98,9	0,45	0,42	0,35	0,90	0,80	0,55	SI	13	2,65
40	4,68	14,1	40,2	85,8	30	35	35,2	2,4	12,9	84,2	0,55	0,49	0,30	0,90	0,81	0,35	NO	28,31	13,37
41	5,00	15,1	42,2	84,4	30,2	35,8	34,6	1,8	12,3	290	0,50	0,42	0,30	0,90	0,75	0,55	NO	27,45	9,99
42	4,79	15,2	46,3	96,6	31,7	32,9	33,4	0,5	12,6	148,5	0,65	0,49	0,40	0,80	0,67	0,45	NO	16,53	7,19
43	5,53	15,9	46,9	84,8	28,8	33,9	34,3	0,6	11,6	94,01	0,65	0,49	0,40	0,80	0,67	0,45	NO	27,65	8,14
44	5,23	15,2	45,6	87,2	29,1	33,3	33,9	0,4	12,5	146,4	0,45	0,40	0,35	0,90	0,75	0,50	NO	19,36	6,77
45	5,00	14,8	42,1	84,1	29,5	35,1	35,8	3,2	11,8	60	0,50	0,47	0,35	0,60	0,50	0,40	NO	28,78	18,48
64	4,85	14,5	42,5	87,7	29,9	34,1	35,4	3,9	13,2	160,1	0,55	0,48	0,35	0,90	0,78	0,55	SI	28,12	18,50
66	4,70	14,9	40,6	86,5	31,6	36,6	37,9	19	15,3	197,4	0,60	0,48	0,40	0,90	0,72	0,55	SI	24,86	21,43
67	5,98	17,3	48,7	81,5	28,9	35,5	37,1	9,3	13	257,1	0,50	0,47	0,40	0,80	0,67	0,50	SI	30,04	27,09

T A B L A V I I I  
 PROGENITORES EIL. DATOS BIOQUIMICOS Y DE MEMBRANA

NO	SEXO	F	BT	LDR	Fe	ferrit	Hp	CPO	Sp/B3	Ant/B3	Ib1ot
46	V	B	0,3	133	123	195,2	139	4,90	1,087	0,196	N
47	M	B	0,3	165	53	1,7	125	32,31	1,028	0,197	N
50	V	I	0,5	313	-	345	286	8,60	1,037	0,197	N
51	M	I	0,4	302	-	31	134	8,92	1,094	0,198	N
52	V	B	0,5	64	87	65,5	183	4,35	1,145	0,200	N
53	M	H	0,6	74	142	50,7	43	10,76	1,070	0,205	N
54	V	W	1,1	71	143	101,9	110	2,33	1,096	0,199	N
55	M	W	1,4	114	145	17,7	65	9,19	1,066	0,198	N
56	V	c	0,6	-	-	205,8	82,7	11,20	1,015	0,195	N
57	M	c	0,4	56	-	2,6	114	28,70	1,043	0,197	N
72	V	A	0,3	143	67	102,4	40	41,09	1,052	0,198	N
73	M	A	0,6	195	69	70,6	106	21,74	1,199	0,197	N

T A B L A I X  
PROGENITORES EH. DATOS HEMATOLOGICOS

NO	Ht <sub>ies</sub>	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	HC	HIPER	RDW	Retic	RGO <sub>I</sub> RGO <sub>50</sub> RGO <sub>I</sub>			RGO <sub>I</sub> RGO <sub>50</sub> RGO <sub>I</sub>			Ac	I	II
											( I N M E D I A T A )			( I N C U B A D A )					
46	5,83	15,6	46,1	79,1	26,7	33,8	34,6	1,4	13,6	34,9	0,45	0,43	0,35	0,70	0,52	0,40	-	30,64	9,06
47	4,79	13	40,1	83,7	27,2	32,4	32,9	0,4	15,2	14,4	0,50	0,43	0,30	0,65	0,50	0,35	NO	13,66	2,50
50	5,62	17,5	51	90,8	31,1	34,3	34,9	0,9	12,3	89,9	0,40	0,41	0,35	0,70	0,56	0,45	NO	28,43	7,75
51	4,92	14,9	43,6	88,6	30,2	34,1	34,3	0,5	12,1	137,7	0,40	0,39	0,30	0,65	0,55	0,35	NO	21,15	3,18
52	5,57	17,1	55,1	98,8	30,7	31,1	34,1	0,4	12,7	72,4	0,50	0,43	0,35	0,65	0,55	0,35	NO	19,11	3,18
53	5,15	15,6	47,8	92,9	30,3	32,6	35,1	1	12,5	87,5	0,50	0,45	0,30	0,70	0,57	0,45	NO	34,31	9,58
54	5,22	16,9	48,3	92,5	32,3	34,9	33,2	0,3	12,1	41,7	0,50	0,45	0,35	0,65	0,55	0,45	NO	16,51	3,13
55	4,20	14	39,6	83	31,2	35,4	33	0,2	11,7	8,4	0,45	0,43	0,30	0,65	0,53	0,35	NO	14,18	2,19
56	4,90	15,2	43,4	88,7	31,1	35,0	34,3	0,5	11,2	49	0,50	0,43	0,20	0,70	0,57	0,10	NO	31,24	5,84
57	4,04	11,5	35,5	87,9	28,5	32,5	30,6	0,1	14,8	101	0,45	0,42	0,10	0,70	0,56	0,20	NO	3,08	0
72	5,22	15,6	51,3	98,3	30	30,5	31,9	0,3	13,5	46,9	0,40	0,38	0,30	0,65	0,49	0,35	NO	5,23	1,19
73	4,67	14,1	47,5	101,6	30,2	29,8	31,4	0,2	13,1	18,7	0,40	0,38	0,30	0,65	0,50	0,40	NO	5,21	0,76

T A B L A X

CONTROLES (N = 140). DATOS HEMOCITOMETRICOS. TABLA DE MEDIAS

Parámetro	$\bar{x}$	SD	IC 95 %	IC 99 %	IC 99,9 %	Rango
Htíes	4,845	0,442	4,845 $\pm$ 0,074	4,845 $\pm$ 0,096	4,845 $\pm$ 0,120	5,98 - 3,77
Hb	14,445	1,259	14,445 $\pm$ 0,212	14,445 $\pm$ 0,275	14,445 $\pm$ 0,345	18,30 - 11,90
Hct	43,768	3,752	43,768 $\pm$ 0,634	43,768 $\pm$ 0,824	43,768 $\pm$ 1,033	53,70 - 35,00
VCM	90,476	4,075	90,476 $\pm$ 0,688	90,476 $\pm$ 0,894	90,476 $\pm$ 1,121	102,80 - 81,50
HCM	29,796	1,835	29,796 $\pm$ 0,254	29,796 $\pm$ 0,330	29,796 $\pm$ 0,414	33,30 - 17,10
CHCM	33,017	0,800	33,017 $\pm$ 0,136	33,017 $\pm$ 0,177	33,017 $\pm$ 0,222	35,30 - 30,70
HC	3,514	0,885	33,514 $\pm$ 0,150	33,514 $\pm$ 0,195	33,514 $\pm$ 0,244	35,80 - 30,50
Híper	0,699	0,471	0,699 $\pm$ 0,080	0,699 $\pm$ 0,104	0,699 $\pm$ 0,130	2,60 - 0,10
RDW	12,591	0,625	12,591 $\pm$ 0,106	12,591 $\pm$ 0,138	12,591 $\pm$ 0,173	15,80 - 11,30
Retic	53,141	39,836	53,141 $\pm$ 18,278	53,141 $\pm$ 23,761	53,141 $\pm$ 29,793	138,88 - 4,54
Area I	18,766	7,758	18,766 $\pm$ 1,312	18,766 $\pm$ 1,705	18,766 $\pm$ 2,138	42,14 - 3,39
Area II	4,653	3,318	4,653 $\pm$ 0,560	4,653 $\pm$ 0,728	4,653 $\pm$ 0,913	19,59 - 0

CONTROLES (N = 24). ESTUDIO DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA. TABLA DE MEDIAS

Sp/B3*	1,128	0,054	1,128 $\pm$ 0,023	1,128 $\pm$ 0,031	1,128 $\pm$ 0,041	1,242 - 1,043
Ank/B3*	0,200	0,001	0,200 $\pm$ 0,002	0,200 $\pm$ 0,003	0,200 $\pm$ 0,003	0,197 - 0,202

\* IC 95%, 99% y 99,9% corregidos con tablas de la distribución t de Student para 23 g.L.

T A B L A X I

CASOS. DATOS BIOQUIMICOS Y ESTUDIO DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA. TABLA DE MEDIAS

Parámetro	EN no esplenectomizadas (N = 43)		EN esplenectomizadas (N = 19)		Progenitores EN (N = 12)	
	Media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango
BT	1,702 $\pm$ 1,565	6,00 - 0,20	0,937 $\pm$ 0,662	3,2 - 0,50	0,583 $\pm$ 0,338	1,40 - 0,30
LDH	284,186 $\pm$ 175,666	1067,00 - 66,00	277,368 $\pm$ 110,494	951,00 - 84,00	148,182 $\pm$ 90,427	313,00 - 56,00
Fe	103,791 $\pm$ 37,773	221,00 - 10,00	123,882 $\pm$ 41,495	228,00 - 76,00	103,625 $\pm$ 38,711	145,00 - 53,00
Ferrit	178,440 $\pm$ 281,747	1231,40 - 10,80	330,032 $\pm$ 472,594	1920,90 - 9,00	99,175 $\pm$ 102,448	345,00 - 1,70
Hp	39,376 $\pm$ 43,132	163,00 - 5,00	64,489 $\pm$ 47,379	186,00 - 5,00	118,975 $\pm$ 66,859	286,00 - 40,00
EPO	67,728 $\pm$ 119,717	678,94 - 4,31	18,874 $\pm$ 6,338	28,49 - 8,80	15,341 $\pm$ 12,548	41,09 - 2,33
Sp/B3	1,015 $\pm$ 0,065	1,194 - 0,871	0,985 $\pm$ 0,089	1,247- 0,871	1,082 $\pm$ 0,049	1,199 - 1,015
Ank/B3	0,195 $\pm$ 0,004	0,205 - 0,185	0,192 $\pm$ 0,004	0,202- 0,190	0,198 $\pm$ 0,001	0,196 - 0,205

TABLA XII  
CASOS. DATOS HEMATOLOGICOS. TABLA DE MEDIAS

Parámetro	EH no esplenectomizadas (N = 43)		EH esplenectomizadas (N = 19)		Progenitores EH (N = 12)	
	Media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango
Htías	4,300 $\pm$ 0,658	5,56 - 2,14	4,911 $\pm$ 0,397	5,98 - 4,22	5,011 $\pm$ 0,543	5,83 - 4,04
Hb	13,205 $\pm$ 2,384	16,80 - 5,60	15,263 $\pm$ 0,996	17,30 - 13,00	15,083 $\pm$ 1,742	17,50 - 11,50
HCl	38,009 $\pm$ 6,868	50,50 - 18,10	43,658 $\pm$ 3,608	51,40 - 35,50	4,775 $\pm$ 5,597	55,10 - 35,50
VCM	88,363 $\pm$ 9,089	115,20 - 69,70	89,237 $\pm$ 7,929	103,80 - 71,40	86,742 $\pm$ 16,622	101,60 - 38,00
HCM	30,637 $\pm$ 0,479	39,50 - 23,80	31,174 $\pm$ 2,352	35,50 - 26,10	29,958 $\pm$ 1,672	32,30 - 26,70
CHCM	34,707 $\pm$ 1,867	38,30 - 29,50	35,000 $\pm$ 1,524	37,70 - 32,80	33,033 $\pm$ 1,853	35,40 - 29,80
HC	35,995 $\pm$ 1,723	39,10 - 32,50	35,779 $\pm$ 2,193	39,60 - 32,10	33,358 $\pm$ 1,453	35,10 - 30,60
% Hiper	8,295 $\pm$ 8,328	29,30 - 0,50	6,826 $\pm$ 8,998	25,10 - 0,20	0,517 $\pm$ 0,388	1,40 - 0,10
RDW	15,740 $\pm$ 3,794	27,70 - 11,30	12,679 $\pm$ 1,112	15,30 - 10,90	12,900 $\pm$ 1,205	15,20 - 11,20
Retic	312,888 $\pm$ 271,831	1164,50 - 44,25	253,184 $\pm$ 271,159	1004,05 - 41,67	58,568 $\pm$ 39,557	137,76 - 8,40
RGO <sub>I</sub> *	0,542 $\pm$ 0,096	0,80 - 0,40	0,569 $\pm$ 0,105	0,80 - 0,45	0,458 $\pm$ 0,051	0,55 - 0,40
RGO <sub>50</sub> *	0,467 $\pm$ 0,048	0,58 - 0,38	0,464 $\pm$ 0,035	0,54 - 0,40	0,419 $\pm$ 0,024	0,45 - 0,38
RGO <sub>I</sub> **	0,333 $\pm$ 0,059	0,45 - 0,20	0,350 $\pm$ 0,045	0,40 - 0,30	0,292 $\pm$ 0,073	0,35 - 0,10
RGO <sub>I</sub> **	0,833 $\pm$ 0,096	1,00 - 0,65	0,888 $\pm$ 0,093	1,00 - 0,60	0,671 $\pm$ 0,026	0,70 - 0,65
RGO <sub>50</sub> **	0,668 $\pm$ 0,078	0,85 - 0,50	0,766 $\pm$ 0,095	0,95 - 0,50	0,538 $\pm$ 0,029	0,57 - 0,49
RGO <sub>I</sub> **	0,473 $\pm$ 0,073	0,60 - 0,30	0,509 $\pm$ 0,081	0,70 - 0,35	0,350 $\pm$ 0,104	0,45 - 0,10
Area I	25,992 $\pm$ 7,642	46,95 - 6,98	26,276 $\pm$ 8,208	37,18 - 6,50	18,563 $\pm$ 10,880	34,31 - 3,08
Area II	18,040 $\pm$ 8,185	38,67 - 0,92	13,969 $\pm$ 8,374	30,39 - 2,26	3,976 $\pm$ 3,271	9,58 - 0

\* RGO inmediata.

\*\* RGO incubada.

T A B L A X I I I

ENFERMOS NO ESPLENECTOMIZADOS. ANALISIS RESPECTO DE LA VARIABLE GRAVEDAD

Parámetro	Leves - asintomáticos (N = 23)		Moderados y graves (N = 20)		Significación estadística
	$\bar{X} \pm SD$	Rango	$\bar{X} \pm SD$	Rango	
HC	35,570 $\pm$ 1,689	39,10 - 32,50	36,485 $\pm$ 1,670	39,00 - 32,80	NS
% Hiper	5,478 $\pm$ 6,628	23,60 - 0,50	11,535 $\pm$ 9,045	29,30 - 2,60	p = 0,001
RDW	13,735 $\pm$ 2,216	19,50 - 11,30	18,045 $\pm$ 3,958	27,70 - 12,30	p < 0,001
RG0 <sub>I</sub> inmediata	0,502 $\pm$ 0,090	0,80 - 0,40	0,587 $\pm$ 0,083	0,70 - 0,45	p = 0,001
RG0 <sub>50</sub>	0,453 $\pm$ 0,048	0,57 - 0,38	0,483 $\pm$ 0,044	0,58 - 0,42	p < 0,05
RG0 <sub>T</sub> "	0,324 $\pm$ 0,058	0,40 - 0,20	0,343 $\pm$ 0,050	0,45 - 0,20	NS
RG0 <sub>I</sub> incubada	0,796 $\pm$ 0,110	1,00 - 0,65	0,875 $\pm$ 0,055	1,00 - 0,80	p < 0,05
RG0 <sub>50</sub> "	0,627 $\pm$ 0,073	0,81 - 0,50	0,715 $\pm$ 0,056	0,85 - 0,62	p < 0,001
RG0 <sub>T</sub> "	0,465 $\pm$ 0,068	0,60 - 0,35	0,483 $\pm$ 0,080	0,60 - 0,30	NS
Area II	16,034 $\pm$ 9,175	38,67 - 0,92	20,347 $\pm$ 6,335	32,58 - 7,98	p < 0,05
Sp/B3	1,030 $\pm$ 0,060	1,19 - 0,95	0,996 $\pm$ 0,067	1,13 - 0,87	p < 0,05
Ank/B3	0,195 $\pm$ 0,005	0,200- 0,189	0,194 $\pm$ 0,005	0,205- 0,185	NS

T A B L A X I V

CLASIFICACION DE LA EH SEGUN SU EXPRESIVIDAD BIOLÓGICA

Parámetro	Progenitores EH sin afectación familiar	EH no esplenectomizadas		
		Leves - asintomáticas	Moderadas	Graves
Hb	Normal según edad	Normal según edad	15,0 - 11,9	5,6 - 10,9
HC	31,5 - 34,5	34,5 - 36,5	36,0 - 37,5	33,0 - 39,0
%	0,1 - 1,5	1,5 - 9,5	5,0 - 15,5	>15,5
RDW	11,8 - 14,0	12,5 - 15,0	15,0 - 18,0	>20,0
Reticulocitos	≤ 100	100,0 - 300,0	200,0 - 600,0	>600,0
Area II	1,0 - 7,0	10,0 - 20,0	16,5 - 26	9,0 - 22,0
BT	≤ 1,0	≤ 1,2	1,4 - 4,0	1,4 - 5,5
LDH	Normal	Normal a ligero aumento	Normal a moderado aumento	Normal a notable aumento
Hp	Normal	Normal a ligera disminución	Normal a notable disminución	Normal a notable disminución
EPO	Normal a ligero aumento	Normal a ligero aumento	Ligero a moderado aumento	Notable aumento
RG0 <sub>1</sub> inmediata	0,41 - 0,50	0,45 - 0,55	0,52 - 0,65	>0,58
RG0 <sub>50</sub> incubada	0,51 - 0,56	0,58 - 0,67	0,67 - 0,75	>0,74
Sp/B3*	91,5 - 97	87 - 94	84,5 - 93	<84
Ank/B3*	99 - 100	98	97,5	<97,5
Esplenectomía	Innecesaria	Innecesaria	15% necesaria en edad pediátrica	100% necesaria en edad pediátrica

\* Expresadas en % respecto del control.

T A B L A X V  
ENFERMOS ESPLENECTOMIZADOS, DATOS PRE Y POSTESPLENECTOMIA (N = 11)

Nº	EDAD	G	Htics		Hb		Hct		VCM		HCM		CHCM		HC		% Hiper		RDW		Retic	
			PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
2	7,9	G	3,18	4,98	9,30	13	24,6	35,5	77,3	71,4	29,2	26,1	37,8	36,6	36,8	39,3	14,7	25,1	17,4	14,5	222,6	224,1
13	39	M	4,35	5,05	13,4	15,6	39,2	44,2	90	87,9	31,4	31	34,3	35,2	-	36	-	2,8	-	11,7	478,5	145,9
20	31	M	3,97	4,95	13,5	16,9	42,5	51,4	107,2	103,8	34,1	34,10	31,8	32,8	-	32,1	-	0,2	11,5	13,4	412,9	267,3
26	45	G	2,83	4,22	8,8	15	24,9	43,3	87	102,7	32,6	35,5	32,6	34,5	-	35,9	-	2	-	12	204	80,2
29	9,11	M	3,91	4,67	13,4	15,1	33,2	40,1	85	85,9	34,2	32,3	40,2	37,5	-	39,5	-	23,3	16,8	12,5	259	1004,1
33	66	M	3,49	5,13	12	16	35,4	47	101,3	91,7	34,6	31,3	34,1	34,1	-	34	-	0,6	-	10,9	321	287,3
34	34	M	4,07	4,30	11,7	14,2	38,1	43,1	93,5	100,3	28,7	33	30,6	32,9	-	32,9	-	0,3	-	11,6	-	98,9
41	12	M	3,81	5,00	12,4	15,1	31	42,2	81,2	84,4	32,5	30,2	40	35,8	-	34,6	-	1,8	-	12,3	499	290
43	9	M	3,96	5,53	12,2	15,9	33,9	46,9	85,4	84,8	30,8	28,8	36	33,9	-	34,3	-	0,6	-	11,6	309	94,01
45	12	G	3,26	5,00	9,4	14,8	25	42,1	76,6	84,1	29	29,5	37,9	35,1	-	35,8	-	3,2	-	11,8	437	60
66	27	M	4,04	4,70	12	14,9	33,9	40,6	-	86,5	-	31,6	-	36,6	-	37,9	-	19	-	15,3	-	197,4

T A B L A X V I

ENFERMOS ESPLENECTOMIZADOS. RESPUESTA A LA ESPLENECTOMIA (N=11)

Parámetro	EI preesplenectomía		EI postesplenectomía		Significación estadística
	Media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango	
Ht/es	3,715 $\pm$ 0,462	4,35 - 2,83	4,865 $\pm$ 0,374	5,53 - 4,22	p < 0,001
Hb	11,645 $\pm$ 1,714	13,50 - 8,80	15,136 $\pm$ 1,014	16,90 - 13,00	p < 0,001
Hct	32,882 $\pm$ 6,051	42,50 - 24,60	43,309 $\pm$ 4,173	51,40 - 35,50	p < 0,001
VCM	88,450 $\pm$ 9,918	107,20 - 76,60	89,409 $\pm$ 9,641	103,80 - 71,40	NS
HCM	31,710 $\pm$ 2,244	34,60 - 28,70	31,218 $\pm$ 2,593	35,50 - 26,10	NS
CHCM	35,530 $\pm$ 3,385	4,20 - 30,60	35,000 $\pm$ 1,535	37,50 - 32,80	NS
RDW	15,233 $\pm$ 3,247	17,40 - 11,50	12,509 $\pm$ 1,351	15,30 - 10,90	-
Retic	349,220 $\pm$ 111,007	499,00 - 204,00	249,917 $\pm$ 264,247	1004,05 - 60,00	NS

T A B L A X V I I

CASOS Y CONTROLES. ESTUDIOS INTERGRUPO

Parámetro	EHNE vs. Control	EHE vs. Control	EINE vs. EIE	EHNE vs. EHE (gravedad similar)	Progenitores vs. Control
Htfes	$p < 0,001$	NS	$p < 0,001$	-	NS
Hb	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	-	NS
Hct	$p < 0,001$	NS	$p < 0,001$	-	NS
VCM	$p < 0,05$	NS	NS	-	NS
HCM	NS	$p < 0,05$	NS	-	NS
CHCM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	-	NS
HC	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	NS	NS
% Hiper	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	$p < 0,05$	NS
RDW	$p < 0,001$	NS	$p = 0,001$	$p < 0,05$	NS
Retic	$p < 0,001$	$p < 0,05$	NS	-	NS
Area I	$p < 0,001$	$p = 0,001$	NS	-	NS
Area II	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	$p < 0,05$	NS
Sp/B3	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	NS	$p < 0,01$
Ank/B3	$p < 0,01$	$p < 0,001$	NS	NS	$p < 0,001$

EHNE: EH no esplenectomizados.

EHE : EH esplenectomizados.

T A B L A X V I I I

CITOMETRIA POR DIFRACCION DE LASER. EFICACIA DIAGNOSTICA

	HC (g/dL)			% Hiper			Area II (%)		Area II 9 %			
	>35	>34,5	>34	>3	>2	>1,5	>10	>9	% Hiper > 2 + y/o	% Hiper > 2	% Hiper > 1,5 + y/o	% Hiper > 1,5
Sensibilidad (%)	72	81,4	83,7	62,8	79	90,7	81,4	88,4	74,4	90,7	83,7	93
Especificidad (%)	97,8	87,1	72,1	100	98,6	94,3	90,7	91,4	98,6	90,7	95,7	90

ESTUDIO DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA. EFICACIA DIAGNOSTICA

	Sp/B3		Ank/B3		Sp/B3 < 1,09 y/o
	< 1,09	< 1,04	< 0,198	< 0,197	Ank/B3 < 0,197
Sensibilidad (%)	88,7	77,4	79	72,5	95,1
Especificidad (%)	87,5	100	92	100	87,5

T A B L A X I X

## DEFICITS PARCIALES DE ESPECTRINA Y ANKIRINA EN LA EH

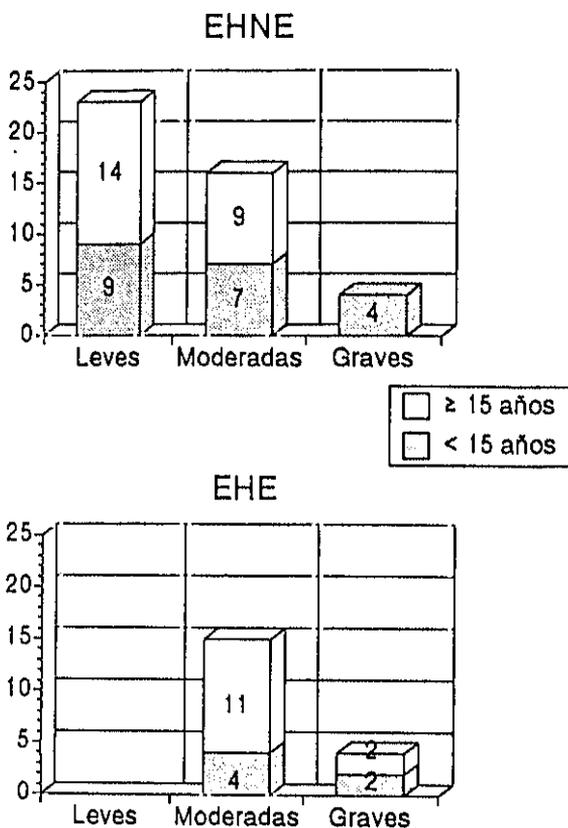
Autor	N	Sp/B3			Ank/B3		
		D (%)	ND (%)	P (%)	D (%)	ND (%)	P (%)
Agre y cols. (1986) <sup>4</sup>	43	63 - 81	30 - 74	97	pequeña reducción	-	-
Coetzer y cols. (1988) <sup>30</sup>	2 (12)	(83)	50 - 60	-	(92)	51 - 61	-
Costa y cols. (1990) <sup>36</sup>	19	82 - 90	-	-	87 - 98	-	-
Iolascon y cols. (1991) <sup>82</sup>	3	80	70 - 80	95 - 100	57	53 - 60	85 - 100
Nosotros	62	87,7	84,5	95,9	97	96,5	99

D: herencia dominante.

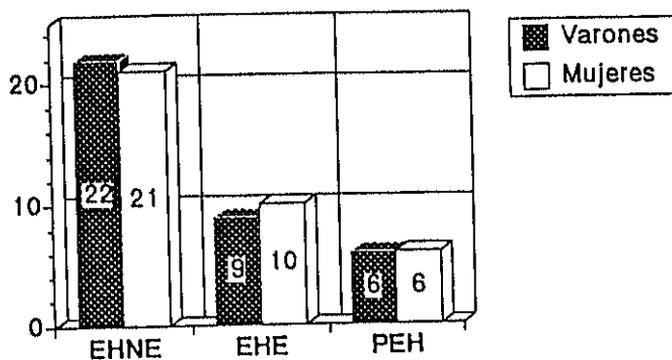
ND: herencia no dominante o sin historia familiar.

P: progenitores de EH sin historia familiar.

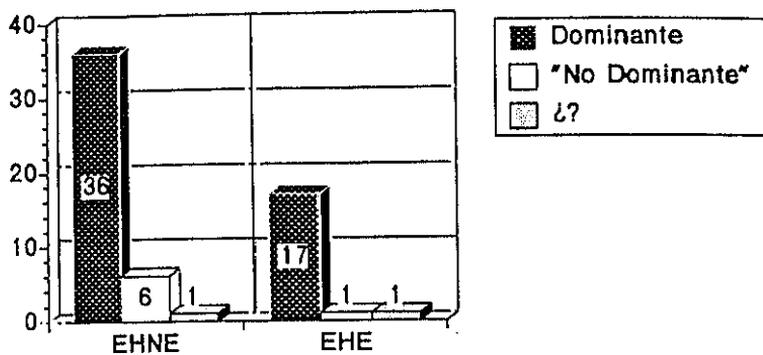
**GRAFICAS**



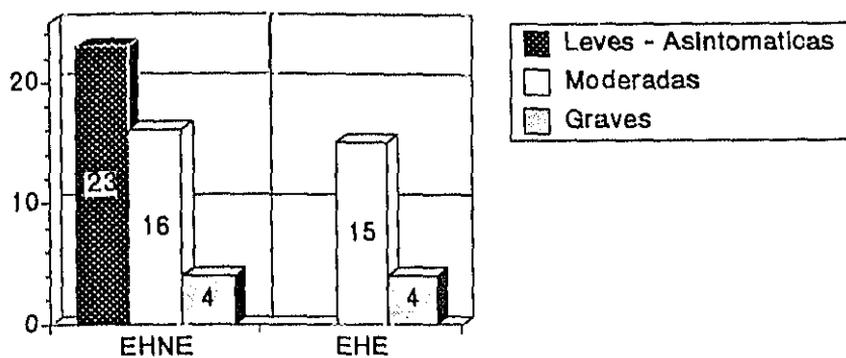
Gráfica 1.- Distribución de frecuencias. Variables edad y gravedad.



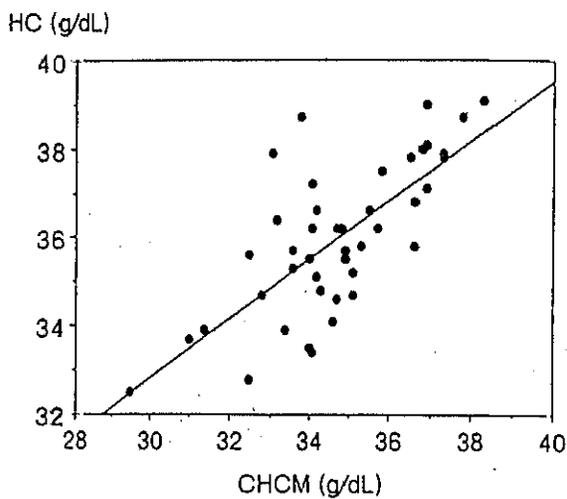
Gráfica 2.- Distribución de frecuencias. Variable sexo.



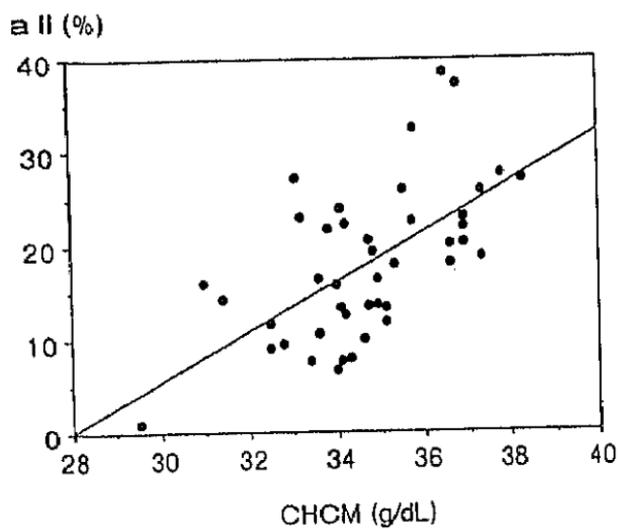
Gráfica 3.- Distribución de frecuencias. Variable herencia.



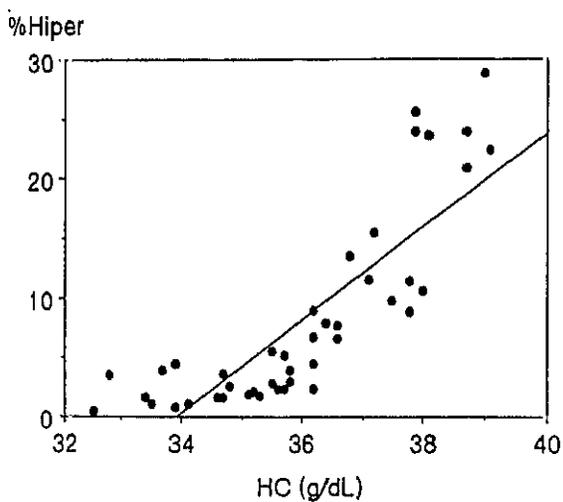
Gráfica 4.- Distribución de frecuencias. Variable gravedad.



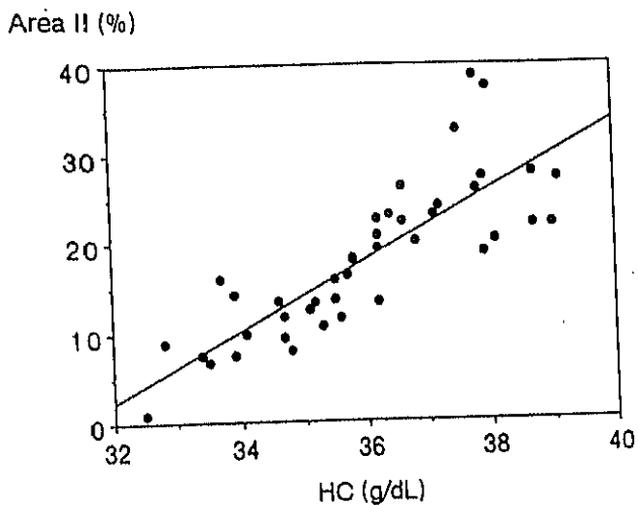
Gráfica 5.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables CHCM y HC. Ambos parámetros son la concentración de hemoglobina corpuscular media, calculada la CHCM y medida directamente la HC.



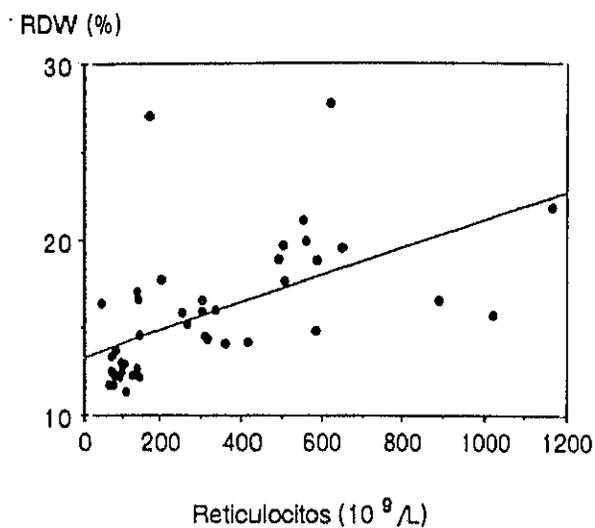
- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables CHCM y Area II.



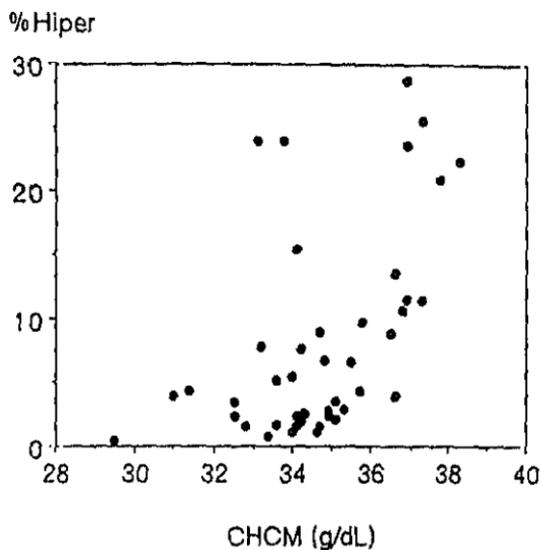
Gráfica 7.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y % Hiper, ambas derivadas de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina.



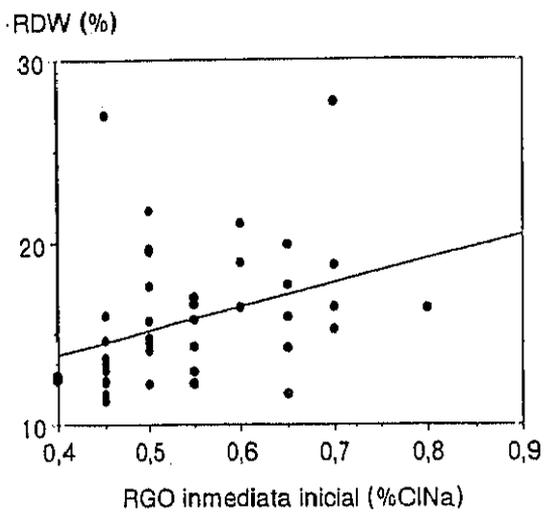
Gráfica B.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y Área II. Los dos parámetros proceden de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina.



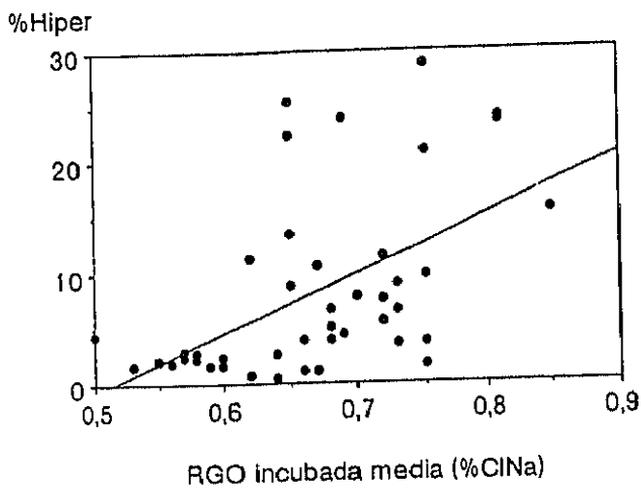
Gráfica 9.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables RDW y reticulocitos.



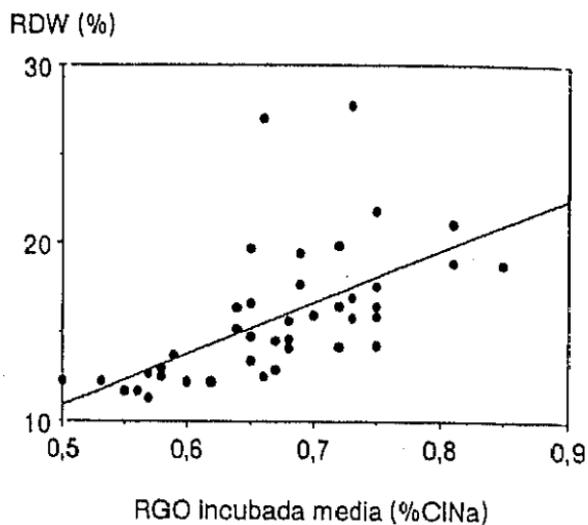
Gráfica 10.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables CHCM y % Hiper. No existe correlación significativa, ya que la CHCM es un valor calculado y no medido directamente.



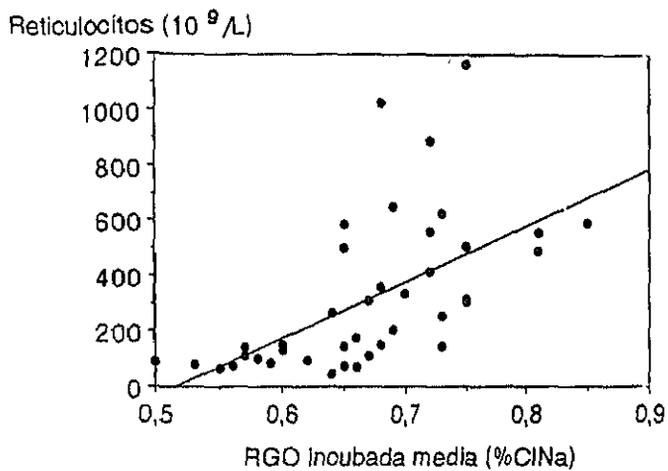
Gráfica 11.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables RGO inmediata inicial y RDW.



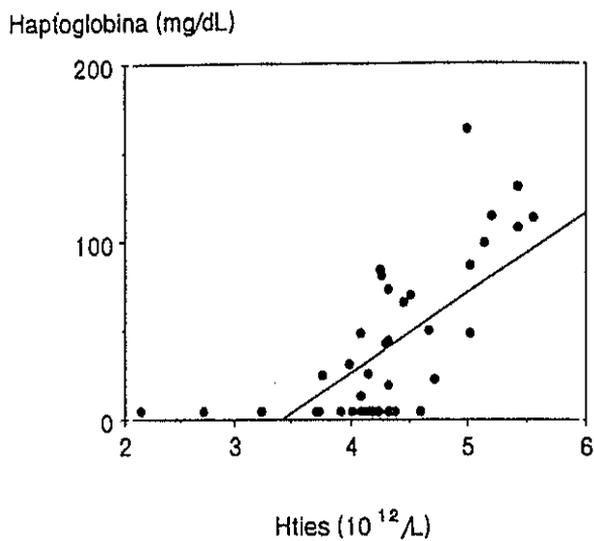
Gráfica 12.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables RGO incubada media y % Hiper.



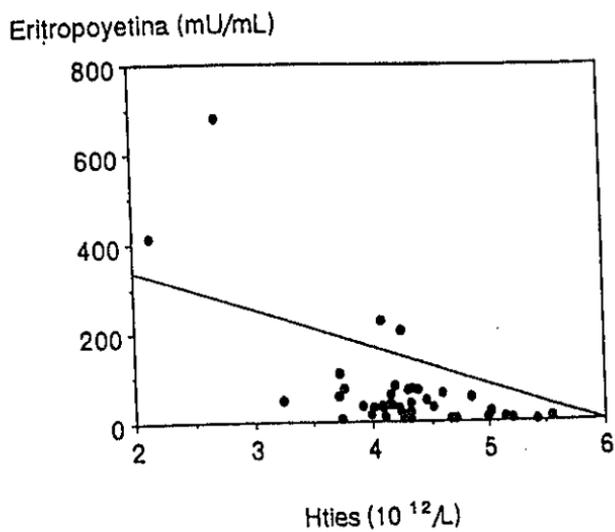
Gráfica 13.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables RGO incubada media y RDW.



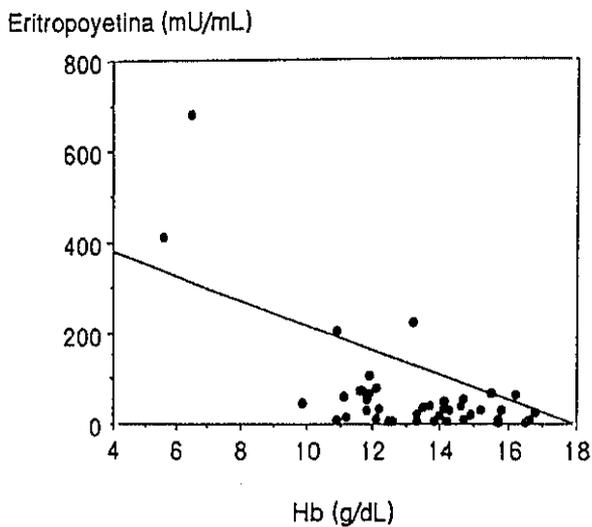
Gráfica 14.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables RGO incubada media y reticulocitos.



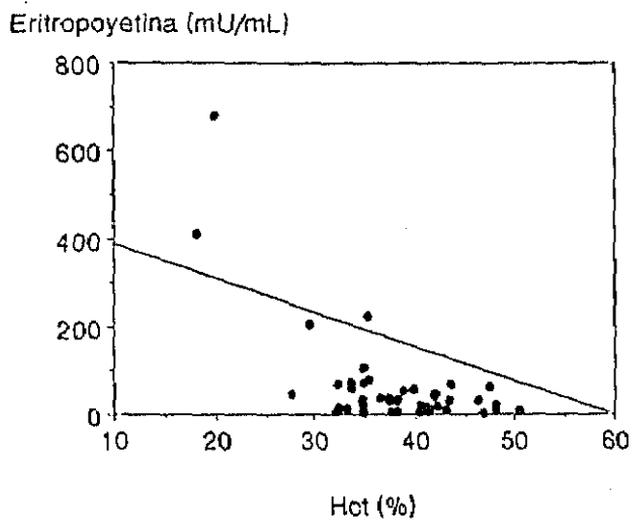
Gráfica 15.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables número de hematíes y haptoglobina.



Gráfica 16.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables eritropoyetina (EPO) y número de hematíes.

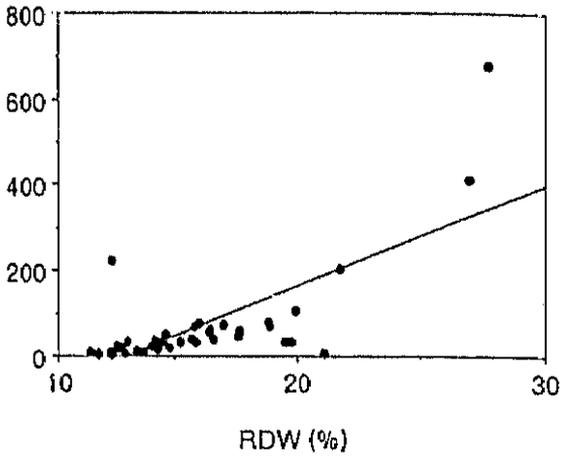


Gráfica 17.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables eritropoyetina (EPO) y hemoglobina.

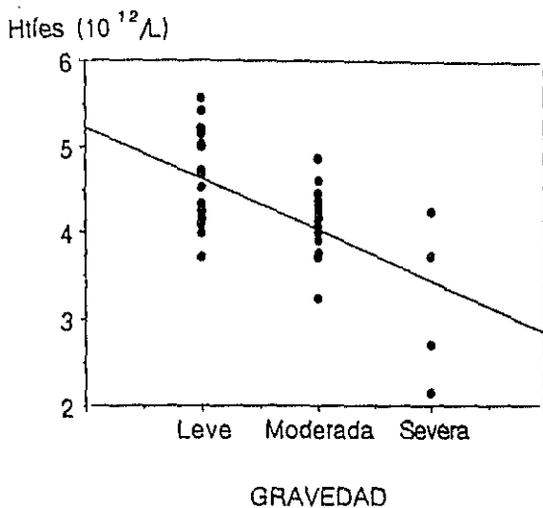


Gráfica 18.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables eritropoyetina (EPO) y hematocrito.

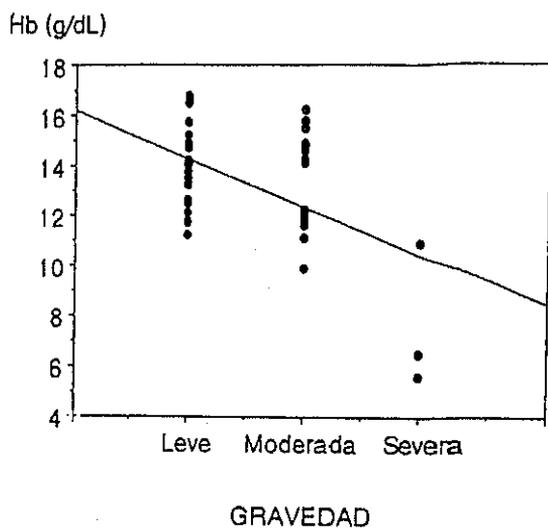
Eritropoyetina (mU/mL)



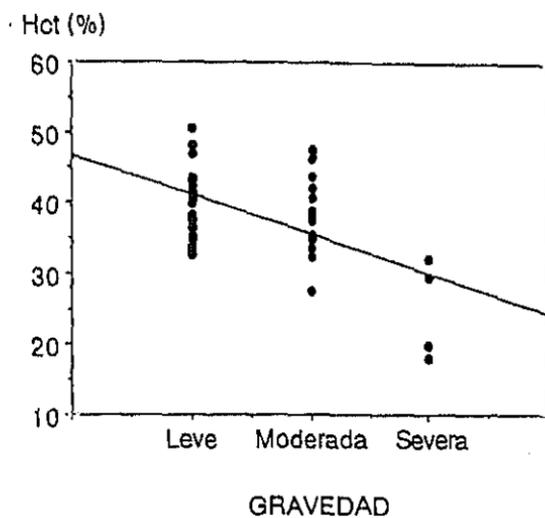
Gráfica 19.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables eritropoyetina (EPO) y RDW.



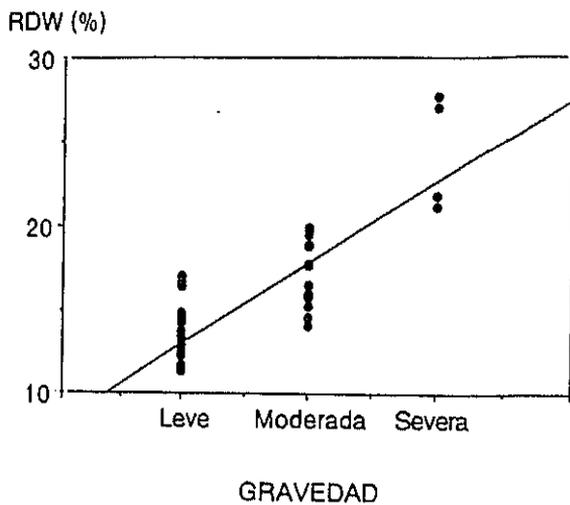
Gráfica 20.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y número de hifas.



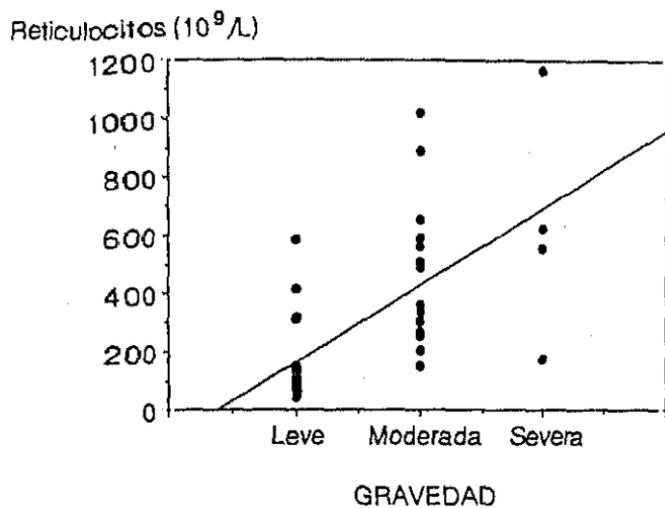
Gráfica 21.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y hemoglobina.



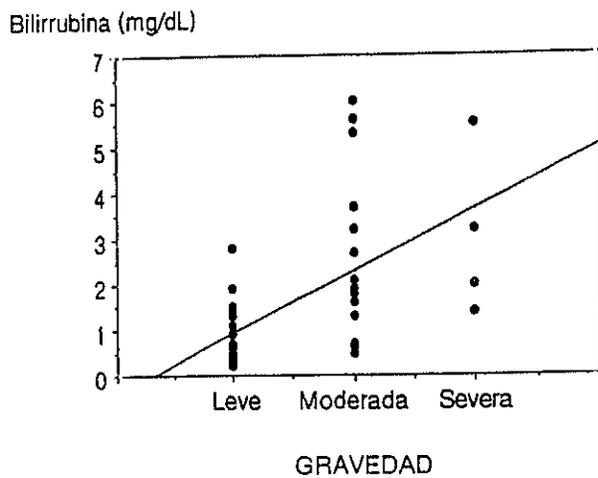
Gráfica 22.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y hematocrito.



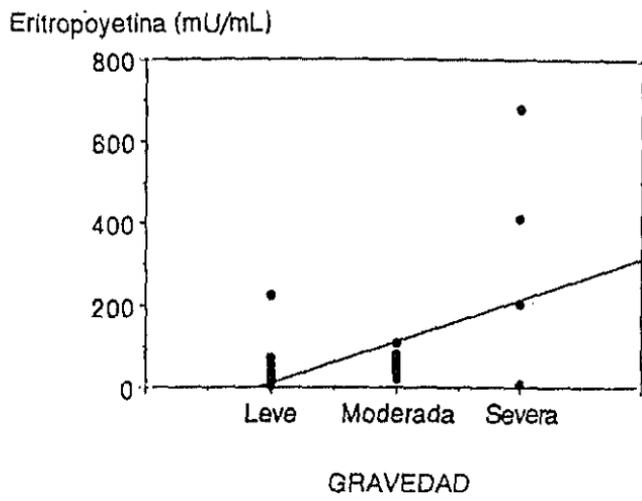
Gráfica 23.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y RDW.



Gráfica 24.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y reticulocitos.

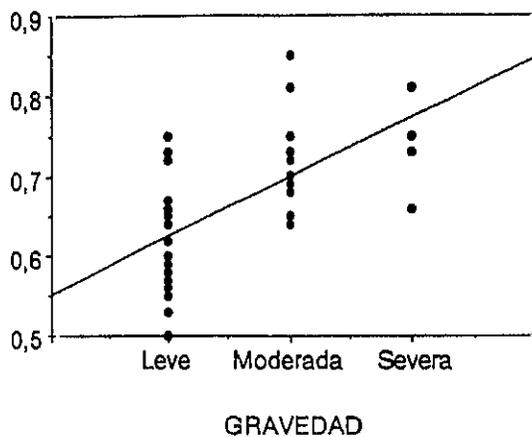


Gráfica 25.- enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y bilirrubina total.

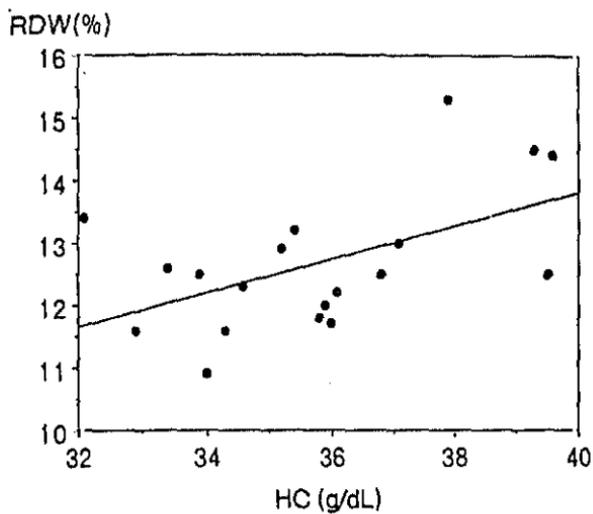


Gráfica 26.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y eritropoyetina (EPO).

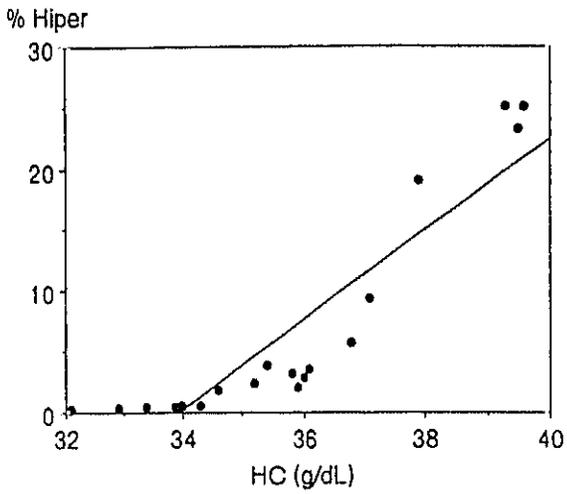
RGO incubada media (%CINa)



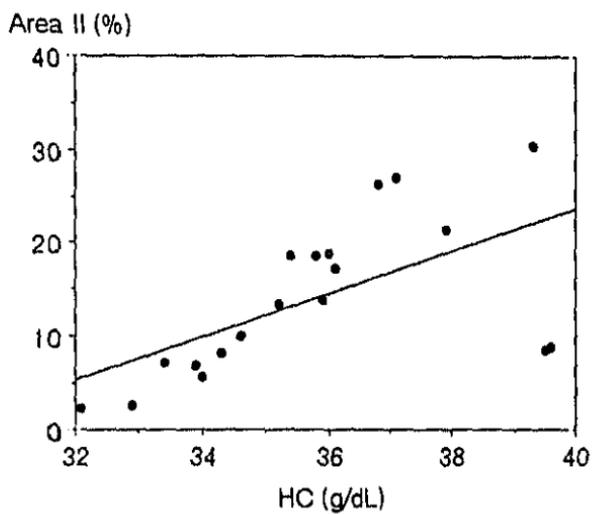
Gráfica 27.- Enfermos no esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables gravedad y RGO incubada media.



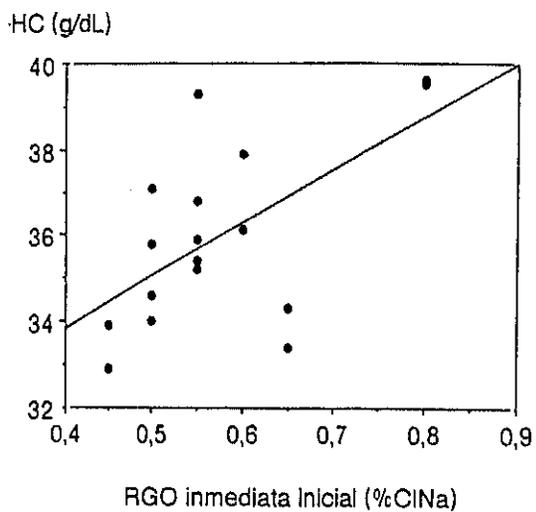
Gráfica 28.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y RDW. Tras la esplenectomía, al reducirse la reticulocitosis, se manifiesta la relación entre la amplitud de la distribución de los hematocitos según volumen y la esferocitosis.



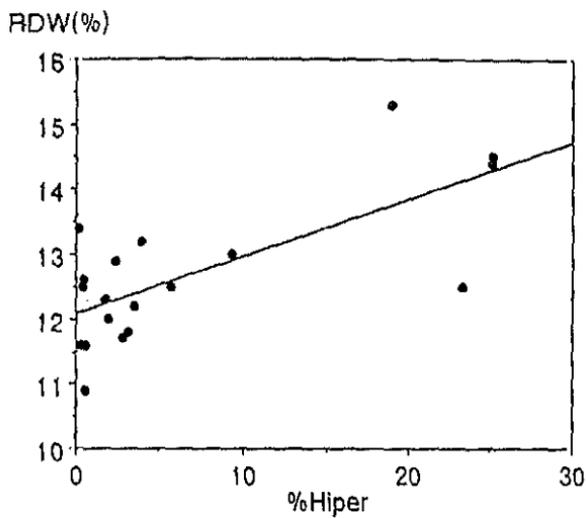
Gráfica 29.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y % Hiper.



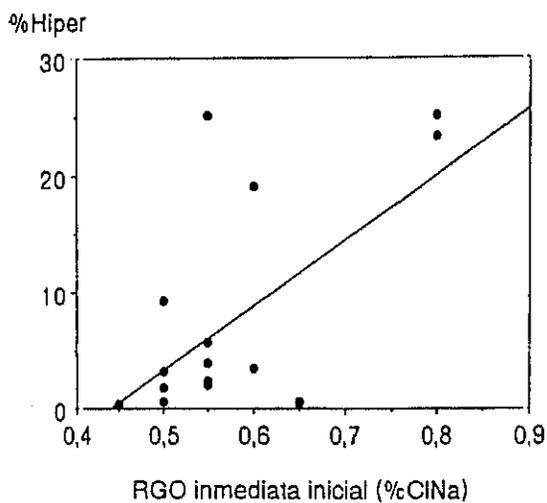
Gráfica 30.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y Area II.



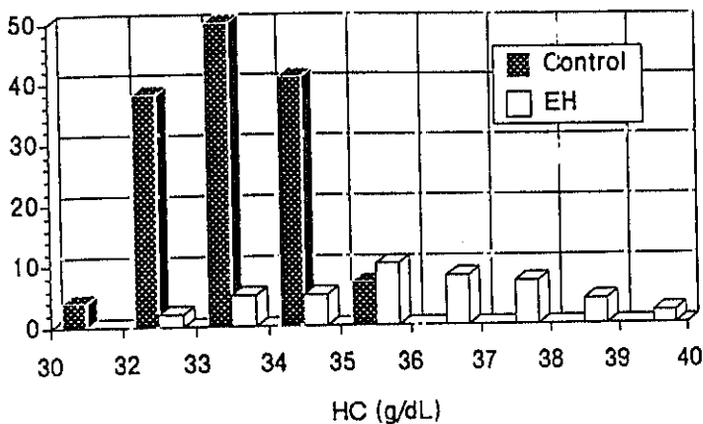
Gráfica 31.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables HC y RGO inmediata inicial.



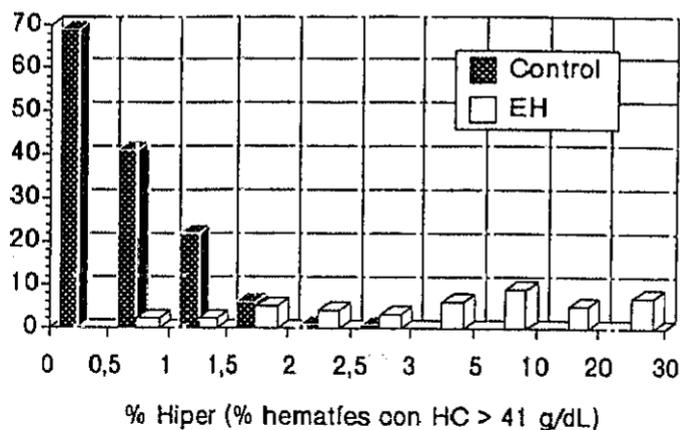
Gráfica 32.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables % Hiper y RDW.



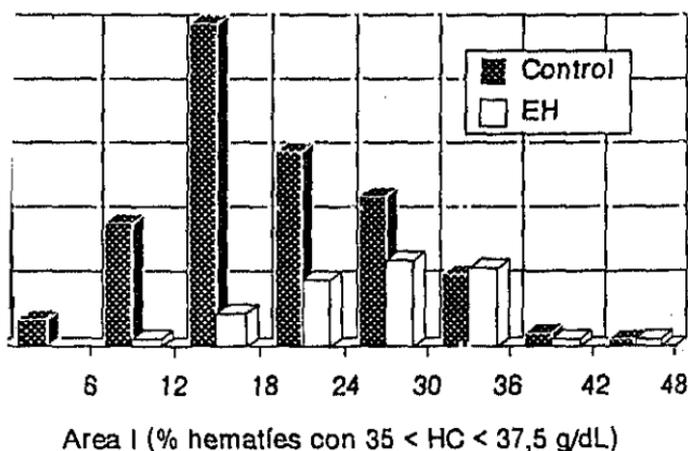
Gráfica 33.- Enfermos esplenectomizados. Gráfica de correlación lineal, variables % Hiper y RGO inmediata inicial.



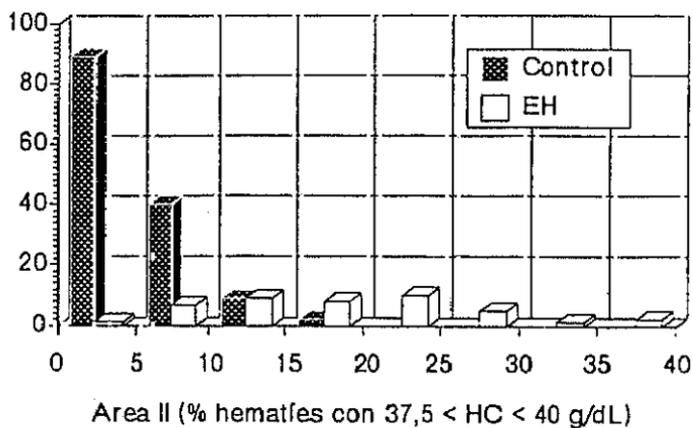
Gráfica 34.- Enfermos no esplenectomizados y controles. Distribución de frecuencias, variable HC. El 95% de los controles mostraron HC inferiores a 35 g/dl y superiores a esta cifra el 72% de los EH. La situación del umbral para la detección de esferocitosis en 34,5 - 35 g/dl supone una aceptable eficacia diagnóstica.



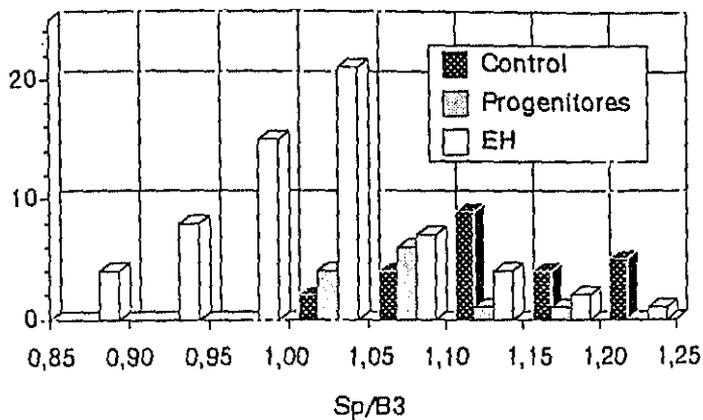
Gráfica 35.- Enfermos no esplenectomizados y controles. Distribución de frecuencias, variable % Hiper. La ubicación del punto de corte para el diagnóstico de esferocitosis en % Hiper 1,5 - 2% ha demostrado una excelente eficacia estadística de la prueba.



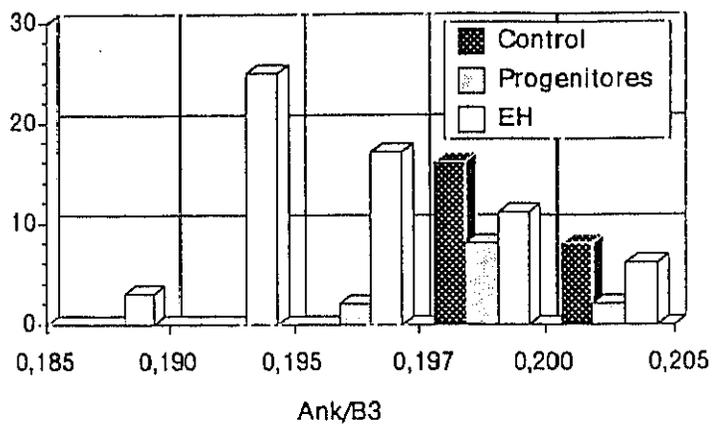
- 36.- Enfermos no esplenectomizados y controles. Distribución de frecuencias, variable Area I. La superposición entre pacientes y controles determina que la capacidad discriminativa de esferocitosis de este parámetro sea pobre.



Gráfica 37.- Enfermos no esplenectomizados y controles. Distribución de frecuencias, variable Area II. La definición del umbral para la detección de esferocitosis en % proporciona una buena eficacia diagnóstica.



Gráfica 38.- Enfermos progenitores y controles. Distribución de frecuencias, variable Sp/B3.



Gráfica 39.- Enfermos, progenitores y controles. Distribución de frecuencias, variable Ank/B3.

ARBOLES GENEALOGICOS

## C O D I G O S



Varón, normal



Mujer, normal



Varón, no estudiado



Mujer, no estudiada



Varón, EH



Mujer, EH



Varón, EH y esplenectomizado



Mujer, EH y esplenectomizada

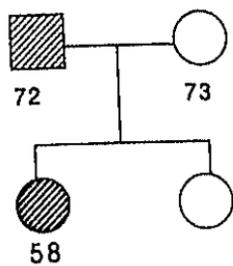


Progenitor, déficit parcial de espectrina ± ankirina

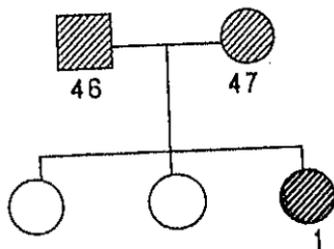


Progenitora, déficit parcial de espectrina ± ankirina

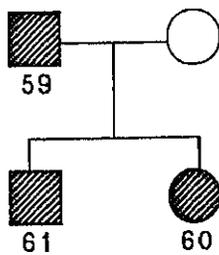
Las cifras corresponden al número de orden de cada caso.



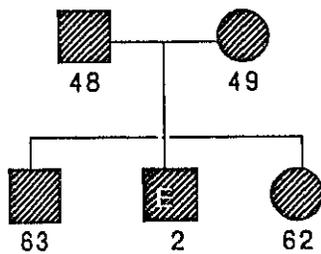
Familia A



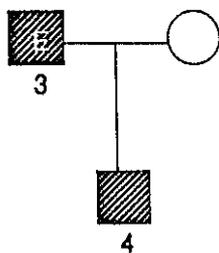
Familia B



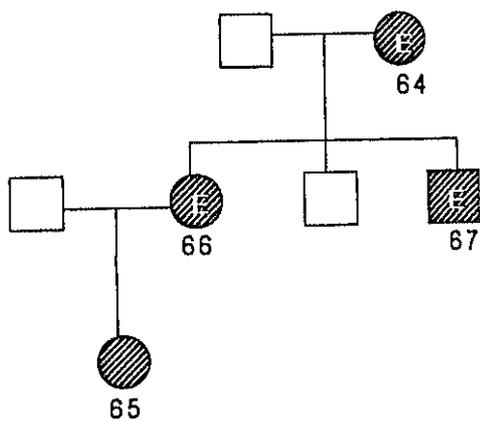
Familia C



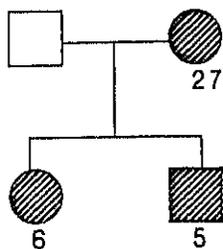
Familia D



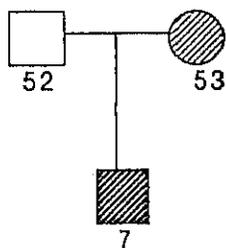
Familia E



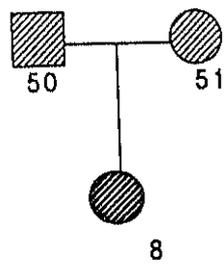
Familia F



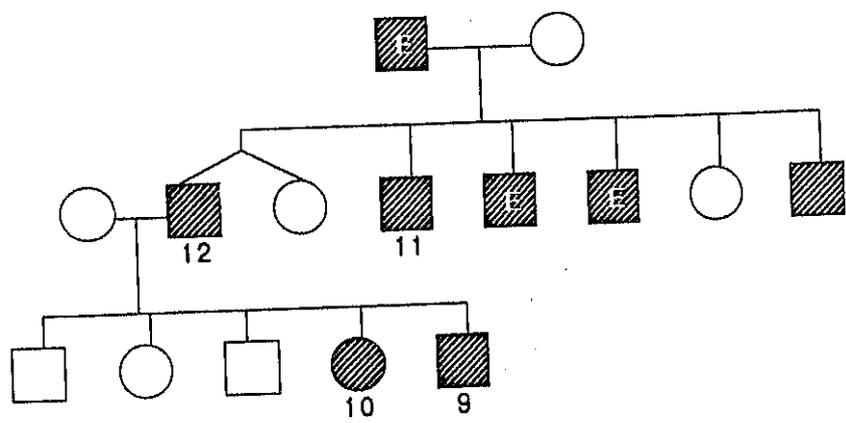
Familia G



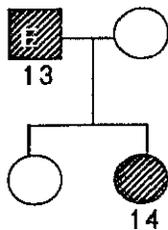
Familia H



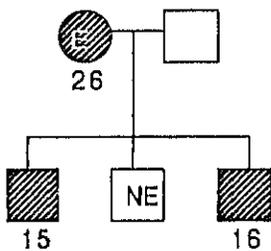
Familla I



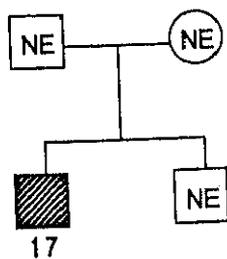
Familla J



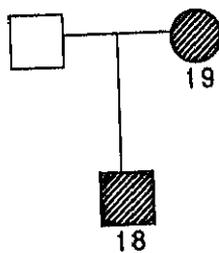
Familia K



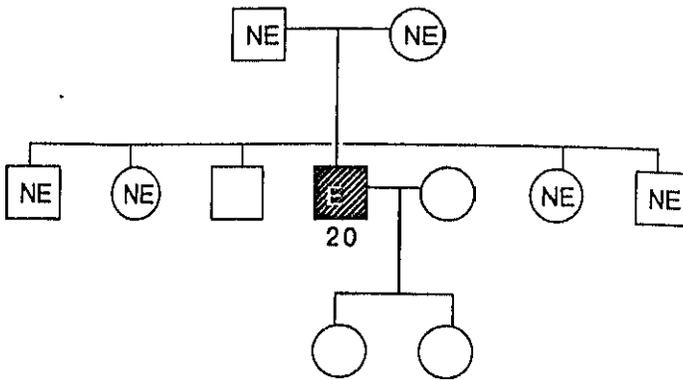
Familia L



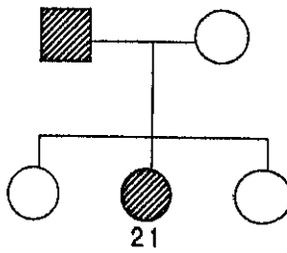
Familia M



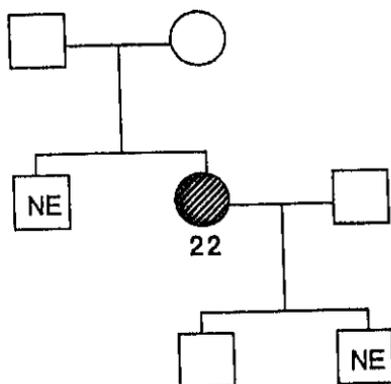
Familia N



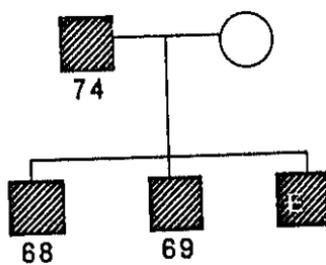
Familia O



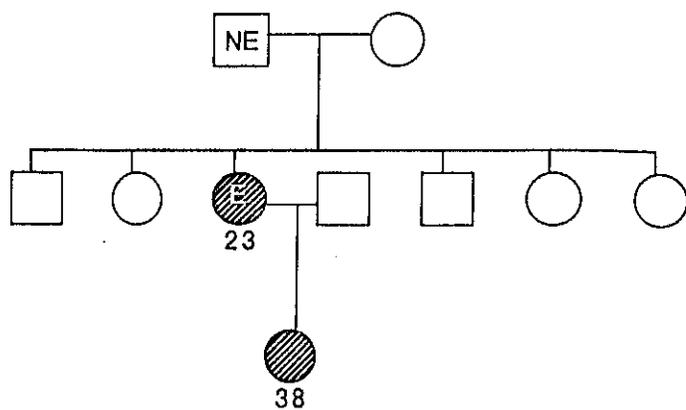
Familia P



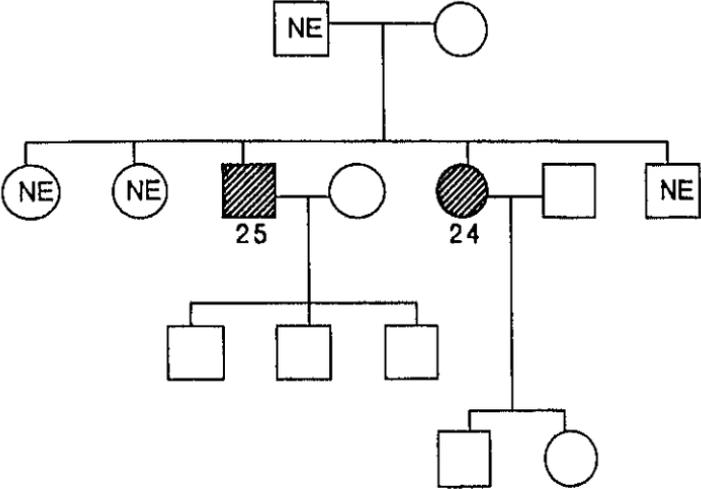
Familia Q



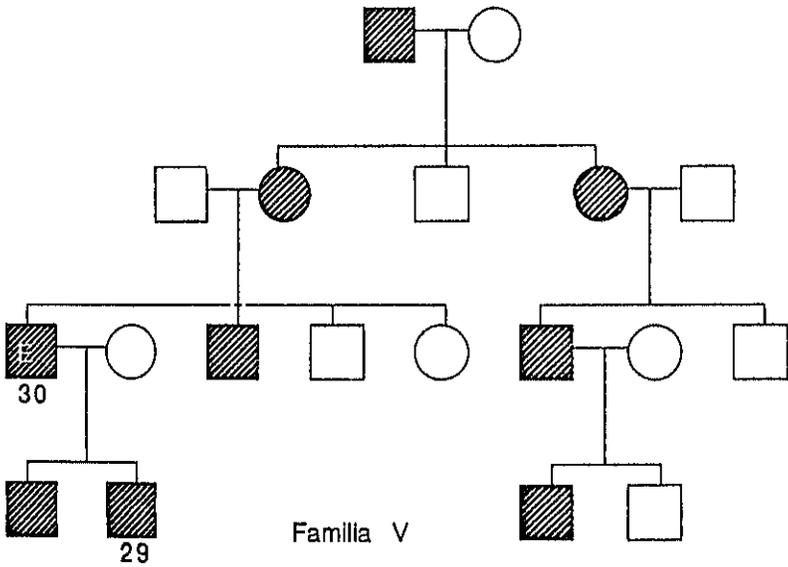
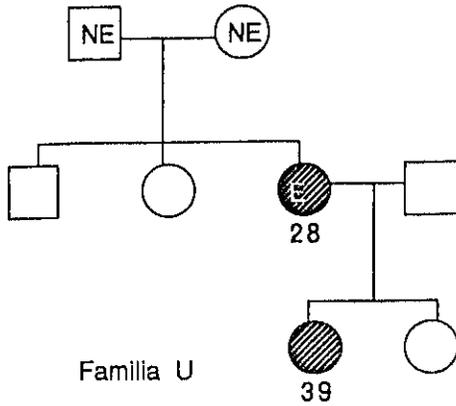
Familia R

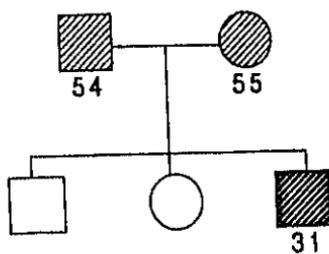


Familia S

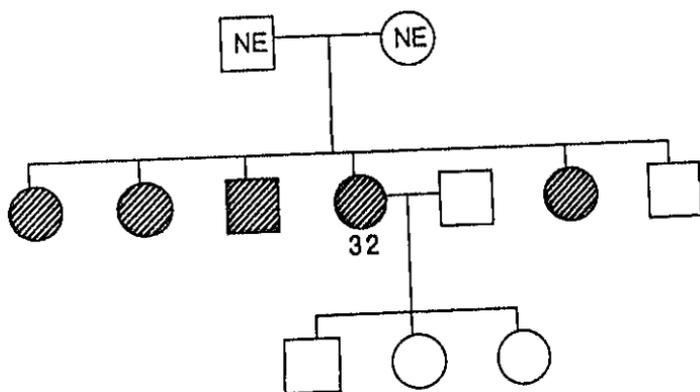


Familia T

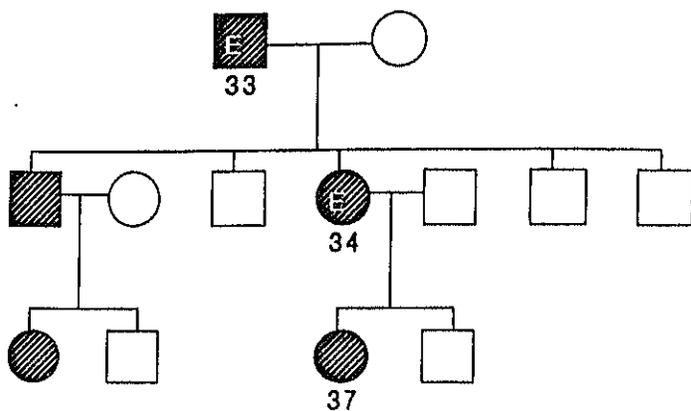




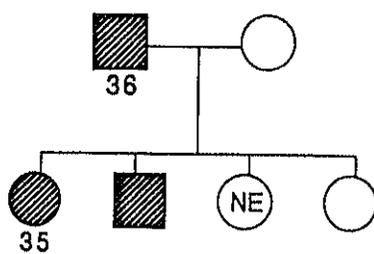
Familia W



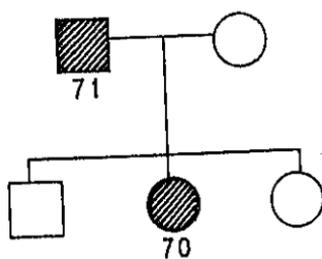
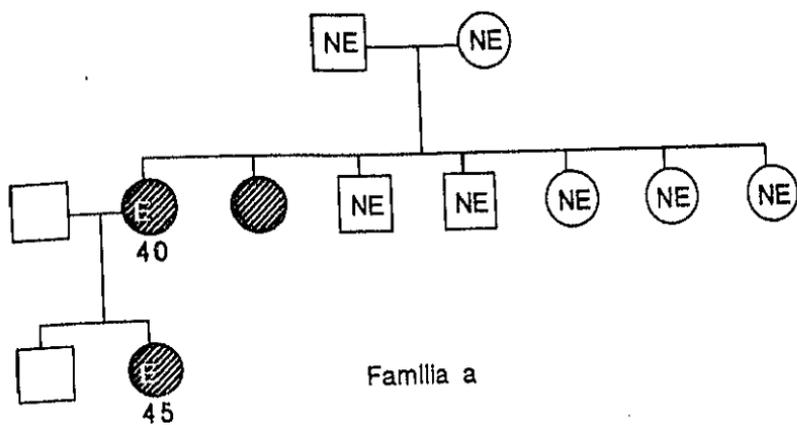
Familia X

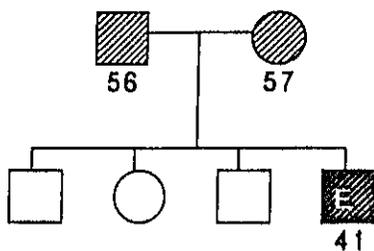


Familia Y

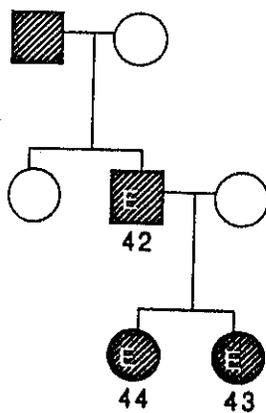


Familia Z





Familia c



Familia d

## 5. DISCUSSION

Hemos estructurado este capítulo desglosándolo en tres bloques, para discutir en el primero las técnicas de citometría de difracción de luz láser y de SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria que han constituido la metodología base de nuestro estudio, con una breve referencia al tratamiento estadístico; realizar en el segundo un sucinto comentario de los controles, y desarrollar en el tercero el análisis de nuestra serie de EH según los objetivos planteados inicialmente, para lo cual hemos agrupado los datos bajo los indicadores siguientes:

- los indicadores clínicos, incluyendo la edad, sexo herencia, gravedad del curso clínico y antecedentes de esplenectomía, que definen subgrupos homogéneos que facilitan el estudio de sus características,
- los indicadores de hemólisis y eritropoyesis compensadora, en el caso de la hemocimetría, morfología de la serie roja y bioquímica sérica,
- los indicadores de esferocitosis, o aquellos parámetros derivados de la curva de distribución de los hematíes, según concentración de hemoglobina obtenida por citometría de difracción de luz láser que demuestran la existencia de esferocitos en una muestra de sangre,
- los indicadores de la naturaleza de la hemólisis que dirimen del estudio de fragilidad osmótica y reflejan la reducción de la relación superficie/volumen celular,
- los indicadores de déficit parcial de espectrina y ankirina en la membrana eritrocitaria, o contenidos de estas proteínas estimadas mediante SDS-PAGE de los estromas aislados.

## 5.1. Método

### 5.1.1. Citometría de difracción de luz láser

El Sistema H-1 Tecnicon<sup>TM</sup> (figura 15) ha permitido obtener indicadores de esferocitosis citométricos. Este método es capaz de medir de forma exacta, directa y simultánea la intensidad de la luz difractada por cada célula (previamente esferificada isovolumétricamente y ligeramente fijada con glutaraldehído) en dos intervalos angulares, generándose un par de valores que se transforman por proceso electrónico basado en la teoría de difracción de Mie<sup>90</sup> en un par de cifras respectivas de volumen y concentración de hemoglobina para cada hematíe estudiado, elaborando sendos histogramas según volumen y según concentración de hemoglobina, de donde se computan VCM, HC (concentración de hemoglobina corpuscular media estimada directamente), RDW, HDW (desviación standard de la distribución según concentración de

hemoglobina) y % Hiper, entre otras variables de dichos histogramas agrupadas ordenadamente en la pantalla de investigación nº 1, que es posible seleccionar en el software de los Sistemas H de Technicon™.

Este procedimiento mide con exactitud un amplio rango de valores de VCM (30 - 120 fL) y de CHCM (27 - 45 g/dL), permitiendo obtener una información rápida y cuantitativa de la presencia de hematíes con el característico incremento de concentración de hemoglobina del esferocito<sup>12,38,83,112,137</sup>, ventaja importante respecto de los citómetros convencionales (figura 14), que, en cambio, no son capaces de estimar correctamente CHCM por encima de 35 mg/dL al medir de forma inexacta el volumen de las células deshidratadas<sup>128</sup>, y además, la rigidez, esfericidad y elevada concentración de hemoglobina del esferocito impiden la valoración adecuada de su volumen, por interferencia de la concentración de hemoglobina (entre otros factores), y de su CHCM por tratarse de un valor computado a partir del VCM<sup>125,128,171,173</sup>; tales inconvenientes suponen no descubrir formas leves o moderadas de EH<sup>64,140</sup>. Sin embargo, el método seleccionado resulta óptimo para el estudio de la EH por su capacidad de medida directa, simultánea, exacta y sin interferencias del volumen y de la concentración de hemoglobina de los hematíes, ofreciendo información cuantitativa del porcentaje de células con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL en el parámetro % Hiper, que junto con HC y HDW alerta sobre la existencia de esferocitosis en una muestra dada (figura 18)<sup>64,140</sup>.

La citometría de luz láser ha mostrado una buena precisión o reproducibilidad, que ha sido contrastada mediante los oportunos controles de calidad internos y externos (Programa de Control de Calidad Externo en Hematología, PCEEH). En efecto, el parámetro HC ha ofrecido CV inferiores al 2%, al igual que CHCM, encontrándose dentro de los márgenes considerados típicos de los parámetros de serie roja<sup>73</sup>. Además, el método disfruta de excelentes sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de esferocitosis, probablemente superiores al test de fragilidad osmótica, y con la ventaja de la rapidez, fácil disponibilidad y resultado cuantitativo de calidad controlable inherente a las técnicas citométricas.

Pero resulta de capital importancia insistir y enfatizar que el método detecta ESFEROCITOSIS, entendida como la presencia de esferocitos en una determinada muestra, hecho no exclusivo ni patognomónico de la EH, si bien en este trabajo se ha aplicado tal tecnología y se ha evaluado su efica-

cia diagnóstica en dicha enfermedad. Existe esferocitosis también en la anemia hemolítica autoinmune, hemólisis con cuerpos de Heinz, hiperesplenismo, enfermedad hemolítica del recién nacido y quemaduras extensas, que, como la elevación de HC y % Hiper no es específica de la EH, puesto que en estas entidades aparecen hematíes con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL. Se debe saber que el parámetro % Hiper no es monopolio de la EH, enfermedad que sólo puede diagnosticarse con seguridad si la evaluación de esta tecnología forma parte de un conjunto de datos clínicos hematológicos y bioquímicos compatibles con EH.

### 5.1.2. Estudio de la membrana eritrocitaria

Los indicadores de déficit parcial de la membrana eritrocitaria en espectrina y ankirina proceden de la SDS-PAGE de los estromas aislados de casos y controles por cálculo de sus contenidos en dichas proteínas o cocientes Sp/B3 y Ank/B3.

Para la obtención de buenos resultados es esencial evitar la proteólisis de las muestras, no sólo retirando la capa leucoplaquetaria de la sangre periférica sino también inhibiendo la actividad proteolítica endógena de las propias membranas eritrocitarias aisladas producida por proteasas originadas en ellas y que ejercen su papel durante el proceso de hemólisis *in vitro* y subsiguientes pasos, incluso cuando las células contaminantes se han eliminado concienzudamente, siendo la ankirina y la banda 4.9 particularmente susceptibles a esta acción<sup>160</sup>, cuyos efectos estriban desde desplazamientos más o menos graves de las bandas hacia zonas de menor peso molecular hasta ligeras degradaciones solamente detectables por inmunoblotting. Además se ha descrito un mayor grado de proteólisis de la espectrina y menor de la banda 3 por dicho proceso de autodigestión<sup>60</sup>, ante el cual los estromas eritrocitarios de la EH son más estables que los procedentes de controles<sup>61</sup>. La estrategia general es minimizar los tiempos de exposición a las proteasas endógenas y controlar su actividad mediante inhibidores tales como el PMSF (fenilmetilsulfonilfluoride, que reacciona rápidamente con los residuos de serina de los centros activos de las serín-proteasas), del que se ha demostrado que suprime la degradación progresiva de la ankirina<sup>161</sup> si se adiciona al buffer de hemólisis, al cual se añaden también agentes quelantes para evitar la activación de las proteasas calcio-dependientes de las membranas aisladas<sup>160</sup>. En este trabajo se han satisfecho todos estos requerimientos con el fin de asegurar la integridad de las proteínas de la membrana eritro-

citaria que permitiera su análisis posterior; en lo que respecta a la espectrina, los inmunoblot antiespectrina normales en los controles excluyen su degradación proteolítica en el transcurso de la técnica.

Para la SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios aislados de casos y controles se eligió el sistema de Fairbanks y cols.<sup>50,51</sup> por ser ampliamente utilizado y de fiabilidad probada, que resulta ideal para el análisis rutinario de las membranas por su rapidez y sencillez, siempre y cuando no se necesite la mejor resolución en pesos moleculares de 30.000 a 90.000 daltons (figura 19)<sup>51</sup>. Una ventaja de este sistema continuo es su capacidad de resolver la banda 2.1 o ankirina de la banda 2 o cadena  $\beta$  de la espectrina, componentes que tienden a superponerse en los sistemas discontinuos<sup>51,95, 112</sup>. La estimación del contenido proteico de los geles teñidos puede realizarse por densitometría<sup>29,30,50,82,106,166</sup> o por elución del colorante en piridina<sup>3,4,36,44,53</sup>, ambas de uso difundido. Se ha sugerido el último procedimiento como más adecuado, puesto que para el azul de Coomassie la intensidad de tinción determinada por densitometría se desvía de la ley de Beer cuando el contenido proteico de una determinada banda excede de 10  $\mu$ g, mientras que la elución del colorante en piridina mantiene su linealidad hasta 100  $\mu$ g<sup>51,53</sup>. En el presente estudio se ha utilizado la densitometría (figura 17) por su rapidez y porque la cantidad total de proteína aplicada sobre los geles para la SDS-PAGE nunca fue superior a 15  $\mu$ g, quedando, por tanto, asegurada la fiabilidad del método.

Los cocientes Sp/B3 y Ank/B3 expresan los contenidos proteicos de la membrana eritrocitaria en espectrina y ankirina<sup>3,4,30,36,106</sup> respectivamente, denominados densidades proteicas por algunos autores que reservan el vocablo "contenido" para la cuantificación real de la espectrina por radioinmunoensayo<sup>4,179</sup>. Se ha criticado que la SDS-PAGE subestima el verdadero déficit corpuscular de espectrina comparado con el radioinmunoensayo<sup>3,4</sup> por considerar que el contenido de banda 3 se encuentra discretamente reducido antes de la esplenectomía, por la eliminación de porciones de membrana eritrocitaria en virtud del condicionamiento esplénico, de forma que existen contenidos mayores de banda 3 en los individuos esplenectomizados; por tanto, antes de la esplenectomía, la reducción del contenido de espectrina respecto de la banda 3 infraestima su déficit real, mientras que después de la esplenectomía sucedería a la inversa, dándose contenidos de espectrina menores atribuibles a cierto aumento de banda 3<sup>3,4</sup>. También se ha definido como densidad de espectrina la concentración de mmoles de

esta proteína por mmoles de fósforo lipídico<sup>44</sup>, suprimiendo la posible inexactitud relativa a la banda 3.

En nuestras manos, el procedimiento considerado globalmente, ha demostrado ser rápido, sencillo, reproducible para estimar los contenidos de la membrana eritrocitaria en espectrina y anquirina, eficaz y fácilmente disponible.

### 5.1.3. Análisis estadístico y eficacia de las pruebas diagnósticas

La justificación de la aplicación preferente de pruebas no paramétricas radica en que la hipótesis de normalidad y en su caso la hipótesis de homogeneidad de varianzas no fueron aceptadas siempre para las distribuciones de todas las variables y muestras estudiadas. Ciertamente, las pruebas no paramétricas tienen la ventaja de no hacer hipótesis sobre las distribuciones, conservando en la mayor parte de los casos una potencia comparable a la de las pruebas clásicas<sup>152</sup>.

Es preciso subrayar que la eficacia estadística predictiva de las técnicas diagnósticas depende de la prevalencia de la enfermedad<sup>62,68,144</sup>, que aunque estimada en 1:5000<sup>12,38,65,83,137,139,163</sup>, no se conoce realmente por la ignorada frecuencia de casos leves y asintomáticos de la entidad desapercibidos por los métodos diagnósticos tradicionales<sup>64,140</sup>. Esta prevalencia real desconocida de la EH ha motivado que el análisis de la capacidad diagnóstica de los métodos discutidos se circunscriba al estudio de su sensibilidad y especificidad (índices independientes de la prevalencia<sup>68</sup>) complementado con la evaluación de la precisión y la descripción del rango de normalidad, dado que dicha prevalencia ignota impide el análisis de los valores predictivos y la eficiencia matemática de las pruebas diagnósticas<sup>62,68,144</sup>.

Los valores de los índices de la eficacia estadística de los tests diagnósticos puede variar según el tipo de pacientes incluidos en el estudio, la interpretación de los resultados y el estado de los sujetos respecto de la entidad a estudiar<sup>144</sup>. La eficacia del método para descartarla depende de su sensibilidad, que para ser real ha de explorarse en un amplio espectro clínico del problema; de la especificidad dirime la eficacia del test en decidir un diagnóstico, por lo que su estudio ha de incluir pacientes con enfermedades que formen parte del mismo diagnóstico diferencial<sup>68,144</sup>.

Creemos que nuestro estudio reúne las mejores condiciones para la evaluación de la sensibilidad de las técnicas, puesto que incluye un amplio

rango clínico de la EH con un buen número de formas leves o asintomáticas. Sin embargo, el grupo control comparativo está constituido exclusivamente por individuos sanos y sin problemas afines a la EH, hecho que incide sobre la especificidad. Pero la citometría de difracción de luz láser sí es específica de esferocitosis, aunque no sea exclusiva de la EH, cuyo diagnóstico necesita de otros datos clínicos y de laboratorio compatibles con dicha entidad; de forma análoga sucede con la SDS-PAGE de las membranas eritrocitarias aisladas. Su contribución al diagnóstico de la EH ha de entenderse en un contexto clínico y biológico propio de ella, y así se ha considerado en nuestro estudio.

## 5.2. Controles

El estudio de los datos hemocitométricos se realizó sobre 140 individuos de ambos sexos adultos y sanos. Los valores obtenidos, en especial para los indicadores de esferocitosis, resultan similares a los descritos previamente<sup>64</sup>; cabe resaltar la escasa dispersión de la variable HC (gráfica 34), de CV 2,98% (muy parecido a la CHCM, cuyo CV fue de 2,42%), que contrasta con la amplitud de las distribuciones del Area II (gráfica 37) y % Hiper (gráfica 35) con CV de 71,31 y 67,38%, respectivamente. La mayor parte de los controles no exceden de 33,76 g/dL, 5,56 y 0,83% para las variables HC, Area II y % Hiper, con una probabilidad de error del 0,1%.

En lo concerniente a los parámetros del estudio de la membrana eritrocitaria mediante SDS-PAGE, evaluados sobre 24 controles sanos, los valores hallados son superponibles a los observados por otros autores<sup>30,36,82</sup>; nuestras cifras de Sp/B3 son ligeramente más elevadas. Las distribuciones de frecuencias, tanto de Sp/B3, y sobre todo de Ank/B3 exhiben dispersiones reducidas (gráficas 38 y 39), con sendos CV de 4,75 y 0,1%, de forma que el grupo control no suele presentar valores de Sp/B3 por debajo de 1,09 (con probabilidad de error de 0,1%) y nunca inferiores a 1,04, sin registrarse cifras de Ank/B3 menores de 0,197.

## 5.3. Esferocitosis hereditaria

### 5.3.1. Datos clínicos

Cabe distribuir nuestra serie de EH en subgrupos definidos por la edad, sexo, herencia, gravedad del curso clínico y antecedentes de esplenectomía, datos clínicos respecto de los cuales exhibe una serie de características que discutiremos a continuación.

La EDAD media global de los pacientes fue de 23,03 años, considerando solamente los enfermos no esplenectomizados, dicha edad media fue de 20,69 años, y de 28,31 para los esplenectomizados. Según la gravedad del curso clínico de las EH no esplenectomizadas, las edades medias han sido diferentes en cada categoría definida, con 20,84 años para las formas leves o asintomáticas, 24,62 para los casos moderados y 4,15 años para los enfermos graves. De hecho, todas nuestras EH graves han llegado a la edad adulta esplenectomizadas y la mitad de ellas lo fueron en edad pediátrica (gráfica 1). Estas observaciones refrendan la conocida necesidad de la esplenectomía durante la infancia en los casos graves y muestran que con la edad aumentan las indicaciones de esplenectomía entre las formas de curso clínico moderado por complicaciones como crisis anémicas y colelitiasis sintomática<sup>6,137,138,139</sup>. No se apreció afectación predominante de uno de los dos SEXOS (gráfica 2).

La HERENCIA del defecto (gráfica 3) se ajustó a un patrón autosómico dominante en 21 familias (53 casos) de las 28 (60 casos) en que fue posible acceder a un estudio familiar; los 7 enfermos restantes fueron clasificados hipotéticamente como no dominantes al carecer de afectación familiar evidente a los métodos diagnósticos convencionales. Estas cifras suponen un 74,1 y 25,9%, respectivamente, de familias de herencia dominante y "no dominante"; valores de acuerdo con los referidos por Lux (1987)<sup>112</sup>. Sin embargo, otros autores indican porcentajes equivalentes de enfermos y no de familias con uno u otro tipo de herencia<sup>4,6,7,83,163</sup>; si se consideran de este modo nuestros pacientes, el 88% fueron casos de herencia típica autosómico dominante y el 12% formas sin historia familiar. Estas cifras exhiben un neto predominio de los primeros, con representación proporcionalmente menor de los casos "no dominantes"; podría ser posible en este sentido un cierto sesgo motivado por el carácter de reclutamiento de nuestro estudio (qué pacientes deciden colaborar).

Es preciso matizar dos hechos: en primer lugar, el hallazgo de una familia de cinco miembros (familia D) todos ellos con EH leve o asintomática evidente, excepto el propósius (caso número 2), cuya forma clínica grave respondió completamente a la esplenectomía realizada en edad escolar, dato consistente con el comportamiento de un trastorno de herencia mendeliana dominante en la mayoría de las EH y cuya penetrancia puede ser variable<sup>112,139</sup>. Así es común que el grado de expresión patobiológica de la EH

dominante sea relativamente uniforme dentro de una familia dada<sup>38,137,138</sup>, aunque también puede variar ampliamente<sup>12,137,138</sup>, de manera que algunos pacientes de casos de EH típica solamente presentan formas leves del defecto<sup>137,138</sup>, y hemos constatado ambos supuestos. Dicho caso número 2 puede ser clasificado como homocigoto o bien doble heterocigoto de la alteración o alteraciones genéticas causales de la EH en su familia, al igual que otros casos descritos con anterioridad<sup>2,4,137,139,168</sup>, cuyos padres presentaban pequeñas anomalías reveladoras de su condición de heterocigotos mínimamente afectados y que en la familia D fueron evidentes con explotaciones rutinarias. Sería plausible que la penetrancia variable y las interacciones genéticas en la transmisión vertical y dominante de la EH<sup>41</sup> expliquen la existencia de enfermos homocigotos o doblemente heterocigotos en que el defecto, lejos de ser incompatible con la vida<sup>112</sup>, exhibe un curso clínico análogo a otros casos de herencia dominante clásica. El segundo hecho a enfatizar se refiere a que de los 7 enfermos con EH sin afectación familiar aparente, 4 casos cursaron gravemente y 3 de forma clínica moderada, de acuerdo con observaciones previas<sup>3,4,6,12,112,137,139,163</sup> en que se subraya el predominio de EH de cursos clínicos desfavorables entre los casos teóricamente no dominantes del defecto.

La GRAVEDAD del curso clínico de la enfermedad fue leve o asintomática en 23 pacientes y moderada en 31, con 8 enfermos graves, cifras que representan porcentajes de 37, 50 y 13% para cada categoría, respectivamente (gráfica 4). Tales valores se ajustan a estudios que reconocen un 20-40% de formas leves, un 60-65% de formas moderadas y un pequeño número, probablemente no superior al 5%, de pacientes graves<sup>12,44,112</sup>, a excepción de una mayor representación de este último grupo en nuestra casuística. Esta circunstancia probablemente obedece a que la existencia de anemia hemolítica ha sido el único criterio definitorio de la categoría grave; ciertamente en algunos casos se trata de una anemia discreta no dependiente de transfusión, que ha podido causar un ligero retraso ponderal y quizá otros autores los hubiesen clasificado como de curso clínico moderado, aunque dentro de su rango fueran claramente los enfermos más afectados.

*Se han descrito formas casi letales de EH*<sup>2,3,12</sup>, que no hemos tenido la oportunidad de observar, caracterizadas según la literatura por una intensa anemia hemolítica de notable requerimiento transfusional y respuesta incompleta a una esplenectomía necesaria antes de la edad escolar<sup>2,4,6,12,30</sup>

113,137,139, siendo generalmente casos catalogados como autosómico recesivos; en ciertas ocasiones este tipo de enfermos se ha incluido en la categoría grave<sup>112,163</sup>. En este punto resulta interesante recordar el sello de afectación del curso clínico de las EH de herencia considerada autosómico recesiva<sup>3,4,6,12,30,112,137,138,139,163</sup>, corroborada y discutida en este estudio, que presumiblemente traduce su condición de homocigotos o doble heterocigotos para defectos causales de la entidad; de hecho sólo rara vez<sup>44</sup> se han comunicado casos leves o asintomáticos entre ellos y que tampoco hemos observado.

La gravedad del curso clínico de la EH supone una serie de variaciones de los indicadores de hemólisis y eritropoyesis compensadora, de esferocitosis, de la naturaleza de la hemólisis y de déficit proteico de la membrana eritrocitaria, modificaciones con trascendencia estadística entre las categorías clínicas definidas y que comentaremos más adelante.

Un 30% de los enfermos (19 de 62 casos) habían sufrido ESPLENECTOMIA por hemólisis o colelitiasis sintomáticas, siendo 15 de afectación moderada y 4 graves (gráfica 4). El 60% de los pacientes restante incluye 23 casos leves o asintomáticos, 16 de curso clínico moderado y 4 graves; en estas EH no esplenectomizadas se ha estudiado la repercusión biológica de la entidad sobre los indicadores de hemólisis y su naturaleza y de esferocitosis, puesto que en estos enfermos la EH se manifiesta sin modificar.

### 5.3.2. Respuesta a la esplenectomía

En el grupo de pacientes esplenectomizados se ha valorado la respuesta a la esplenectomía en los 11 casos en que fue posible, así como el cambio que el procedimiento determina sobre los indicadores de hemólisis. Según cabía esperar<sup>6,12,38,44,83,112,137,139,154,163,183</sup>, la respuesta a la esplenectomía consistió en la corrección de la anemia crónica o episódica (tabla XVI) en todos los casos, con reducción de la reticulocitosis en general; no hemos apreciado las respuestas parciales de la anemia observadas por otros autores<sup>2,4,6,12,30,113,137,139</sup> particularmente en las EH de gravedad intensa consideradas autosómico recesivas: de los 11 enfermos estudiados en este sentido sólo 1, el caso número 41 (familia c) carecía de afectación familiar aparente, fue clínicamente moderado y respondió perfectamente a la cirugía.

Trataremos con detalle en el siguiente apartado la repercusión de la

esplenectomía sobre los demás indicadores de hemólisis y su naturaleza y de esferocitosis, repercusión inaparente en el caso de los indicadores de defecto proteico de la membrana eritrocitaria.

### 5.3.3. Características citométricas de la EH. Relación con otros datos

La citometría de luz láser dibuja un perfil biológico típico en esta entidad. En los enfermos no esplenectomizados, junto a las cifras de hemoglobina y hematocrito más o menos conservadas, ofrece una curva de distribución de los hematíes según volumen amplia y heterogénea de elevado RDW a expensas de reticulocitosis (gráfica 9) y de células de fragilidad osmótica variable según el grado de condicionamiento esplénico (gráficas 11, 12, 13 y 14), y que son responsables del característico desplazamiento hacia la hipercromía de la distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina (figura 18) que se traduce en forma de los indicadores de esferocitosis HC, % Hiper y Area II (gráficas 7, 8 y 12; también RDW o desviación standard de la distribución, no analizada en este estudio) de acuerdo con la observación de que las células más hipercromas son osmóticamente más frágiles<sup>14,137</sup>.

Esta hemólisis, extravascular in vivo y esencialmente esplénica, conlleva la elevación de la bilirrubina sérica y el correspondiente consumo de haptoglobina (gráfica 15). La eritropoyesis compensadora queda plasmada, además de en la reticulocitosis y a través de ella en el RDW, en un aumento de los niveles de EPO (gráficas 16, 17, 18 y 19). Tales cambios son estadísticamente significativos respecto del control (tabla XVII) y entre las diferentes categorías definidas según el curso clínico de la EH, subrayando que la modificación de estos indicadores es directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad (gráficas 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27; tabla XIII).

La desaparición del condicionamiento esplénico y minimización de la hemólisis se manifiesta en las EH esplenectomizadas no sólo en la resolución de la anemia crónica o episódica, sino también en la reducción de la reticulocitosis y correspondiente normalización de RDW (tabla XVII), con disminución de la fragilidad osmótica incubada y de los indicadores de esferocitosis % Hiper y Area II (tabla XVII). Así pues, con la esplenectomía se hace más homogénea la curva de distribución de los hematíes según volumen al quedar integrada principalmente por células hipercromas de fragilidad osmótica inmediata sin tratamientos adicionales para sensibilizarla (gráficas 28,

32 y 33). Estos efectos en nuestra opinión quedan enmascarados en las EH no esplenectomizadas por la reticulocitosis.

La condición de los indicadores de esferocitosis como tales se ratifica en que la esplenectomía no consigue suprimirlos (tabla XVII) porque evidentemente no anula el defecto aunque modifique su expresividad clínica.

La conducta del RDW, aumentando con la gravedad de la enfermedad en los sujetos no esplenectomizados (tablas XIII y XIV) y normalizándose con la esplenectomía (tablas XVI y XVII) es congruente con observaciones previas<sup>140</sup>. El RDW asimismo exhibe asociaciones con la bilirrubinemia, la haptoglobina, está a su vez relacionada con las RGO inmediata inicial e incubada media como naturaleza de la hemólisis, y la EPO (gráfica 19), cuyos niveles se conducen junto a la reticulocitosis y en cierto modo al RDW como indicadores de la actividad eritropoyética compensadora y muestran un comportamiento directamente proporcional al grado de anemia (gráficas 16, 17 y 18), reflejando la magnitud de la hemólisis.

La reducción de la hemólisis con la esplenectomía se acompañó obviamente de un descenso de la bilirrubinemia y del consumo de haptoglobina sobre todo en las formas de curso clínico moderado, y de la normalización de la cifra sérica de EPO.

#### 5.3.4. Eficacia estadística de la citometría de difracción de luz láser en el diagnóstico de la EH

La aplicación de los indicadores de la esferocitosis obtenidos por esta tecnología como medio diagnóstico de la EH ha demostrado que se trata de un método útil, preciso y extraordinariamente eficaz con las ventajas de ser sencillo, rápido, proporcional a la gravedad del defecto (tablas XIII y XIV) y cuantitativo.

Ha sido previamente utilizada con éxito con este sentido<sup>64,140</sup> aun cuando algunos autores<sup>140</sup> han valorado el trazado de las curvas de distribución de los hematíes según volumen y según concentración de hemoglobina sólo cualitativamente, reconociendo la presencia de esferocitos por sendas "coias" microcítica e hiperchroma. En un estudio preliminar del actual<sup>64</sup> se comprobó la utilidad de la vertiente cuantitativa del método basándose en los parámetros % Hiper, HC y HDW, y se sugirió un posible aumento de su capacidad diagnóstica si pudiesen detectarse células con concentraciones de hemoglobina entre 36 g/dL y 41 g/dL.

En el presente estudio hemos analizado la eficacia estadística de la citometría de difracción de luz láser en el diagnóstico de la EH incluyendo el procedimiento arbitrado para el cálculo de las áreas dentro de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina, y en definitiva del Area II o tanto por ciento de hematíes con concentración de hemoglobina entre 37,5 g/dL y 40 g/dL. Demostramos que el método es exquisitamente sensible y específico en la detección de esferocitosis en esta enfermedad si los umbrales de los parámetros para ello se sitúan en HC superior a 34,5 g/dL, % Hiper mayor de 1,5% y Area II por encima del 9%, que arrojan parejas respectivas de sensibilidad y especificidad del 81,4 y 87,1%, 90,7 y 94,3% y 88,4 y 91,4% (tabla XVIII). Estos índices no mejoran sustancialmente con la combinación diagnóstica de Area II mayor de 9% y/o % Hiper superior a 1,5%.

El indicador de esferocitosis más discriminativo ha sido el % Hiper, que como puede apreciarse en las distribuciones de frecuencias (gráficas 34, 35, 36 y 37) es el parámetro en que el solapamiento entre enfermos y controles es menor. El % Hiper permite detectar incluso grados mínimos de esferocitosis, cuya identificación en la extensión de sangre periférica sería difícil por subjetiva y escasa, ya que todas la EH leves o asintomáticas han presentado % Hiper por encima de 0,5% y mayor de 1% en 21 de los 23 casos de esta categoría. En nuestra opinión, la ausencia en una muestra de células con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL descarta la esferocitosis, y por ende, la EH.

#### 5.3.5. Fragilidad osmótica, esferocitosis y EH

En realidad, los estudios de fragilidad osmótica y de lisis en glicerol no son más que verdaderos indicadores, a veces no lo suficientemente sensibles, de la esfericidad de los hematíes dado que el principio en el que se basan estos métodos en la característica reducción de la superficie respecto del volumen de los eritrocitos<sup>38,39,66,112,137,139,146,163,169</sup>. En este sentido, Patel y cols. (1989)<sup>140</sup> han manifestado que ante la especificidad del trazado de la distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina rara vez sería necesario evaluar la fragilidad osmótica, especialmente en los estudios familiares.

Los indicadores de la naturaleza de la hemólisis han mostrado un aumento de la fragilidad osmótica eritrocitaria dependiente de la intensidad del curso clínico de la EH (tablas XIII y XIV) como sucede con los indica-

dores de esferocitosis, y que resulta más ostensible en su estudio post incubación, sobre todo en los casos leves o asintomáticos de la entidad.

En cuanto a los trazados de las curvas de fragilidad osmótica (figura 16) hemos apreciado una tendencia a la formación de curvas de perfil denominado normal entre los enfermos leves o asintomáticos, de modo que con el aumento de la gravedad del curso clínico y a su vez de la esferocitosis se han dado curvas caudadas y diagonales, éstas circunscritas a las EH más graves y sobre todo a la versión incubada de la prueba. Estos datos son sobradamente conocidos<sup>38,39,83,137,139</sup>.

Los puntos de las curvas más vulnerables a la gravedad de la enfermedad han sido la RGO inmediata inicial y la RGO incubada media ( $p \leq 0,001$ ; gráfica 27; tablas XIII y XIV) seguidas de la RGO inmediata media y de la RGO incubada inicial ( $p < 0,05$ ; tablas XIII y XIV), sin existir diferencias estadísticamente significativas respecto de los puntos de lisis total. Tales hallazgos contrastan con estudios previos<sup>44</sup> en que las diferencias estadísticamente significativas conciernen a la RGO inmediata inicial y RGOs totales. Nos inclinamos a favorecer nuestro resultado, que creemos confirmado en las correlaciones de la RGO incubada media (gráfica 12) y de la RGO inmediata inicial (en enfermos esplenectomizados, gráfica 33) con % Hiper, genuino indicador de esferocitosis.

Como indicadores de esferocitosis, la fragilidad osmótica y técnicas afines quedan ampliamente superadas por la citometría de difracción de luz láser con los parámetros derivados de la curva de distribución de los hematíes según concentración de hemoglobina y el protagonismo indudable del % Hiper ya que se trata de un método de gran eficacia, preciso, directo, cuantitativo de forma directamente proporcional a la gravedad del curso clínico de la EH, sencillo y rápido a diferencia de las técnicas anteriores, a las que puede reemplazar largamente en el diagnóstico de la entidad (tabla XIII).

### 5.3.6. Rol de la SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria en el diagnóstico de la EH

El estudio de los indicadores del déficit proteico de la membrana del hematíes mediante SDS-PAGE de la misma ha demostrado ser un método eficaz y reproducible para la estimación de sus contenidos en espectrina y ankirina en la EH (tabla XVIII), con las ventajas de ser un procedimiento sencillo, rápido y fácilmente disponible.

Ante la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre enfermos no esplenectomizados y esplenectomizados de la misma gravedad (tabla XVII), los indicadores de déficit proteico de la membrana del hematíe se han analizado globalmente en todas las EH.

El defecto básico encontrado accesible a la tecnología aplicada ha sido el clásico déficit parcial de espectrina manifestado en forma de un descenso del contenido de esta proteína en la membrana eritrocitaria del 87,7%, de la normalidad como media global ( $\bar{X}$  0,990; SD 0,117) que ha variado de acuerdo con la gravedad del curso clínico de la enfermedad (tablas XIII y XIV), acompañado en 45 de 62 pacientes (72,6%) de un déficit parcial medio de ankirina ( $\bar{X}$  0,195; SD 0,003) del 97% de la normalidad, muy discreto pero estadísticamente significativo respecto del control.

Tales datos confirman observaciones previas<sup>2,3,4,6,7,8,12,30,36,38,44,82, 83,112,116,137,139,163</sup>, sobre todo en cuanto al déficit de espectrina, documentado desde los estudios de Agre y cols.<sup>2,3,4</sup>, que han descrito contenidos de espectrina, determinados por radioinmunoensayo<sup>3,4</sup>, del 63-81% y del 30-74% de la normalidad para las EH dominantes y no dominantes, respectivamente (tabla XIX), siempre variando de manera inversamente proporcional a la gravedad del curso clínico. Estos autores indican contenidos de espectrina del 30% de la normalidad en las formas casi letales de la entidad y matizan que la SDS-PAGE infraestima la verdadera deficiencia corpuscular de esta proteína en comparación con el radioinmunoensayo<sup>3</sup>.

Otros estudios han comunicado contenidos de espectrina del 80-90% de la normalidad en casos dominantes, en general de cursos clínicos leves y moderados<sup>36</sup>, y del 50-70% para las formas no dominantes<sup>30,82</sup>, habitualmente de gravedad intensa o moderada (tabla XIX). Eber y cols. (1990)<sup>44</sup>, que eliminan el elemento de inexactitud que puede introducir la cuantía de banda 3 en la medida de los contenidos proteicos de la membrana calculando el contenido de espectrina como mmoles de espectrina por mmoles de fósforo lipídico, han obtenido valores del 80-100% de la normalidad para las EH leves o asintomáticas, del 50-80% para los casos moderados y del 40-60% para las formas graves.

En nuestra serie, los contenidos medios de la membrana eritrocitaria en espectrina han sido del 84,5% ( $\bar{X}$  0,953; SD 0,003) de la normalidad para las formas no dominantes, que incluyen 4 enfermos graves y 3 de afectación moderada, y de 89,9 y 84,9%, respectivamente, para las EH no

esplenectomizadas y esplenectomizadas (tabla XI), éstas integradas por 4 casos graves y 15 moderados sin formas leves o asintomáticas. Según la intensidad del curso clínico, los contenidos medios de espectrina han sido de 91,3% en los enfermos leves o asintomáticos, de 89,5% en aquellos de curso clínico moderado y de 83,6% en los casos graves (tablas XIII y XIV). Las diferencias entre estas cifras siempre han tenido trascendencia estadística, a pesar de la impresión de proximidad entre sí que pueden causar.

Dichos valores exhiben grados de déficit más modestos respecto de los descritos anteriormente, hecho que probablemente traduce la observación de Agre y cols.<sup>3,4</sup> referente a que la SDS-PAGE subestima el grado real de defecto respecto al radioinmunoensayo. No hay que olvidar que la SDS-PAGE es un método semicuantitativo en cuya resolución influye el tipo de gel de poliacrilamida, homogéneo<sup>50,51,161</sup> o de gradiente<sup>7,4,27,30,36,81,82,106,122,191</sup>, utilizado en el procedimiento. Es posible que en este sentido se justifique, al menos en parte, la ausencia de correlaciones estadísticas de los contenidos proteicos de la membrana eritrocitaria con los indicadores de hemólisis y su naturaleza y de esferocitosis existente en nuestro estudio.

No hemos tenido la oportunidad de observar casos de EH con contenido de espectrina normal y aumento del cociente Sp/B3<sup>85,115,122,163</sup>. Tan sólo en el caso número 66 fue del 110% de la normalidad, caso que formaba parte de una clásica familia de herencia dominante, gravedad principalmente moderada y con discreto déficit parcial medio de espectrina del 95,3% de la normalidad en el resto de sus miembros (familia F). No creemos que tenga valor tal hallazgo aislado que no fue posible confirmar y aun más en el seno de una familia de estas características.

Como dato adicional, es inmunoblot antiespectrina fue normal en todos los pacientes, excluyendo la posibilidad de fragmentación de dicha proteína como causa de su déficit. Esto había sido explorado en EH atípicamente graves de herencia recesiva<sup>2</sup>; en nuestro estudio se ha evaluado en todos los casos.

El déficit parcial de ankirina, acompañante del anterior en el 72,6% de los casos y muy ligero, se ha mantenido alrededor del 97% tanto en las formas dominantes como no dominantes, EH no esplenectomizadas y esplenectomizadas y no ha mostrado una variabilidad estadísticamente ostensible según la gravedad del curso clínico (tabla XIII) de la entidad. Estos hallazgos corroboran la afirmación de que un 50-75% de los enfermos de herencia

dominante típica exhiben discretos déficits de ankirina<sup>82,116</sup>, del que se han descrito diversos grados, desde 15-25%<sup>82,116</sup> a 2-13%<sup>30,36</sup> de reducción respecto del control normal. Los pacientes afectos de formas atípicamente graves y herencia recesiva<sup>30,82,116</sup> presentan niveles de ankirina disminuidos aproximadamente al 50% de la normalidad, circunstancia que tampoco se ha producido en nuestra casuística. De modo análogo al déficit de espectrina, la SDS-PAGE ha de sobreestimar el contenido real de ankirina en la membrana del hematíe al referirlo a la banda 3, supuesto que no ha sido comprobado.

Aparentemente no se apreciaron diferencias cualitativas entre casos y controles en las restantes bandas proteicas resultantes de la SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios (figura 19). El método aplicado no nos ha permitido acceder a otras anomalías del esqueleto de la membrana descritas en la EH. La detección del trastorno del dominio  $\beta$  IV de la espectrina con unión defectiva a la proteína 4.1 (HS  $\beta$ Sp-4.1; tabla 1) comunicado en casos dominantes<sup>69,186</sup> y estimado como un 10% de las EH, requiere cromatografía de afinidad de extractos de espectrina sobre proteína 4.1 inmovilizada<sup>186</sup> o bien análisis bidimensional<sup>13</sup>, técnica ésta necesaria para identificar el dominio  $\alpha$ IIa, hallado en algunos casos no dominantes<sup>118,119</sup>, y que probablemente también permita el estudio de las alteraciones de la banda 3<sup>84,131</sup>. El déficit de banda 4.2, conocido en japoneses con EH recesiva<sup>81,121,138,139</sup>, es perfectamente evaluable mediante SDS-PAGE con mejor resolución en sistemas discontinuos<sup>81,95</sup>; con nuestro procedimiento, continuo y homogéneo, al no conseguir una separación neta de las bandas 4.1 y 4.2, intentamos estimar el contenido de la banda 4 en la membrana como el cociente B4/B3, pero no fue posible evaluar sus resultados por no ser reproducibles en el control de calidad de la técnica, y por ello se excluyó el parámetro B4/B3 del análisis; en cualquier caso, el déficit de proteína 4.2 en la EH ha de ser excepcional en Occidente.

Así pues, el defecto primordial en nuestros enfermos ha sido el déficit leve-moderado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup> Ank<sup>+</sup>; tabla 1) de acuerdo con el predominio de formas leves o asintomáticas y de curso clínico moderado (solamente incluimos 8 casos considerados graves por anemia hemolítica crónica) ofreciendo cierta similitud con la familia de 19 casos estudiada por Costa y cols. (1990)<sup>36</sup> en que se demostró la transmisión de la EH dominante ligada al polimorfismo Nco I del gen de la ankirina.

Se puede especular que nuestro 32% de EH dominantes sin déficit parcial de ankirina (17 de 53 casos) estuvieran afectas de formas con anomalía del dominio IV de la espectrina de unión defectuosa a la proteína 4.1 (HS Sp-4.1; tabla I), de prevalencia estimada en un 30% de las EH dominantes en sus descripciones originales<sup>69,186</sup>, pero la tecnología aplicada no es apta para demostrar este defecto y además muy probablemente subestima la carencia real de ankirina. Se ha descrito en estos enfermos la existencia de esferoeritrocitos en sangre periférica de modo característico<sup>12,38,112,137,139,186</sup>, en realidad únicamente valorable en los pacientes no esplenectomizados, al formar parte de los cambios hemoperiféricos postesplenectomía<sup>83</sup>. Este dato morfológico sólo se observó en los casos no esplenectomizados números 10 y 38, integrados, respectivamente, en las familias J y S cuyos déficits parciales leves-moderados de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup>Ank<sup>+</sup>; tabla I) prácticamente excluyen el defecto supuesto. No obstante, la identificación de hematíes espiculados en sangre periférica es subjetiva y, por tanto, inexacta, por cuanto su valor como orientación diagnóstica es más que cuestionable.

Confirmamos que el déficit leve-moderado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup>Ank<sup>+</sup>; tabla I) es el defecto más prevalente entre las formas autosómico dominantes de EH<sup>3,4,36,82,116,139</sup>, en el cual el déficit de espectrina es secundario a un defecto primario en el gen de la ankirina, aún por caracterizar y que determinaría la alteración de su estructura o función<sup>36,82,116,138</sup>.

La situación no parece distinta en nuestras EH sin afectación familiar evidente a los métodos diagnósticos convencionales, que han mostrado grados de déficit de espectrina y ankirina equivalentes a los registrados en las formas dominantes del mismo curso clínico. No se han observado casos intensamente graves con respuestas parciales a la esplenectomía y con 50% de déficit de ambas proteínas. Este interesante hecho enlaza con los resultados del estudio de sus progenitores, grupo integrado por 6 parejas.

#### 5.4. Progenitores de EH sin historia familiar

La comparación de los progenitores con el grupo control ofrece un importante resultado: mientras los parámetros citométricos, incluyendo los indicadores de hemólisis y de esferocitosis, no muestran diferencias estadísticamente significativas, éstas sí existen respecto de los indicadores de déficit proteico de la membrana eritrocitaria, con contenidos medios de

espectrina de 95,9% y de ankirina de 99% en este grupo de progenitores.

Agre y cols. (1986)<sup>4</sup> observaron en casos similares una mínima disminución de espectrina, a diferencia de Eber y cols. (1990)<sup>44</sup>, y constataron que los contenidos de esta proteína inferiores al 97% de la normalidad se asocian a un aumento de la fragilidad osmótica al determinar ligeras reducciones de la relación superficie/volumen del hematíe, hecho que transforma en acreedores del defecto a este grupo de sujetos. Apenas se conocen datos de los contenidos de ankirina de la membrana eritrocitaria en los progenitores; tan sólo Iolascon y cols. (1991)<sup>82</sup> han descrito aisladamente un ligero déficit.

Tales resultados sugieren que al menos uno de los miembros de cada pareja está afecto por una EH de penetrancia genética incompleta, es decir, con ausencia de expresión del genotipo anómalo cuando debería manifestarse, efecto que obedece a que la tara genética requiere de la concurrencia de otros factores que incluyen la acción de otros genes, fenómenos ambientales o el azar, y teniendo también en cuenta la dificultad diagnóstica que plantean estos casos, en que la entidad escapa a la metodología básica, incluso a la citometría de difracción de luz láser (en nuestro grupo siempre existió un pequeño % Hiper, aunque no significativamente distinto del control), y únicamente puede demostrarse mediante SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios.

Es muy probable que la mayor parte de las EH sin historia familiar sean ciertamente formas de herencia autosómico dominante, como prueban los indicadores de déficit proteico de la membrana del hematíe en los padres de nuestros enfermos, cuyos cursos clínicos, no más desfavorables que los de otros casos típicamente dominantes, pueden explicarse por penetrancia variable del defecto entre miembros de una misma familia y la posibilidad de interacciones genéticas.

De acuerdo con Delaunay y cols. (1990)<sup>41</sup>, la variabilidad fenotípica de la EH podría ser la consecuencia de un gen mutado modulado por la actividad de su correspondiente alelo y/o de otros genes no alélicos, ya que la interacción genética de dos o más alelos en loci distintos podría suponer efectos aditivos o supresores sobre el fenotipo esperado por la acción de cada uno de los loci aislados. De esta afirmación consideramos un claro ejemplo a la familia D, cuya primera generación (casos números 48 y 49), con EH leve o asintomática, que fue detectable con los mé-

todos diagnósticos utilizados engendró una descendencia con expresividad clínica muy heterogénea. Estos datos ponen de manifiesto la rareza de las EH de verdadera herencia autosómico recesiva, y reafirman la conclusión de Agre (1989)<sup>6</sup>, que considera la EH dominante y recesiva enfermedades distintas, más allá de la mera expresión homocigota o heterocigota del problema.

La solución definitiva del dilema de la transmisión genética de la EH en estos casos requeriría demostrar su asociación a un determinado polimorfismo del gen de la ankirina<sup>36</sup>, o bien la caracterización bioquímica de defectos ya conocidos y ligados a la EH dominante (como las formas HS  $\beta$  Sp-4.1; tabla I) o recesiva (anomalía  $\alpha$ IIa de la espectrina<sup>41,118,119</sup> o el déficit combinado grave de espectrina y ankirina por síntesis reducida de ésta<sup>29,77</sup>). Esto sobrepasa las posibilidades de nuestra tecnología.

#### 5.5. Clasificación de la EH según su expresión biológica

El análisis de la gravedad o curso clínico de la EH entre los enfermos no esplenectomizados ha puesto de manifiesto una modificación de los indicadores de hemólisis (y eritropoyesis compensadora), de la naturaleza de la misma, de esferocitosis y de déficit parcial de espectrina y ankirina de la membrana del hematife según las categorías definidas respecto de dicha variable. Los criterios aplicados para ello han sido tan sencillos como la existencia o no de anemia, si ésta es crónica o episódica y la magnitud de la reticulocitosis, datos que orientan de forma rápida y fácil sobre la intensidad del curso clínico de la enfermedad en cada paciente y que es prudente determinar en situación basal.

Dichas variaciones resultan estadísticamente significativas, delimitando una clasificación de la EH según su expresividad biológica y con importancia pronóstica, que se describe en la tabla XIV. Eber y cols. (1990)<sup>44</sup> han elaborado una clasificación parecida que relaciona el déficit de espectrina (calculado como mmoles de espectrina por mmoles de fósforo lipídico de la membrana eritrocitaria), pero no contempla los indicadores de esferocitosis derivados de la citometría de difracción de luz láser. No se han considerado aquí los enfermos esplenectomizados porque la exéresis del bazo modifica la expresión de la entidad al minimizar la hemólisis.

Así pues, distinguimos un grupo de cuatro pacientes de categoría grave, de edad pediátrica y sin antecedentes familiares del problema con anemia hemolítica crónica que en algunos casos requirió transfusión. En ellos el defecto repercute en los indicadores definidos con intensidad, que

denotan ser portadores de una población eritrocitaria muy heterogénea en volumen, a expensas de reticulocitos y células más o menos hiperchromas, según su grado de condicionamiento esplénico, de gran fragilidad osmótica in vitro, espontánea e incubada, cuyas curvas suelen trazar un perfil diagonal (figura 16). Esto se proyecta como anemia con reticulocitosis frecuentemente superior a  $600 \times 10^9/L$ , intensa esferocitosis en forma de HC y % Hiper muy elevados, con notable aumento de la bilirrubinemia, LDH y EPO y caída de la haptoglobina sérica. Sus contenidos de la membrana del hematíe en espectrina y ankirina están disminuidos, con cifras que en nuestras manos estriban entre 82-84% y 97% de la normalidad respectivamente y que resultan superiores a las descritas en este tipo de enfermos por otros autores: se han descrito contenidos de espectrina del 50%<sup>3,29</sup> al 70%<sup>4,44,82,143</sup>, y de ankirina del 50%<sup>29,82,143</sup>. La discordancia puede obedecer a la superior gravedad de la EH en sus pacientes o bien a la expresión biológica de genotipos distintos, puesto que nuestros casos muy probablemente corresponden a formas autosómico dominantes de penetrancia genética mayor o con interacciones genéticas desfavorables, o acaso a formas homocigotas o doblemente heterocigotas de defectos presentes en sus ascendientes. En tales enfermos suele estar indicada la esplenectomía en edad pediátrica.

El grupo de curso clínico moderado, definido por anemia hemolítica sólo ocasional y reticulocitosis por encima de  $200 \times 10^9/L$ , exhibe una considerable afectación de los indicadores referidos, por cuanto sus poblaciones eritroides son aún heterogéneas en volumen por reticulocitosis, habitualmente entre  $200 \times 10^9/L$  y  $600 \times 10^9/L$ , y una cantidad variable de células de cierta hiperchromía, cuya hemólisis hipotónica puede no ser evidente sino tras incubación, con tendencia a describir curvas caudadas<sup>38, 39,83,137,139</sup> (figura 16). A la ausencia de anemia en situación basal se une una notable esferocitosis (HC 36-37,5 g/dL y % Hiper 5-15,5%), hiperbilirrubinemia y caída de la haptoglobina variables pero discretas en general, al igual que el aumento de la EPO. La reducción registrada de los contenidos de espectrina y ankirina de la membrana eritrocitaria es análoga a la obtenida por Costa y cols. (1990)<sup>36</sup> (tablas XIV y XIX). Los enfermos de estas características no suelen necesitar la esplenectomía en edad pediátrica: en nuestra serie sólo fue así en 4 de 31 casos (12,9%) y hasta un 50% de ellos la había sufrido en edad adulta. Sin embargo, Eber y cols. (1990)<sup>44</sup> indican la esplenectomía en estos pacientes en la edad escolar, observación

probablemente debida a que clasifican como de curso moderado casos de mayor gravedad clínica, incluso con anemia crónica.

En los enfermos de la categoría leve-asintomática, sin anemia ni reticulocitosis intensa, el diagnóstico suele ser causal o a consecuencia del estudio familiar de otros casos más expresivos clinicobiológicamente. Su población de células rojas puede ser más uniforme, aunque claramente desplazada hacia la hiper Cromía como reflejan los indicadores de esferocitosis, con HC 34,5-36,5 g/dL y % Hiper 1,5-9,5%, y una fragilidad osmótica apreciable tras incubación con tendencia a dibujar curvas de tipo normal<sup>38</sup>, 39,83,137,139 (figura 16). Su ligera hemólisis puede no repercutir en los indicadores de hemólisis séricos. También es leve el déficit de espectrina que presentan, y aún más sutil el de ankirina, en su caso. Puesto que en la clasificación de nuestros casos en esta categoría se ha observado rigurosamente sólo el criterio clínico, hemos podido constatar que puede ser compatible con cifras de reticulocitos entre  $80 \times 10^9/L$  y  $300 \times 10^9/L$  en la mayoría de los enfermos. Esta observación demuestra la heterogeneidad del grupo dentro de la escasa repercusión que puede causar la entidad y que hace innecesaria la esplenectomía en los pacientes leves o asintomáticos.

Los progenitores de las EH sin historia familiar forman un grupo diverso en cuanto al estado patológico de cada individuo respecto del problema, ya que está constituido por sujetos normales y con un pequeño grado de defecto: a menudo se trata de verdaderas EH leves-asintomáticas. En general, los indicadores de hemólisis y su naturaleza y de esferocitosis no ofrecen datos significativos, si bien exhiben una cierta cifra de hemáties con concentración de hemoglobina superior a 41 g/dL, por escasa que sea y una fragilidad osmótica que puede estar sólo sutilmente aumentada. El contenido de espectrina de la membrana eritrocitaria se halla discretamente descendido en un rango aproximado a las EH leves-asintomáticas, el déficit de ankirina es más difícil de apreciar, aunque en ocasiones es notorio. Como ya se ha comentado, al menos un miembro de cada pareja progenitora muestra estos ligeros defectos, que en su descendencia cursan clínicamente de modo no más desfavorable que otras formas de clara herencia dominante. Cabe especular que corresponden a EH dominantes de penetrancia genética incompleta y variable en su transmisión vertical.

Es evidente que el espectro clinicobiológico de la EH es muy amplio e incluye casos con pequeña expresión de su defecto, que no son detecta-

dos con los medios diagnósticos tradicionales. Esto sugiere que la prevalencia real de la EH es muy probablemente superior a lo supuesto, puesto que se ignora la verdadera frecuencia de las formas leves y asintomáticas de la entidad.

## 6. CONCLUSIONES

- 1.- La EH es una entidad de expresión biológica extraordinariamente amplia, que incluye desde raras formas con hemólisis crónica grave que precisan una esplenectomía precoz hasta posiblemente más de un 40% de casos muy leves o asintomáticos, de gran dificultad diagnóstica con la metodología convencional.
- 2.- La citometría de difracción de luz láser es una tecnología extraordinariamente eficaz y precisa en el diagnóstico de la esferocitosis de la EH, merced a sus parámetros indicadores HC, Area II y sobre todo % Híper con las ventajas de tratarse de un método sencillo, rápido y objetivo por ser cuantitativo de forma directamente proporcional a la gravedad de la entidad.
- 3.- Citométricamente, junto a la posible anemia, la EH exhibe una población eritroide heterogénea integrada por reticulocitos y células rojas de hipercromía variable según su grado de condicionamiento esplénico osmóticamente frágiles. Estas características son directamente proporcionales a la gravedad del curso clínico.
- 4.- La esplenectomía en la EH corrige la anemia crónica o episódica y da lugar a una población eritrocitaria más uniforme al suprimir el condicionamiento esplénico y aminorar la hemólisis, con reducción consiguiente de la reticulocitosis. Este efecto se traduce en la normalización de la distribución de los hematíes por volumen (cuyo CV es el RDW), con disminución de la cifra de reticulocitos y de los indicadores citométricos de esferocitosis.
- 5.- La fragilidad osmótica y métodos afines son técnicas laboriosas y a menudo no lo suficientemente sensibles en el diagnóstico de la EH, que al reflejar la reducción de la relación superficie/volumen de los hematíes se comportan como indicadores de la esfericidad eritrocitaria. En este sentido, son netamente superados por los indicadores de esferocitosis obtenidos por citometría de difracción de luz láser, que representan la alternativa que puede sustituir a dichas técnicas en el diagnóstico de la EH.
- 6.- Dado que la esferocitosis no es monopolio exclusivo de la EH, el diagnóstico definitivo de esta enfermedad puede establecerse sólo si la demostración de la esferocitosis forma parte de un contexto de datos clínicos y biológicos compatibles con la EH.



- 7.- En el estudio del defecto molecular de la EH, la SDS-PAGE de los es-tromas eritrocitarios aislados es sin duda el primer eslabón, ya que es un método reproducible, eficaz y sencillo que permite estimar los con-tenidos de la membrana del hematíe en espectrina y ankirina.
- 8.- La SDS-PAGE de la membrana eritrocitaria demuestra en la EH un déficit parcial de espectrina proporcional a la gravedad del curso clí-nico de la entidad, que se acompaña hasta en un 75% de los casos de un discreto déficit parcial de ankirina. Así pues, confirmamos que el déficit combinado leve-moderado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup> Ank<sup>+</sup>) es el más prevalente en la EH.
- 9.- Al menos un miembro de cada pareja progenitora de casos de EH sin historia familiar aparente presenta un pequeño defecto únicamente evi-dente mediante SDS-PAGE de sus membranas eritrocitarias. Esta ob-servación sugiere su afectación por una EH de penetrancia genética incompleta en ellos y variable en su transmisión vertical autosómico dominante, a la vez que alude a la rareza de las verdaderas formas recesivas de la enfermedad.
- 10.- Ante la enorme diversidad de la expresión biológica de la EH, cabe reflexionar que la prevalencia real de la entidad ha de ser superior a la supuesta, ya que no se conoce la frecuencia verdadera de las EH leves y asintomáticas entre la población general.

## 7. RESUMEN

La EH es la enfermedad hemolítica hereditaria de mayor prevalencia en la población. Su transmisión es principalmente autosómico dominante con penetrancia genética variable, y presenta gran diversidad en su expresión biológica y favorable respuesta a la esplenectomía en general.

No se han identificado aún defectos primarios de la misma, pero la membrana eritrocitaria de la mayoría de los enfermos exhibe un déficit parcial de espectrina proporcional al curso clínico de la entidad y probablemente secundario a un déficit parcial de anquirina acompañante hasta en el 75% de los casos. Patogénicamente, el déficit parcial de espectrina determina que la superficie de membrana fijada a su esqueleto sea menor, produciéndose una liberación de las zonas de la bicapa lipídica no estabilizadas que causa la pérdida de la relación superficie/volumen celular característica de los esferocitos. Esta alteración se intensifica con cada paso de los hematíes a través de los cordones esplénicos.

La demostración de esta deformidad esférica es la base de la fragilidad osmótica y técnicas relacionadas, laboriosas y con frecuencia no lo suficientemente sensibles ni específicas en el diagnóstico de la EH. Además, la rigidez, la esfericidad nativa y la elevada concentración de hemoglobina del esferocito impiden la medida correcta de su volumen y de su CHCM, parámetro calculado a partir del VCM en citómetros convencionales. Estos inconvenientes dificultan particularmente el diagnóstico de las formas leves y asintomáticas de EH, forma de manifestación de la entidad probablemente en más de un 40% de los casos y que hacen incierta la prevalencia real de la EH.

Nuestro estudio de 62 enfermos de EH (19 de ellos esplenectomizados) y de 6 parejas progenitoras de casos sin historia familiar ha confirmado las características clásicas del problema, como su habitual transmisión genética dominante y su amplio espectro clínico, con un 37% de formas leves o asintomáticas y un 13% de pacientes con anemia hemolítica crónica de respuesta siempre completa a la esplenectomía. Asimismo, hemos evaluado en nuestros enfermos el rol en el diagnóstico de la EH de los indicadores de esferocitosis de la citometría de difracción de luz láser y de la SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios aislados.

Hemos demostrado que la citometría de difracción de luz láser es un

método útil, preciso y extraordinariamente eficaz para la detección objetiva de la esferocitosis de la EH, que además de ser sencillo y rápido, es cuantitativo de forma directamente proporcional a la gravedad de la entidad. Ello es posible por su capacidad de medida directa y simultánea del volumen y la concentración de hemoglobina en hematíes previamente esferificados y ligeramente fijados con glutaraldehído. De su distribución de las células rojas según concentración de hemoglobina derivan parámetros que informan de la presencia de esferocitos en una muestra, como HC, Area II y sobre todo % Hiper. Como indicadores de esferocitosis, creemos que tales parámetros citométricos superan notablemente a la fragilidad osmótica y técnicas afines, a las que pueden reemplazar en el diagnóstico de la enfermedad con obvias ventajas. Resulta inexcusable puntualizar que para el diagnóstico certero de EH es imprescindible que la demostración de la esferocitosis, en modo alguno exclusiva de ella, forme parte del conjunto de datos clínicos y de laboratorio propios de la EH.

La SDS-PAGE de los estromas eritrocitarios aislados se ha comportado como un método sencillo, eficaz y reproducible para la estimación de sus contenidos en espectrina y ankirina, por lo que en nuestra opinión constituye el primer eslabón del estudio de la base molecular de la EH. Esta técnica nos ha permitido constatar el déficit parcial de espectrina característico de la enfermedad y proporcional a su gravedad clínica, que ha resultado acompañado en un 72.6% de los enfermos de un ligero déficit parcial de ankirina. Dichos datos confirman que el defecto más prevalente en la EH es el déficit leve-moderado de espectrina y ankirina (HS Sp<sup>+</sup> Ank<sup>+</sup>), que en otros estudios ha mostrado su herencia ligada al gen de la ankirina y cuya anomalía primaria aún no ha sido caracterizada.

La situación no ha sido distinta en las EH sin historia familiar evidente, que han mostrado grados de déficit de espectrina y ankirina en la membrana eritrocitaria análogos a los observados en los casos típicamente dominantes de su mismo curso clínico. En efecto, mientras que el estudio de sus progenitores con metodología convencional y citometría de difracción de luz láser no ha ofrecido diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, éstas sí existen respecto de los contenidos de la membrana eritrocitaria en espectrina y ankirina.

Tales resultados sugieren que al menos un miembro de cada pareja progenitora presenta una forma de EH de penetrancia genética incompleta en ellos y variable en su transmisión vertical dominante. Este fenómeno muy probablemente podría darse en la mayor parte de la EH sin aparentes antecedentes familiares, subrayando la rareza de las EH de verdadera herencia autosómico recesiva. Pero estas reflexiones son especulativas, ya que la solución definitiva del dilema de la transmisión genética de la EH en estos casos sobrepasa nuestra modesta tecnología.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADDISON G.M., BEAMISH M.R., HALES C.R., et al.: An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol*, 1972; 25: 326 - 331.
- 2.- AGRE P., ORRINGER E.P., BENNETT V.: Deficient red cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N Eng J Med*, 1982; 306: 1155 - 1161.
- 3.- AGRE P., CASELLA J.F., ZINKHAM W.H., MC MILLAN C., BENNETT V.: Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature*, 1985; 314: 380 - 383.
- 4.- AGRE P., ASIMOS A., CASELLA J.F., MC MILLAN C.: Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. *N Eng J Med*, 1986; 315: 1579 - 1583.
- 5.- AGRE P., BENNETT V.: Quantitative and functional analyses of spectrin, ankyrin, band 3 and calmodulin in human red cell membranes. En: SHOHET S.B., MOHANDAS N. (eds.): *Red cell membranes. Methods in Hematology*, vol. 19, 1ª edición. New York, Churchill Livingstone, Inc., 1988; 3: 95 - 129.
- 6.- AGRE P.: Hereditary spherocytosis. *JAMA*, 1989; 262: 2887 - 2890.
- 7.- AGRE P.: Partial deficiencies of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. En: AGRE P., PARKER J.C. (eds.): *Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1989; 24: 707 - 726.
- 8.- AGRE P.: Recent advances in understanding hereditary elliptocytosis and spherocytosis. En: SPIVAK J.L., BELL W.R., NESS P.M., QUESEN-BERRY P.J., WIERNIK P.H. (eds.): *The Year Book of Hematology*, 1ª edición. Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc., 1989; 1: 45 - 49.

- 9.- ANSTEE D.J., TANNER M.J.A.: Structure and function of the red cell membrane sialoglycoproteins. *Br J Haematol*, 1986; 64: 211 - 215.
- 10.- BASTION Y., COIFFIER B., FELMAN P., et al.: Massive mediastinal extramedullary hematopoiesis in hereditary spherocytosis: a case report. *Am J Hematol*, 1990; 35: 236 - 265.
- 11.- BATOR J.M., GROVES M.R., PRICE B.J., ECKSTEIN E.C.: Erythrocyte deformability and size measured in a multiparameter system that includes impedance sizing. *Cytometry*, 1984; 5: 34 - 41.
- 12.- BECKER P.S., LUX S.E.: Hereditary spherocytosis and related disorders. *Clin Haematol*, 1985; 14: 15 - 43.
- 13.- BECKER P.S., MORROW J.S., LUX S.E.: Abnormal oxidant sensitivity and beta-chain structure of spectrin in hereditary spherocytosis associated with defective spectrin-protein 4.1 binding. *J Clin Invest*, 1987; 80: 557 - 565.
- 14.- BELL C.M., ALISTAIR C.P., MADDY A.H.: Abnormal pattern of erythrocyte ageing in hereditary spherocytosis as shown by Percoll gradient centrifugation. *Clin Chim Acta*, 1984; 142: 91 - 102.
- 15.- BENNETT V.: The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 988: 107 - 121.
- 16.- BEUTLER E.: Osmotic fragility. En: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A., LITCHMAN M.A. (eds.): *Hematology*, 4ª edición. New York, Mc. Graw-Hill, Inc., 1990; A 12: 1726 - 1728.
- 17.- BEUTLER E.: Autohemolysis. En: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A., LITCHMAN M.A. (eds.): *Hematology*, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill inc., 1990; A13: 1728 - 1729.
- 18.- BIRKENMEIER C.S., MC FARLAND-STARR E.C., BARKER J.E.: Chromosomal location of three spectrin genes: relationship to the inherited hemolytic anemias of mouse and man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 8121 - 8125.

- 19.- BODINE D.M., BIRKENMEIER C.S., BARKER J.E.: Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. *Cell*, 1984; 37: 721 - 729.
- 20.- BOLUFER P., GUILLEM S., MARTI P., AZNAR J.: Control de calidad en el laboratorio clínico. *Rev Diag Biol*, 1985; 34: 127 - 136.
- 21.- BUCX M.J.L., BREED W.P.M., HOFFMANN J.J.M.L.: Comparison of acidified glycerol lysis test, pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis: effect of incubation. *Eur J Haematol*, 1988; 40: 227 - 231.
- 22.- BULL B.S., BRETON-GORJUS J., BEUTLER E.: Morphology of the erythron. En: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A., LITCHMAN M.A. (eds.): *Hematology*, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill, Inc., 1990; 30: 297 - 316.
- 23.- BURNETTE W.N.: "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal Biochem*, 1981; 112: 195 - 203.
- 24.- CHASIS J.A., MOHANDAS N.: Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol*, 1986; 103: 343 - 350.
- 25.- CHASIS J.A., AGRE P., MOHANDAS N.: Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 1988; 82: 617 - 623.
- 26.- CHASIS J.A., SCHRIER S.L.: Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. *Blood*, 1989; 74: 2562 - 2568.
- 27.- CHILCOTE R.R., LE BEAU M.M., DAMPIER C., et al.: Association of red cell spherocytosis with deletion of the short arm of chromosome 8. *Blood*. 1987; 69: 156 - 159.

- 28.- CLARK M.R., MOHANDAS N., SHOHET S.B.: Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface mantenance. *Blood*, 1983; 61: 889 - 910.
- 29.- COETZER T.L., PALEK J.: Partial spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood*, 1986; 67: 919 - 924.
- 30.- COETZER T.L., LAWLER J., LIU S.-C., et al.: Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary spherocytosis. *N Eng J Med*, 1988; 318: 231 - 235.
- 31.- COHEN A.M., LIU S.C., DERICK L.H., et al.: Ultrastructural studies of the interaction of spectrin with phosphatidylserine liposomes. *Blood*, 1986; 68: 920 - 926.
- 32.- COHEN H., WALKER H., DELHANTY J.D.A., LUCAS S.B., HUEHNS E.R.: Congenital spherocytosis, B19 parvovirus infection and inherited interstitial deletion of the short arm of chromosome 8. *Br J Haematol*, 1991; 78: 251 - 257.
- 33.- CONBOY J., KAN Y.W., SHOHET S.B., MOHANDAS N.: Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 9512 - 9516.
- 34.- CONBOY J., CHAN J., MOHANDAS N., KAN Y. W.: Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9062 - 9065.
- 35.- COOPER R.A., JANDL J.H.: The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 1969; 48: 736 - 744.
- 36.- COSTA F.F., AGRE P., WATKINS P.C., et al.: Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane-skeleton protein ankyrin. *N Eng J Med*, 1990; 323: 1046 - 1050.
- 37.- DACIE J.V., LEWIS S.M.: Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. En: Dacie J.V., LEWIS S.M. (eds.): *Practical Haematology*, 6ª edición. Edimburgh, Churchill Livingstone, 1984; 4: 50 - 61

- 38.- DACIE J.: Hereditary spherocytosis. En: DACIE J. (ed.): The haemolytic anaemias, 3ª edición, vol. 1. The hereditary haemolytic anaemias, part 1. Edimburgh, Churchill Livingstone, 1985; 4: 134 - 205.
- 39.- DACIE J.V., LEWIS S.M., LUZZATTO L.: Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: DACIE J.V., LEWIS S.M. (eds.): Practical Haematology, 7ª edición. Edimburgh Churchill Livingstone, 1991; 14: 195 - 225.
- 40.- DAVIS J.Q., BENNETT V.: Brain ankyrin. A membrane associated protein with binding sites for spectrin, tubulin and the cytoplasmic domain of the erythrocyte anion channel. J Biol Chem, 1984; 259: 13550 - 13559.
- 41.- DELAUNAY J., ALLOISIO N., MORLÉ L., POTHIER B.: The red cell skeleton and its genetic disorders. Molec Aspects Med, 1990; 11: 161 - 241.
- 42.- DIXON W.J., BROWN M.B., ENGELMAN L., et al.: BMDP software, 1983. Berkeley California: University of California Press, 1983.
- 43.- DODGE J.T., MITCHELL C., HANAHAN D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts on human erythrocytes. Arch Biochem Biophys, 1963; 100: 119 - 130.
- 44.- EBER S.W., ARMBRUST R., SCHRÖTER W.: Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility and autohemolysis. J Pediatr, 1990; 117: 409 - 416.
- 45.- ELGSAETER A., STOKKE B.T., MIKKELSEN A., BRANTON D.: The molecular basis of erythrocyte shape. Science, 1986; 234: 1217 - 1223.
- 46.- ELKON K.B.: Isoelectric focusing of human IgA and secretory proteins using thin layer agarose gels and nitrocellulose capillary blotting. J Immunol Methods, 1984; 66: 313 - 321.

- 47.- ENGLAND J.M., van ASSENDELFT O.W.: Automated blood counters and their evaluation. En: ROWAN R.M., ENGLAND J.M. (eds.): Automation and quality assurance in Haematology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1986, 4: 87 - 128.
- 48.- ERSLEV A.J.: Reticulocyte enumeration. En: WILLIAMS J.W., BEUTLER E., ERSLEV A., LITCHMAN M.A. (eds.): Hematology, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill, Inc., 1990; A5: 1702 - 1703.
- 49.- EVANS D.J.K.: Postsplenectomy sepsis 10 years or more after splenectomy. J Clin Pathol, 1985; 38: 309 - 311.
- 50.- FAIRBANKS G., STECK T.L., WALLACH D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 1971; 10: 2606 - 2617.
- 51.- FAIRBANKS G., DINO J.E., CARTER D.P.: Electrophoretic analysis of red cell membrane proteins. En: Shohet S.B., MOHANDAS N. (eds.): Red cell membranes. Methods in Hematology, vol. 19, 1ª edición. New York, Churchill Livingstone, Inc., 1988; 2: 17 - 93.
- 52.- FARGION S., CAPPELLINI M.D., PIPERNO A., et al.: Association of hereditary spherocytosis and idiopathic hemochromatosis. A synergistic effect in determining iron overload. Am J Clin Pathol, 1986; 86: 645 - 649.
- 53.- FENNER C., TRAUT R.R., MASON D.T., WILKMAN-COFFELT J.: Quantification of coomassie blue stained proteins in polyacrylamide gels based on analyses of eluted dye. Anal Biochem, 1975, 63: 595 - 602
- 54.- FERNÁNDEZ FUERTES I., SUREDA A., VILLARRUBIA J., PASCUAL J., NAVARRO J.L.: El "Pink Test" modificado en el diagnóstico de la *esferocitosis hereditaria*. Sangre, 1989; 34: 509 - 513.
- 55.- FERRANT A.: The role of spleen in haemolysis. Clin Haematol, 1983; 12: 489 - 504.

- 56.- FERREIRA J.A., FELIÚ E., ROZMAN C., et al.: Morphologic and morphometric light and electron microscopic studies of the spleen in patients with hereditary spherocytosis and autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, 1989; 72: 246 - 253.
- 57.- FIORE M., MITCHELL J., DOAN T., et al.: The Abbott IMx™ Automated Benchtop Immunochemistry Analyzer system. *Clin Chem*, 1988; 34: 1726 - 1732.
- 58.- FRIEDMAN E.W., WILLIAMS J.C., VAN HOOK L.: Hereditary spherocytosis in the elderly. *Am J Med*, 1988; 84: 513 - 516.
- 59.- FUKUSHIMA Y., BYERS M.G., WATKINS P.C., WINKELMANN J.C., FORGET B.G., SHOWS T.B.: Assignment of the gene for beta-spectrin (SPTB) to chromosome 14q23 .... 14q24.2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1990; 53: 232 - 233.
- 60.- GACZYŃSKA M., BARTOSZ G., JUDKIEWICZ L., ROSIN J.: Abnormal degradation of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta*, 1987; 168: 7 - 11.
- 61.- GACZYŃSKA M., BARTOSZ G., JUDKIEWICZ L.: Changes in proteolytic susceptibility of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta*. 1991; 198: 267 - 270.
- 62.- GALEN R.S.: Predictive value of immunodiagnostic cancer tests. En: HERBERMAN R. B., MERCER D.W. (eds.): *Immunodiagnosis of cancer*, 2ª edición. New York, Marcel Dekker Inc., 1990, 1: 3 - 11.
- 63.- GARCIA J.F., EBBE S.N., HOLLANDER L., CUTTING H.O., MILLER M.E., CRONKITE E.P.: Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J Lab Clin Med*, 1982; 99: 624 - 635.
- 64.- GILSANZ F., RICARD M.P., DE LA SERNA F.J., AURAY M.C., GARCIA MARCILLA A.: Utilidad de la citometría basada en la difracción de un haz de luz laser en la valoración de la esferocitosis. *Sangre*. 1989; 34: 263 - 266.

- 65.- GODAL H.C., HEIST H.: High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian blood donors. *Scand J Haematol*, 1981; 27: 30 - 34.
- 66.- GODAL H.C., GJONNES G., RUYTER L.: Does preincubation of the red blood cells contribute to the capability of the osmotic fragility test to detect very mild forms of hereditary spherocytosis? *Scand J Haematol*, 1982; 29: 89 - 93.
- 67.- GODFREY K.: Comparing the means of several groups. *N. Eng J Med*, 1985; 313: 1450 - 1457.
- 68.- GOLDMAN L.: Quantitative aspects of clinical reasoning. En: BRAUNWALD E., ISSELBACHER K.J., PETERSDORF R.G., WILSON J.D., MARTIN J.B., FAUCI A.S. (eds.): *Harrison's principles of internal medicine*, 11ª edición. New York, Mc Graw Hill Book Company, 1987; 2: 5 - 11.
- 69.- GOODMAN S.R., SHIFFER K.A., CASORIA L.A., EYSTER M.E.: Identification of the molecular defect in the erythrocyte membrane skeleton in some kindreds with hereditary spherocytosis. *Blood*, 1982; 60: 772 - 784.
- 70.- GOODMAN S.R., YU J., WHITFIELD C.F., et al.: Erythrocyte membrane skeletal protein bands 4.1 a and b are sequence-related phosphoproteins. *J Biol Chem*, 1982; 257: 4564 - 4569.
- 71.- GRACIE W.A., RANSAHOFF D.E.: The natural history of gallstones: the innocent gallstone is not a myth. *N Eng J Med*, 1982; 307: 798 - 800.
- 72.- GREENQUIST A.C., SHOHET S.B., BERNSTEIN S.E.: Marked reduction of spectrin in hereditary spherocytosis in the common house mouse. *Blood*, 1978; 51: 1149 - 1155.
- 73.- GRONER W.: Standardization of multiparameter instruments for blood cell counting and sizing. En: CAVILL I. (ed.): *Methods in Hematology. Quality control*, 2ª edición. Edimburgh, Churchill Livingstone, 1990. 3: 31 - 53.

- 74.- HALL T.G., BENNETT V.: Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem*, 1987; 262: 10537 - 10545.
- 75.- HANADA T., KOIKE K., TAKEYA T., HAGASAWA T., MATSUNAGA Y.; TAKITA H.: Human parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, 1988; 70: 113 - 115.
- 76.- HANSPAL M., PALEK J.: Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors. *J Cell Biol*, 1987; 105: 1417 - 1424.
- 77.- HANSPAL M., YOON S.-H., YU H., et al.: Molecular basis of spectrin and ankyrin deficiencies in severe hereditary spherocytosis: evidence implicating a primary defect of ankyrin. *Blood*, 1991; 77: 165 - 173.
- 78.- HO-YEN D.O.: Hereditary spherocytosis presenting in pregnancy. *Acta Haematol*, 1984; 72: 29 - 33.
- 79.- HUEBNER K., PALUMBO A.P., ISOBE M., et al.: The alpha-spectrin gene is on chromosome 1 in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3790 - 3793.
- 80.- HURST D., VICHINSKY E.P.: Splenectomy indications in childhood. En: POCHEDLY C., SILLS R.H., SCHWARTZ A.D. (eds.): *Disorders of the spleen. Pathophysiology and management*. New York, Marcel Dekker, 1989, 407.
- 81.- IDEGUCHI H., NISHIMURA J., NAWATA H., HAMASAKI N.: A genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, 1990; 74: 347 - 353.
- 82.- IOLASCON A., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., CAMASCHELLA C., et al.: Ankyrin deficiency in dominant hereditary spherocytosis: report of three cases. *Br J Haematol*, 1991; 78: 551 - 554.

- 83.- JANDL J.H.: Hemolytic anemias caused by primary defects of red cell membranes. Hereditary spherocytosis. En: JANDL J.H. (ed.): Blood. Textbook of Hematology, 1ª edición. Boston, Little, Brown and Company, 1987; 7: 237 - 243.
- 84.- JAROLIM P., KORSGREN C., COHEN C.M., et al.: Molecular basis of partial deficiency of protein 4.2 in atypical hereditary spherocytosis: a defect involving the cytoplasmic domain of the anion transport protein. Blood, 1989; 74 (Suppl 1): 137a.
- 85.- JAROLIM P., RUFF P., COETZER T.L., et al.: A subset of patients with dominantly inherited spherocytosis has a marked deficiency of the band 3 protein. Blood, 1990; 76 (Suppl 1): 37a.
- 86.- JENSEN O.M., KRISTENSEN J.: Red pulp of the spleen in autoimmune hemolytic anaemia and hereditary spherocytosis: morphometric light and electron microscopy studies. Scand J Haematol, 1986; 36: 263 - 266.
- 87.- JOINER C.H., LUX S.E.: Cation permeability is increased in spectrin deficient mouse red cells. Blood, 1982; 60 (Suppl 1): 21a.
- 88.- JUDKIEWICZ L., SZCZEPANEK A., BUGALA I., BARTOSZ G.: Modified end-point glycerol hemolysis assay as a screening test for hereditary spherocytosis that requires no venipuncture. Am J Hematol, 1987; 26: 89 - 91.
- 89.- JUDKIEWICZ L., BUGALA I., BARTOSZ G.: "Pink test" and osmotic fragility test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: another view. Eur J Haematol, 1989; 42: 217.
- 90.- KERKER M.: The scattering of light and other electromagnetic radiation. Academic New York, 1969; 3.
- 91.- KIM Y.R., ORNSTEIN L.: Isovolumetric sphering of erythrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. Cytometry, 1983; 3: 419 - 427.

- 92.- KITATANI M., CHIYO H., OZAKI M., SHIKE S., MIWA S.: Localization of the spherocytosis gene to chromosome segment 8p11.22→8p21.1. *Hum Genet*, 1988; 78: 94 - 95.
- 93.- KORSGREN C., COHEN C.M.: Associations of human erythrocyte band 4.2: binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. *J Biol Chem*, 1988; 263: 10212 - 10218.
- 94.- KYHSE-ANDERSEN J.: Simple Gel-Drying-Frame for drying multiple slab gels. En: SCHAFER-NIELSEN C. (ed.): *Electrophoresis 88. Proceedings of the Sixth Meeting of The International Electrophoresis Society*, 1988, Jul 4-7; Copenhagen. The Protein Laboratory, University of Copenhagen, VCH Verlagsgesellschaft mbH., Weinheim, 1988; 446 - 450.
- 95.- LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680 - 685.
- 96.- LAMBERT S., YU H., PRCHAL J.T., et al.: The cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 1730 - 1734.
- 97.- LAWLER J., LIU S.-C., PALEK J., PRCHAL J.: A molecular defect of spectrin in a subset of patients with hereditary elliptocytosis: alterations in the  $\alpha$ -subunit domain involved in spectrin self-association. *J Clin Invest*, 1984; 73: 1688 - 1695.
- 98.- LAZARIDES E., NELSON W.J.: Expression of spectrin in nonerythroid cells. *Cell*, 1982; 31: 505 - 508.
- 99.- LAZARIDES E.: From genes to structural morphogenesis: the genesis and epigenesis of a red blood cell. *Cell*, 1987; 51: 345 - 356.
- 100.- LEFRERE J.J., COUROUCE A.M., GIROT R., BERTRAND Y., SOULIER J.T.: Six cases of hereditary spherocytosis revealed by human parvovirus infection. *Br J Haematol*, 1986; 62: 653 - 658.
- 101.- LETO T.L., FORTUGNO-ERICKSON D., BARTON D., et al.: Comparison of nonerythroid alpha-spectrin genes reveals strict homology among diverse species. *Mol Cell Biol*, 1988; 8: 1 - 9.

- 102.- LING E., DANILOV Y.N., COHEN C.M.: Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem*, 1988; 263: 2209 - 2216.
- 103.- LIU S.C., DERICK L.H., DUQUETTE M.A., PALEK J.: Separation of the lipid bilayer from the membrane skeleton in the spicules of echinocytic red cell (RBC) ghosts. *Blood*, 1987; 70 (Suppl 1): 41 a.
- 104.- LIU S.C., DERICK L.H., PALEK J.: Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol*, 1987; 104: 527 - 536.
- 105.- LIU S.C., DERICK L.H., PALEK J.: Surface area density of membrane skeleton (MS) in normal red cells and severe hereditary spherocytosis (HS): role in lipid bilayer destabilization. *Blood*, 1988; 72 (Suppl 1): 31 a.
- 106.- LIU S.C., DERICK L.H., AGRE P., PALEK J.: Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood*, 1990; 76: 198 - 205.
- 107.- LOW P.S.: Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of the erythrocyte membrane peripheral protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 864: 145 - 167.
- 108.- LOW M.G., SATIEL A.R.: Structural and functional roles of glycosyl-fosfatidilinositol in membranes. *Science*, 1988; 234: 268 - 275.
- 109.- LUBIN B., CHIU D., SCHWARTZ R.S., et al.: Abnormal membrane phospholipid organization in spectrin deficient human red cells. *Blood*, 1983; 62 (Suppl 1): 34 a.
- 110.- LUBIN B.H.: Reference values in infancy and childhood. En: NATHAN D.G., OSKI F.A. (eds.): *Hematology of infancy and childhood*, 3ª edición. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1987; appendix: 1677 - 1697.
- 111.- LUTZ H.U., LIU S., PALEK J.: Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. Characterization of spectrin free vesicles. *J Cell Biol*, 1977; 73: 548 - 560.

- 112.- LUX S.E.: Disorders of the red cell membrane. En: NATHAN D.G., OSKI F.A. (eds.): Hematology of infancy and childhood, 3ª edición. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1987; 17: 443 - 544.
- 113.- LUX S.E., BECKER P.S.: Disorders of the red cell membrane skeleton: hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. En: SCRIVER C.R., BEAUDET A.L., SLY W.S., VALLE D. (eds.): The metabolic basis of inherited disease, 6ª edición. New York, McGraw-Hill International Book Co., 1989, 2367 - 2408.
- 114.- LUX S.E., JOHN K.M., KOPITO R.R., et al.: Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion exchange protein (AE1). Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 9089 - 9093.
- 115.- LUX S., BEDROSIAN C., SHALEV O., et al.: Deficiency of band 3 in dominant hereditary spherocytosis with normal spectrin content. Clin Res, 1990; 38: 300a.
- 116.- LUX S.E., TSE W.T., MENNINGER J.C., et al.: Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. Nature, 1990; 345: 736 - 739.
- 117.- MANNO C.S., COHEN A.R.: Splenectomy in mild hereditary spherocytosis: is it worth the risk?. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1989; 11: 300 - 303.
- 118.- MARCHESI S.L.: The erythrocyte cytoskeleton in hereditary elliptocytosis and spherocytosis. En: AGRE P., PARKER J.C. (eds.): Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications. New York, Marcel Dekker, Inc., 1989; 4: 77 - 110.
- 119.- MARCHESI S.L., AGRE P., SPEICHER .W., TSE W.T., FORGET B.G.: Mutant spectrin  $\alpha$ II domain in recessively inherited spherocytosis. Blood, 1989; 74 (Suppl 1): 182a.
- 120.- DE MATTEIS M.C., DE ANGELIS V., SORRENTINO F., BONOLLO E., VETTORE L.: Role of spleen in hereditary spherocytosis: evidence for increased in vitro proteolysis of red cell membrane. Br J Haematol, 1991; 79: 108 - 112.

- 121.- MIRAGLIA DEL GIUDICE E., IOLASCON A., PERROTTA S., CAPPELLINI M.D., FIORELLI G., CUTILLO S.: Red cell membrane alteration involving band 3 protein partial deficiency in a kindred with hereditary spherocytosis. *Schweiz Med Wschr*, 1991; 121 (Suppl 43): 162.
- 122.- MIRAGLIA DEL GIUDICE E., PERROTTA S., PINTO L., et al.: Hereditary spherocytosis characterized by increased spectrin/band 3 ratio. *Br J Haematol*, 1992; 80: 133 - 134.
- 123.- MISCHE S.M., MOOSEKER M.S., MORROW J.S.: Erythrocyte adducin: a calmodulin-regulated actin-bundling protein that stimulates spectrin-actin binding. *J Cell Biol*, 1987; 105: 2837 - 2845.
- 124.- MOHANDAS N., CLARK M.R., JACOBS M.S., SHOHET S.B.: Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest*, 1980; 66: 563 - 573.
- 125.- MOHANDAS N., CLARK M.R., KISSINGER S., BAYER C., SHOHET S.B.: Inaccuracies associated with the automated measurement of mean cell hemoglobin concentration in dehydrated cells. *Blood*, 1980; 56: 125 - 126.
- 126.- MOHANDAS N., CLARK M.R., HEALTH B.P., et al.: A technique to detect reduced mechanical stability of red cell membrane: relevance to elliptocytic disorders. *Blood*, 1982; 59: 768 - 774.
- 127.- MOHANDAS N., CHASIS J.A., SHOHET S.B.: The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. *Semin Hematol*, 1983; 20: 225 - 242.
- 128.- MOHANDAS N., KIM Y.R., TYCKO D.H., ORLIK J., WYATT J., GRONER W.: Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood*, 1986; 68: 506 - 513.
- 129.- MOHANDAS N.: The red cell membrane. En: HOFFMAN R., BENZ E.J., SHATTILL S.J., FURIE B., COHEN H.J.: *Hematology. Basic principles and practice*, 1ª edición. New York, Churchill Livingstone, 1991, 22: 264 - 269.

- 130.- MOISEYEV V.S., KOROVINA E.A., POLOTSKAYA E.L., POLIYANSKAYA I.S., YAZDOVSKY V.V.: Hypertrophic cardiomyopathy associated with hereditary spherocytosis in three generations of one family. *Lancet*, 1987; 2: 853 - 854.
- 131.- MORLÉ L., POTHIER B., ALLOISIO N., et al.: Red cell membrane alteration involving protein 4.1 and protein 3 in a case of recessively inherited haemolytic anaemia. *Eur J Haematol*, 1987; 38: 447 - 455.
- 132.- NAGEL R.L.: Red-cell cytoskeletal abnormalities-implications for malaria. *N. Eng J Med*, 1990; 323: 1558 - 1559.
- 133.- ORRINGER E.P.: A further characterization of the selective K movements observed in human red blood cells following acetylphenylhydrazine exposure. *Am J Hematol*, 1984; 16: 355 - 366.
- 134.- OTTO E., MC LAUGHLIN T., LUX S.E., et al.: Isolation and sequence of a human brain ankyrin cDNA: evidence for a multigene family. *J Cell Biol*, 1989; 109: 264a.
- 135.- PALEK J., LUX S.E.: Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin Hematol*, 1983; 20: 189 - 224.
- 136.- PALEK J.: Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Rev*, 1987; 1: 147 - 168.
- 137.- PALEK J.: Hereditary spherocytosis. En: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A., LIGHTMAN M.A. (eds.): *Hematology*, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill, Inc., 1990; 55: 558 - 568.
- 138.- PALEK J., LAMBERT S.: Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol*, 1990; 27: 290 - 332.
- 139.- PALEK J.: Red cell membrane disorders. En: HOFFMAN R., BENZ E.J., SHATTIL S.J., FURIE B., COHEN H.J.: *Hematology. Basic principles and practice*, 1ª edición. New York, Churchill Livingstone, 1991. 36: 472 - 504.

- 140.- PATI A.R., PATTON W.N., HARRIS R.I.: The use of the Technicon H1 in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Lab Haematol*, 1989; 11: 27 - 30.
- 141.- PETIT J.J., ESTANY C.: Case report: mediastinal extramedullary erythropoiesis in hereditary spherocytosis. *Clin Lab Haematol*, 1987; 9: 327 - 332.
- 142.- PONDER E.: Hemolysis and related phenomena. New York, Grune & Stratton, 1948.
- 143.- PRCHAL J.T., MORLEY B.J., YOON S.-H., et al.: Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte  $\beta$ -spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7468 - 7472.
- 144.- RANSOHOFF D.F., FEINSTEIN A.R.: Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. *N Eng J Med*, 1978; 299: 926 - 930.
- 145.- RITZMANN S.E., DANIELS J.C. (eds.): Serum protein abnormalities. Diagnostic and clinical aspects. Boston, Little, Brown and Company, Inc., 1975.
- 146.- RUTHERFORD C.J., POSTLEWRIGHT B.F., HALLOWES M.: An evaluation of the acidified glycerol lysis test. *Br J. Haematol*, 1986; 63: 119 - 121.
- 147.- RYBICKI A.C., HEATH R., LUBIN B., et al.: Human erythrocyte protein 4.1 is a phosphatidylserine binding protein. *J. Clin Invest*, 1988; 81: 255 - 260.
- 148.- RYBICKI A.C., HEATH R., WOLF J.L., et al.: Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane. *J. Clin Invest*, 1988; 81: 893 - 901.
- 149.- SCHRIER S.L.: Red cell membrane biology-introduction. *Clin Hematol*, 1985; 14: 1 - 12.

- 150.- SCHROIT A.J., MADSEN J.W., TANAKA Y.: In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem*, 1985; 260: 5131 - 5138.
- 151.- SCHWARTZ P.E., STERIOFF S., MUCHA P., MELTON L.J., OFFORD K.P.: Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. *JAMA*, 1982; 248: 2279 - 2283.
- 152.- SCHWARTZ D. (ed): Métodos estadísticos para médicos y biólogos. Monografías de bioestadística y psicología matemática, vol. 7. Barcelona, Herder S.A., 1985.
- 153.- SCHWARTZ R.S., RYBIKI A.C., HEATH R., et al.: Immunoreactive forms of human erythrocyte protein 4.2 are present in non-erythroid cells and tissues. *Blood*, 1987; 70 (Suppl 1): 42a.
- 154.- SCHWARTZ S.I.: Spleen. En: SCHWARTZ S.I., SHIRES G.T., SPENCER F.C., COWLES HUSSER W.: Principles of Surgery, 5ª edición. New York, Mc Graw-Hill Book Co., 1989, 33: 1441 - 1457.
- 155.- SEDMAK J.J., GROSSBERG S.E.: A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, 1977; 79: 544 - 552.
- 156.- SEGURO O.G., ARNAIZ-VILLENA A.: Two BF F subtypes, but no BF S, BF F1 or BF SO7 subdivision, are found by isoelectric focusing. *Vox Sang*, 1989; 56: 117 - 121.
- 157.- SHEETZ M.P.: Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins and shape. *Semin Hematol*, 1983; 20: 175 - 188.
- 158.- SHEN B.W.: Ultrastructure and function of membrane skeleton. En: AGRE P., PARKER J.C.: Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications. New York, Marcel Dekker, Inc., 1989; 10: 261 - 297.
- 159.- SHOHET S.B., BEUTLER E.: The red cell membrane. En: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A., LICHTMAN M.A. (eds.): Hematology, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill, Inc., 1990; 36: 368 - 377.

- 160.- SIEGEL D.L., GOODMAN S.R., BRANTON D.: The effect of endogenous proteases on the spectrin binding proteins of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1980; 598: 517 - 527.
- 161.- SIEGEL D.L., BRANTON D.: Partial purification and characterization of an actin-binding protein, band 4.9, from human erythrocytes. *J Cell Biol*, 1985; 100: 775 - 785.
- 162.- SIEGEL S.: Diseño experimental no paramétrico aplicado a las ciencias de la conducta, 2ª edición. México, Ed. F. Trillas, 1978.
- 163.- SMEDLEY J.C., BELLINGHAM A.J.: Current problems in haematology 2: hereditary spherocytosis. *J Clin Pathol*, 1991; 44: 441 - 444.
- 164.- SPEICHER D.W., MORROW J.S., KNOWLES W.J., MARCHESI V.T.: A structural model of human erythrocyte spectrin: alignment of chemical and functional domains. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9093 - 9101.
- 165.- SPEICHER D.W.: The present status of erythrocyte spectrin structure: the 106-residue repetitive structure is a basic feature of an entire class of proteins. *J. Cell Biochem*, 1986; 30: 245 - 248.
- 166.- STECK T.L.: Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. *J Mol Biol*, 1972; 66: 295 - 305.
- 167.- STREICHMAN S., COHEN S., TATARSKY I.: Glucose induced hemolysis of spheric red blood cells in hereditary spherocytosis: new aspects of the autohemolysis test. *Am J Clin Pathol*, 1984; 81: 122 - 127.
- 168.- STREICHMAN S., KAHANA E., TATARSKY I.: Hypertonic cryohemolysis of pathologic red blood cells. *Am J Hematol*, 1985; 20: 373 - 381.
- 169.- STREICHMAN S., GESHEIDT Y., TATARSKY I.: Hypertonic cryohemolysis: a diagnostic test for hereditary spherocytosis. *Am J Hematol*, 1990; 35: 104 - 109.
- 170.- TANG K.T., LETO T.L., CORREAS I., et al.: Selective expression of an erythroid specific isoform of protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 3713 - 3717.

- 171.- THOM R.: Automated red cell analysis. En: CAVILL I. (ed.): Advancing haematological techniques. Bailliere's Clin Haematol, 1990; 3: 837 - 850.
- 172.- TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76: 4350 - 4354.
- 173.- TYCKO D.H., METZ M.H., EPSTEIN E.A., GRINBAUM A.: Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. J Appl Optics, 1985; 24: 1355 - 1365.
- 174.- VERCELLOTTI G.M., VAN ASBECK B.S., JACOB H.S.: Oxygen radical-induced erythrocyte hemolysis by neutrophils. Critical role of iron and lactoferrin. J Clin Invest, 1985; 76: 956 - 962.
- 175.- VETTORE L., ZANELLA A., MOLARO G.L., DE MATTEIS C., PAVESI M., MARIANI M.: A new test for the laboratory diagnosis of spherocytosis. Acta Haematol, 1984; 72 : 258 - 263.
- 176.- WAGNER G.M., CHIU D.T-Y., QJU J.-H., HEATH R.H., LUBIN B.H.: Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. Blood, 1987; 69: 1777 - 1781.
- 177.- WALLEVIK K., JENSENIUS J.C.: A simple and reliable method for the drying of polyacrylamide slab gels. J Biochem Biophys Methods, 1982; 6: 17 - 21.
- 178.- WALLIN R., CULP E.N., COLEMAN D.B., et al.: A structural model of human erythrocyte band 2.1: alignment of chemical and functional domains. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 4095 - 4099.
- 179.- WAUGH R.E., AGRE P.: Reductions of erythrocyte membrane viscoelastic coefficients reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. J Clin Invest, 1988; 81: 133 - 141.
- 180.- WEISS L.: The red pulp of the spleen: structural basis of blood flow. Clin Haematol, 1963; 12: 375 - 393.

- 181.- WILHELM M.C., JONES R.E., MC GEHEE R., MITCHENER J.S., SANDUSKY W.R., HESS C.E.: Splenectomy in hematologic disorders: The ever-changing indications. *Aun Surg*, 1988; 207: 581 - 589.
- 182.- WILLEY J.S.: Red cell survival studies in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 1970; 49: 666 - 672.
- 183.- WILLEY J.S.: Hereditary spherocytosis, elliptocytosis and related disorders. En: BRAIN M.C., CARBONE P.P.: *Current therapy in Hematology-Oncology - 3*. Ontario, B.C. Decker Inc., 1988, 21 - 23.
- 184.- WILLIAMS J.W.: Polychrome staining. En: WILLIAMS J.W., BEUTLER E., ERSLEV A., LICHTMAN M.A. (eds.): *Hematology*, 4ª edición. New York, Mc Graw-Hill, Inc., 1990; A2: 1699 - 1770.
- 185.- WINKELMANN J.C., COSTA F.F., FORGET B.G.: Molecular cloning of the cDNA for human skeletal muscle  $\beta$  spectrin: evidence for tissue specific differential processing of 3'b spectrin pre-mRNA. *Blood*, 1988; 72 (Supple 1): 35a.
- 186.- WOLFE L.C., JOHN K.M., FALCONE J.C., BYRNE A.M., LUX S.E.: A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. *N Eng J Med*, 1982; 307: 1367 - 1374.
- 187.- WOODS C.M., LAZARIDES E.: Degradation of unassembled alpha-and beta-spectrin by distinct intracellular pathways: regulation of spectrin topogenesis by beta-spectrin degradation. *Cell*, 1985; 40: 959 - 969
- 188.- YOUNG N., HARRISON M., MOORE J., MORTIMER P., HUMPHRIES R.K.: Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *J Clin Invest*, 1984; 2024 - 2032.
- 189.- YOUNG N.: Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol*, 1988; 25: 159 - 172.
- 190.- ZACHÉE P., BOOGAERTS M.A., HELLEMANS L., SNAUWAERT J.: Adverse role of the spleen in hereditary spherocytosis: evidence by the use of the use of the atomic force microscope. *Br J Haematol*, 1992; 80: 264 - 265.

- 191.- ZERHOUNI F., GUETARNI D., HENNI T., COLONNA P.: Occurrence and characteristics of hereditary spherocytosis in Algeria. Eur J Haematol, 1991; 47: 42 - 47.