Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados

Crisp, Renée Leonor

2014-12-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Crisp, Renée Leonor. (2014-12-18). Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Crisp, Renée Leonor. "Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-18.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

"Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados"

Tesis presentada para optar por el título de Doctor

de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Autor: **Renée Leonor Crisp**

Directora: Dra. Alcira B. Nesse
Consejera de estudios: Dra. Cecilia Varone

Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas
Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina – FCEyN-UBA
Buenos Aires, 2014

Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados

La Esferocitosis Hereditaria (ESH) es una anemia hemolítica de observación frecuente, caracterizada por alteraciones cuali y/o cuantitativas –genéticamente determinadas– de las proteínas de la membrana eritrocitaria. Consecuentemente, se debilita la unión entre la membrana eritrocitaria y el citoesqueleto subyacente, produciéndose la pérdida progresiva de la membrana con formación de hematíes de forma esférica, osmóticamente frágiles, que son selectivamente atrapados y destruidos en el bazo. Muchas alteraciones en diferentes genes pueden generar la misma enfermedad. Clínicamente se caracteriza por anemia, ictericia y esplenomegalia.

La ESH es la anemia hemolítica hereditaria más frecuente en Argentina. A pesar de ello, es muy escasa la información sobre su comportamiento en nuestro país. Los objetivos de esta tesis son: a) Investigar avances en la metodología de diagnóstico a partir del análisis e implementación de nuevas pruebas que han sido desarrolladas durante la última década; b) Establecer aspectos demográficos de la ESH en la población atendida por nuestro grupo de trabajo; c) Dilucidar algunos mecanismos involucrados en la enfermedad.

En este trabajo se utilizaron las pruebas tradicionales (fragilidad osmótica eritrocitaria y prueba de autohemólisis) y se desarrollaron por primera vez en nuestro país las nuevas pruebas diagnósticas (citometría de flujo con 5'eosina maleimida, criohemólisis hipertónica y fragilidad osmótica por citometría de flujo) estableciendo sus puntos de corte, sensibilidad, especificidad y valores predictivos. El análisis de los resultados de los ensayos electroforéticos de las membranas eritrocitarias permitió establecer que las deficiencias de espectrina y ankirina son las prevalentes en nuestra población. En los casos en que fue posible, el estudio se extendió al grupo familiar primario pudiendo detectar portadores sanos y establecer el patrón de herencia.

Para poder realizar el diagnóstico en forma precoz, se desarrollaron las nuevas pruebas utilizando sangre capilar, estableciendo la presencia de la patología en neonatos de hasta 2 días de vida.

El seguimiento clínico permitió observar la alta frecuencia de crisis hemolíticas asociadas a episodios febriles por lo que se decidió evaluar la posibilidad de que el agravamiento de la anemia fuera debido, en parte, a un efecto directo de la temperatura sobre los esferocitos. Se pudo observar que la hipertermia induce eriptosis mediada por la entrada de calcio a la célula, lo que podría contribuir al empeoramiento de la anemia o al desarrollo de la misma en individuos asintomáticos.

La heterogeneidad clínica no pudo relacionarse al tipo de alteración proteica ni a los resultados de las pruebas diagnósticas. En la búsqueda de una alteración en común que pudiera correlacionar con la severidad de la anemia encontramos una expresión disminuida de acuaporina 1 (AQP-1), canal

responsable del flujo de agua en el eritrocito, independientemente de la proteína de membrana afectada.

El trabajo de tesis presentado implica un avance metodológico por haber desarrollado las nuevas técnicas diagnósticas en nuestro país y haber establecido la equivalencia para realizar los estudios con sangre capilar, conduciendo a un diagnóstico certero y precoz en los neonatos. Los antecedentes y el seguimiento clínico permitieron describir el comportamiento de la enfermedad en los pacientes pertenecientes a nuestra población.

Por otra parte, los estudios *in vitro*, que mostraron sensibilidad de los eritrocitos de los pacientes a la temperatura y asociación de la disminución de AQP-1 en eritrocitos con la severidad de la enfermedad, abren un nuevo camino en la investigación de la esferocitosis hereditaria con una potencial aplicación terapéutica a futuro.

Palabras claves: Esferocitosis Hereditaria, eriptosis, acuaporina 1, proteínas de membrana, anemia hemolítica.

Hereditary spherocytosis: advance in diagnostic methodology, demographic studies, and research on involved mechanisms

Hereditary spherocytosis (HS) is a common hemolytic anemia, characterized by genetically determined quantitative and/or qualitative abnormalities of the red cell membrane proteins. As a consequence, the connection of skeleton and bilayer gets weakened, loss of membrane surface occurs and changes in red cell lead to the formation of spherical, osmotically fragile erythrocytes, which are selectively trapped and destroyed in the spleen. Diverse mutations in different genes can generate the same disease. HS is characterized by anemia, jaundice, and splenomegaly.

Although HS is the most common hereditary hemolytic anemia in Argentina, information concerning its behavior in our country is very scarce. Aims of this thesis are: a) To evaluate advances on diagnostic methodology since the development of new diagnostic tests described throughout the last decade; b) To establish demographics characteristics of HS in the population attended by our working group; c) To elucidate some mechanisms involved in the disease.

In this study, standard screening tests –osmotic fragility and autohemolysis– and novel diagnostic tests –eosin-5'maleimide flow cytometry, hypertonic cryohemolysis, and flow cytometric osmotic fragility– were carried out. As these new diagnostic techniques were developed for the first time in our country, their cut-off points, sensitivity and specificity were established. Electrophoresis of membrane proteins established that spectrin and ankyrin are the most frequently found deficiencies in our population. As far as possible, direct relatives were also studied, allowing to detect silent carriers and to establish the inheritance pattern.

Novel tests were also developed using capillary blood, to accomplish an earlier diagnosis. So, HS could be diagnosed in neonates aged only 2 days.

Patients' follow-up showed a high frequency of hemolytic crisis associated to febrile diseases. Therefore, we decided to evaluate whether the temperature increment on spherocytes may be one factor responsible for the worsening of hemolysis. Results showed that hyperthermia induced eriptosis mediated by calcium influx to the erythrocyte, which could play a role either for anemia worsening or for anemia development in previously asymptomatic individuals.

No correlation between severity of the disease and either deficient protein or results of diagnostic tests could be demonstrated. Searching for an unique factor associated with severity of anemia, a decreased expression of aquaporin-1 (AQP-1), the channel responsible of water influx in the erythrocyte, was found irrespectively of the type of protein deficiency.

This thesis implies a methodological advance due to the development for the first time in Argentina of the novel diagnostic tests, as well as the demonstration that they can also be performed with

capillary blood, allowing an early and accurate diagnosis in neonates and small infants. Antecedents and clinical follow-up enabled to establish the behavior of the disease in the population of our country.

Furthermore, results of *in vitro* studies showing a harmful effect of hyperthermia on erythrocytes of patients, and association of AQP-1 decrease with severity of the disease, open a new way on HS research with potential future applications.

Key words: Hereditary Spherocytosis, eriptosis, aquaporin 1, membrane proteins, hemolytic anemia

AGRADECIMIENTOS

- A mi padre, **Dennis Clifford Crisp**, que esperó tanto este momento. Gracias por todos los valores que me inculcaste. La paciencia, la perseverancia y el sacrificio fueron de gran utilidad en este trayecto.

- A mi marido, **Dr Hugo Donato**, por ser mi sostén emocional y científico. Sin tu ayuda no lo hubiera podido lograr.

- Al Comité de Bioética del **Hospital Nacional Prof. A. Posadas** por aprobar y apoyar este estudio, en particular al **Dr Carlos Apesteguía** por mostrar satisfacción con cada avance logrado.

- A la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires**, a la cual tengo el orgullo de pertenecer.

- A los pacientes, familiares y donantes. Su colaboración es fundamental para todo estudio.

- A la **Dra Beatriz Sassetti** por recordarme siempre que debía y podía cumplimentar esta etapa.

- A mi directora de tesis, **Dra Alcira Nesse**, que supo conducir con un fino equilibrio a un profesional formado.

- A **Graciela Alfonso**, Jefa del Servicio de Hematología, por permitirme desarrollar este proyecto en el ámbito de nuestro Servicio.

- A **Liliana Solari** y **Daniel Gammella** (Citometría de Flujo), quienes siempre tuvieron un Sí! por respuesta, constituyendo un pilar fundamental de estos estudios.

- A los médicos, por la confianza y la participación en este trabajo: **Eliana García** (Oncohematología Pediátrica), **Sergio Caldarola** y **Gabriela Miguez** (Hemoterapia), **María Cristina Rapetti** (Hematología – Hospital del Niño de San Justo) y todos aquellos que derivaron a sus pacientes para participar en el estudio.

- Al excelente cuerpo técnico que colaboró desinteresadamente, aún en los días en que el trabajo desbordaba: **Roxana**, **Ariel**, **Patricia** y **Karina** de Oncohematología Pediátrica y a todos y cada uno de los **técnicos de Hemoterapia**.

- A **Daiana** y a **Maru**, por tanta energía y cariño compartido, las sentí siempre "codo a codo".

- A mis hijos **Alan**, **Brian**, **Jennifer** e **Ian** que supieron comprender que mamá no siempre estaba disponible.

- A mis nietos **Alma** y **Bastian** que se conformaron con menos horas de juegos y cuentos.

- A quien me dijo que no podía hacer su doctorado si yo no lo hacía primero, fue un gran incentivo, pero ahora...es tu turno!

A mi maestro

Dr Osvaldo N. Gioseffi

INDICE

INDICE **1**

ABREVIATURAS **3**

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS **5**

PUBLICACIONES CON ARBITRAJE 5
LIBROS 6
CONFERENCIAS 6
PRESENTACIONES EN CONGRESOS 6

INTRODUCCIÓN **7**

EL ERITROCITO 7
EPISTEMOLOGÍA DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS 15
ESFEROCITOSIS HEREDITARIA 18

OBJETIVOS **32**

GENERAL 32
ESPECÍFICOS 32

MATERIALES Y MÉTODOS **33**

CONSIDERACIONES ÉTICAS 33
POBLACIÓN 33
REACTIVOS 33
CITÓMETROS 33
ANALIZADOR AUTOMÁTICO PARA HEMATOLOGÍA 33
PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO 34
PRUEBA DE AUTOHEMOLISIS (AH) 34
FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA (FOE) 35
CRIOHEMOLISIS HIPERTÓNICA (CH) 38
CITOMETRIA DE FLUJO CON 5'EOSINA MALEIMIDA (5'EMA - CF) 39
FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA POR CITOMETRIA DE FLUJO (FOE- CF) 40
PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITARIA 42
ENSAYOS PARA INVESTIGACIÓN 45
MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) 45
DETERMINACIÓN DE LA OSMOLALIDAD SÉRICA 45
EXPRESIÓN DE AQUAPORINA 1 (AQP-1) 45
ENSAYOS DE INHIBICIÓN 46
ESTUDIOS DE ERIPTOSIS 46
CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO 49
TRATAMIENTO ESTADÍSTICO 49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **50**

CAPITULO I: CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA 50
CAPITULO II: PARÁMETROS Y ANÁLISIS DEL LABORATORIO GENERAL 57
CAPITULO III: EVALUACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS 68

CAPITULO IV: DIAGNÓSTICO CON SANGRE CAPILAR 84
CAPITULO V: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (POBLACIÓN TOTAL) 94
CAPITULO VI: LA FIEBRE EN LAS ESH 119
CAPITULO VII: EXPRESIÓN DE ACUAPORINA-1 128

ANEXO 146

ASPECTOS CLÍNICOS Y EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES 146

CONSIDERACIONES FINALES..... 150

BIBLIOGRAFÍA 154

ABREVIATURAS

5'EMA-CF	Citometría de flujo con 5'eosina maleimida
5'EMA	5'eosina maleimida
ADE	Amplitud de Distribución Eritrocitaria
AH	Autohemólisis
AHAI	Anemia Hemolítica Autoinmune
Ank	Ankirina
AQP-1	Acuaporina 1
B3	Banda 3
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CH	Criohemólisis Hipertónica
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
CN	Control Normal
CP-	Cociente de probabilidad negativo
CP+	Cociente de probabilidad positivo
CV	Coeficiente de Variación
DCFDA-DH	2',7'diclorofluorescina diacetato
DE	Desvío Estándar
EC	Eliptocitosis Congénita
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- N,N,N`,N`tetraacético
EHRN	Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido
Enz	Enzimopatías
ESH	Esferocitosis Hereditaria
FE	Fosfatidiletanolamina
FC	Fosfatidilcolina
FCM	Fragilidad Corpuscular Media
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOE	Fragilidad Osmótica Eritrocitaria
FOE-CF	Fragilidad Osmótica Eritrocitaria por citometría de flujo
FS	Fosfatidilserina
FSC	*Foward Scatter Channel*
GPA	Glicoforina A

GSH	Glutation reducido
Hb	Hemoglobina
Hbpatía	Hemoglobinopatías
HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
Hto	Hematocrito
IFM	Intensidad de fluorescencia media
PBS	*Buffer* fosfato salino
PCD	Prueba de Coombs Directa
PE	Ficoeritrina
PGE	Prostaglandina E2
Prot 4.1	Proteina 4.1
Prot 4.2	Proteina 4.2
PS	Portador Sano
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxigen Species*)
S/V	Relación superficie a volumen
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SEM	Error estándar de la media
SF	Solución fisiológica
SM	Esfingomielina
Sp	Espectrina
SSC	*Side Scatter Channel*
VCM	Volumen Corpuscular Medio

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido difundidos por los siguientes medios:

Publicaciones con arbitraje

Comité Nacional de Hematología, Sociedad Argentina de Pediatría: Donato H, Crisp RL, Rapetti MC, García E, Attie M. ***"Esferocitosis Hereditaria. Revisión. I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico"***. Archivos Argentinos de Pediatría (Aceptado Sep 2014, en prensa)

Comité Nacional de Hematología, Sociedad Argentina de Pediatría: Donato H, Crisp RL, Rapetti MC, García E, Attie M. ***"Esferocitosis Hereditaria. Revisión. II. Manifestaciones clínicas, evolución, complicaciones y tratamiento"***. Archivos Argentinos de Pediatría (Aceptado Sep 2014, en prensa)

Donato H*, Crisp RL*, García E, Rapetti MC, Solari L, Vota D, Chamorro ME, Schvartzman G, Miguez G, Gammella D, Vitttori D, Nesse A. ***"Aspectos demográficos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de la Esferocitosis hereditaria en nuestro país. Estudio sobre 143 casos pertenecientes a 84 familias"***. Trabajo Premiado en el XXI Congreso Argentino de Hematología. Hematología 2014, Vol 18 (1):9-16 (ISSN: 0329-0379; ISSN: 2250-8309)
*Los dos primeros autores contribuyeron por igual en este trabajo

Crisp R, Gammella D, Solari L, Rapetti MC, Schvartzman G, Donato H. ***"Utilización de sangre capilar. Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria"***. Hematología 2013, Vol 17 (1): 8-14. (ISSN: 0329-0379; ISSN: 2250-8309)

Crisp R, Solari L, , Gammella D, Schvartzman G, Rapetti M C, Donato H. ***"Use of Capillary Blood to Diagnose Hereditary Spherocytosis"*** Pediatr Blood Cancer 2012, Vol 59 (7):1299-301. DOI: 10.1002/pbc.24157. Epub 2012 Apr 5 (ISSN: 1545-5017).
Premio Bianual "Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas" al mejor trabajo publicado en revista con revisión de pares. El trabajo fue distinguido con el premio a la mejor publicación según evaluación de jurado externo. Abril 2013.

Crisp R, Solari L, Vota D, García E, Miguez G, Chamorro M E, Schvartzman G, Alfonso G, Gammella D, Caldarola S, Riccheri C, Vittori, D, Venegas B, Nesse A, Donato H. ***"A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina"*** Ann Hematol 2011, Vol 90 N° 6: 625-634. DOI: 10.1007/s00277-010-1112-0

Libros

"ANEMIAS EN PEDIATRIA". Donato H, Rapetti C, Crisp R (Eds). Bs.As. Ediciones JOURNAL, 2014. ISBN: 978-987-1981-22-9. (Pág 280)

Manual de recomendaciones metodológicas para el estudio de las anemias. Sociedad Argentina de Hematología. Ed Estudio Sigma SRL; Junio 2013. (Pág 115).

Guías de Diagnóstico y Tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología. Ed Estudio Sigma SRL; Mayo 2013. (Pág 481).

Conferencias

Conferencia: **"*Esferocitosis Hereditaria hoy"***. XII Congreso Nacional Bioquímico. 70° Congreso Argentino de Bioquímica. CUBRA- ABA 2013. Octubre 2013. Buenos Aires. Argentina.
Publicado en Actas del Congreso: pág 58-59.

Exposición: ***"Diagnóstico de membranopatías en período neonatal".*** 6° Reunión Científica SAH "Hematología Neonatal. Hemoglobinopatías e Histiocitosis". Sociedad Argentina de Hematología. Buenos Aires, 13 de Julio 2012.

Conferencia: ***"Anemias Hemolíticas Hereditarias: Diagnóstico de laboratorio de esferocitosis hereditaria: lo viejo y lo nuevo***". XIX Congreso Argentino de Hematología - Simposio Escuela Europea Oncología (ESO) - V Congreso Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo. Noviembre de 2009. Mar del Plata. Argentina. Resumen publicado en Actas del Congreso: Hematología Vol 13, Nº 3: 117-120. 2009. (ISSN 0329-0379)

Presentaciones en Congresos

Fueron presentados 9 trabajos en congresos internacionales y 7 trabajos en congresos nacionales.

Cabe destacar que en el XXI Congreso Argentino de Hematología el trabajo "Aspectos demográficos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de la Esferocitosis Hereditaria en nuestro país. Estudio sobre 143 casos pertenecientes a 84 familias" fue presentado en *Sesión Plenaria* obteniendo el **Premio Sociedad Argentina de Hematología 2013 en Investigación Clínica.**

INTRODUCCIÓN

El eritrocito

Los hematíes son células maduras, altamente diferenciadas para poder transportar los gases respiratorios. No pueden reproducirse ya que carecen de núcleo. Tampoco poseen mitocondrias ni otras organelas por lo que se encuentra impedida la síntesis proteica. Su reposición se efectúa desde la médula ósea a partir de la célula pluripotencial (*"Stem Cell"*) mediante un conjunto complejo y ordenado de eventos de diferenciación y maduración, proceso que demanda 5 a 7 días *(Steinberg et al 2013).* Durante este proceso se produce la hemoglobinización del citoplasma, la condensación y expulsión del núcleo y la remodelación de su membrana. Sobrevive en circulación 120 días. Esta durabilidad es sorprendentemente elevada si se tiene en cuenta el microambiente hostil en el que circula (alta presión hidrostática, turbulencias, capilares estrechos, variaciones de pH, exposición a agentes oxidantes, etc.) y la imposibilidad de sintetizar y reemplazar estructuras dañadas. Los eritrocitos tienen forma de disco bicóncavo, con un diámetro promedio de 7,5 μm, 2 μm de espesor en el borde y 1,2 μm en el centro; poseen un volumen de 90 fL. Las moléculas de hemoglobina, contenidas en su interior, son las responsables del transporte de oxígeno a los tejidos y del dióxido de carbono a los pulmones. La morfología favorece el intercambio gaseoso debido al exceso de superficie. El disco bicóncavo genera una superficie de aproximadamente 140 μm^2 mientras que una forma esférica que contuviera el mismo volumen (90 fL) expondría una superficie de 95 μm^2 *(Steinberg et al 2013).* La producción energética es principalmente glucolítica, el 90% de la cual surge de la vía metabólica de Embden-Meyerhof (formación de lactato a partir de glucosa con una producción neta de 2 ATP por cada mol de glucosa metabolizada). El camino metabólico fosfato pentosa (desviación hexosa-monofosfato) genera NADPH. El ATP generado es necesario para las reacciones celulares que requieren energía, el transporte activo de cationes a través de la membrana y la preservación de la forma bicóncava de las células. La producción de NADPH está ligada a la reducción de glutation y a través de él a la preservación de las enzimas vitales y de la hemoglobina, ya que reduce pequeñas cantidades de metahemoglobina (Fe^{3+}) a Hb reducida (Fe^{2+}). La forma de disco bicóncavo permite que la célula tenga una mayor relación superficie/volumen favoreciendo no sólo el proceso de intercambio gaseoso sino también su circulación por los capilares debido a una elevada capacidad de deformación. Sin embargo, la morfología presenta diferencias en el neonato. En el adulto la forma clásica de disco bicóncavo la presentan casi el 80% de los eritrocitos, en los recién nacidos sólo la muestran el 43% y el porcentaje de esferocitos y poiquilocitos es casi 5 veces mayor que en el adulto *(Zipursky et al 1983).*

La membrana eritrocitaria debe mantener una combinación crítica de fuerza y flexibilidad para que el eritrocito logre sobrevivir 4 meses en circulación. Es una estructura pequeña, menos del 0,1% del espesor de la célula y sólo alrededor del 1% de su peso *(Grace y Lux 2009)*. Su organización es compleja, comprende una doble capa lipídica, proteínas integrales y proteínas que constituyen el citoesqueleto. La bicapa lipídica, al igual que las de otras membranas biológicas, está constituída por lípidos orientados con sus extremos hidrofóbicos hacia el interior y sus cabezas polares expuestas hacia la superficie celular (externa e interna). La distribución de los lípidos es asimétrica: los que contienen colina –fosfatidilcolina (FC) y esfingomielina (SM)– se concentran hacia el exterior mientras que los que contienen fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (FE y FS) se exponen hacia el interior celular. Intercalados en la bicapa, en forma perpendicular, se encuentran moléculas de colesterol y glicolípidos. Estos últimos se localizan exclusivamente hacia el exterior del eritrocito y constituyen varios antígenos eritrocitarios con implicancia transfusional (A, B, H etc). La asimetría es mantenida por procesos activos unidireccionales mediados por la flipasa y la flopasa. La escramblasa sin embargo, es independiente de ATP, se activa por Ca^{2+} y facilita los movimientos bidireccionales de todos los fosfolípidos, pudiendo en menos de un minuto generar la pérdida de asimetría *(Grace y Lux 2009)*. Por debajo de la bicapa se extiende una red proteica bidimensional denominada citoesqueleto (figura 1). La bicapa lipídica se encuentra anclada al citoesqueleto de la membrana mediante proteínas que interactúan con los dominios citoplasmáticos de proteínas integrales y proteínas del citoesqueleto *(Da Costa et al 2013)*. La membrana eritrocitaria contiene al menos una docena de proteínas principales y más de 300 menores *(Pasini et al 2006)*. La abundancia de las proteínas es variable, desde unas 100 copias hasta más de un millón de copias por eritrocito. Con relación a su función, pueden ser divididas en 4 grandes grupos: (I) transportadores de membrana, (II) moléculas de adhesión y receptores, (III) enzimas y, (IV) proteínas estructurales que ligan la membrana con el citoesqueleto *(Daniels 2007)*. Algunas proteínas pertenecen a más de un grupo pues sus funciones son múltiples. Las proteínas de la membrana eritrocitaria también son clasificadas como integrales o periféricas. Las integrales penetran o atraviesan la bicapa lipídica, las periféricas interaccionan con las proteínas integrales y la superficie interna de la membrana pero no penetran en la bicapa lipídica *(Grace y Lux 2009)*. Las proteínas periféricas incluyen a las enzimas que se localizan próximas a la cara interna de la membrana y a las proteínas estructurales que constituyen el citoesqueleto. La espectrina (Sp) es la proteína principal del citoesqueleto, constituyendo entre el 50 y el 75% de su masa. Está compuesta por dos subunidades fibrilares (α-Sp y β-Sp) que se asocian en forma antiparalela formando dímeros. Estos dímeros a su vez se unen por los extremos formando tetrámeros. Estas unidades son altamente flexibles y son necesarias para permitir la deformación en el eritrocito. Los extremos de

los tetrámeros además se unen a actina, otra proteína del citoesqueleto. Confluyen seis tetrámeros de espectrina a un centro de unión generando una red bidimensional de estructura aproximadamente hexagonal (figura 1). Los centros de unión son nudos realmente complejos que requieren de la participación de numerosas proteínas. La actina forma microfilamentos con la tropomiosina, unión que requiere de tropomodulina y dematina para su estabilidad. Es a estos filamentos a los cuales llegan los tetrámeros de espectrina. La unión eficaz de espectrina-actina requiere de la proteína 4.1 y la aducina. La estructura del citoesqueleto permite la deformación plástica del eritrocito *(Grace y Lux 2009)*.

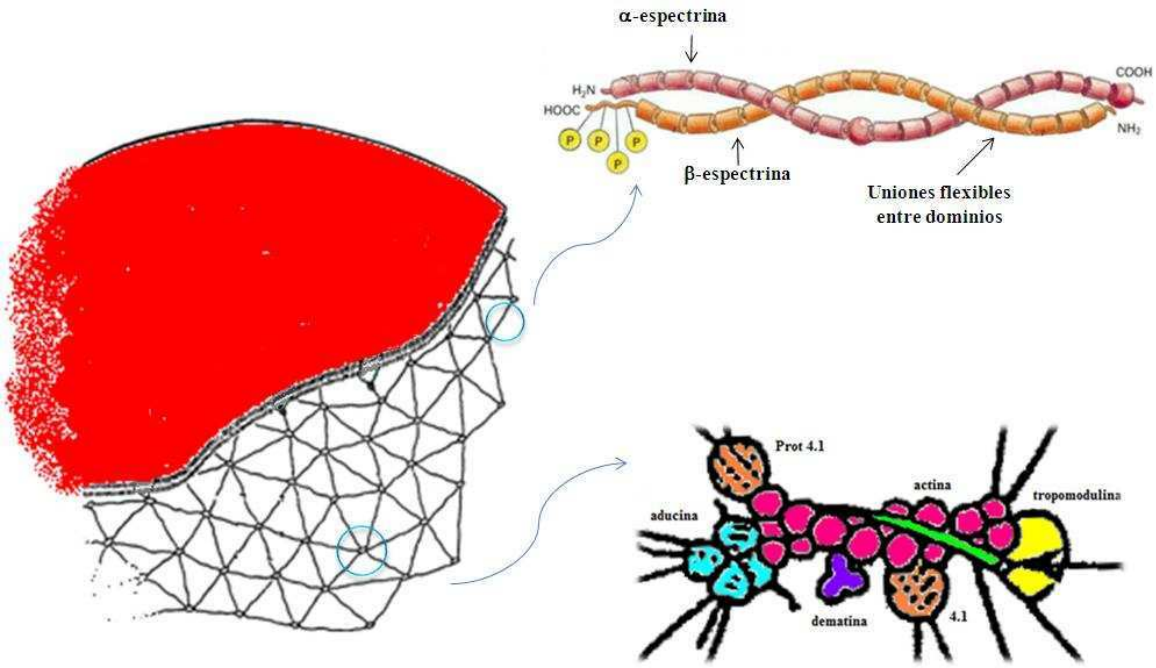


Figura 1: Citoesqueleto. A la izquierda: El citoesqueleto es una red bidimensional que se extiende por debajo de la bicapa lipídica. A la derecha, arriba: está conformado por subunidades de espectrina que se asocian formando dímeros. A la derecha, abajo: los dímeros se asocian en tetrámeros que confluyen a un centro de unión conformado por varias proteínas (ver texto).

Teniendo en cuenta su función estructural, las proteínas de la membrana eritrocitaria pueden clasificarse en tres grandes grupos: a) proteínas del citoesqueleto, b) integrales y c) de anclaje *(Yawata 2003)*. Como ya se describió, el primer grupo comprende a aquellas proteínas (Sp, Prot 4.1, actina, etc) que se asocian construyendo el citoesqueleto. Las proteínas integrales más abundantes son la Banda 3 (1,2 x 10^6 copias /célula) y la glicoforina A (GPA). Al tercer grupo, proteínas de anclaje, pertenecen la ankirina (Ank) y la proteína 4.2 (Prot 4.2) dado que son las que conectan el

citoesqueleto con las proteínas integrales. Estas uniones determinan que la bicapa lípidica y el citoesqueleto permanezcan asociados evitándose la pérdida de membrana por vesiculación. Diversas proteínas integrales se encuentran asociadas entre sí, constituyendo macrocomplejos responsables de llevar a cabo la función principal del eritrocito, es decir el transporte de CO_2 y O_2 entre los tejidos y los pulmones *(Bruce 2008)*. Con directa relevancia a la integridad estructural de la membrana hay dos macrocomplejos, uno basado en Ank y otro en Prot 4.1 (figura 2). En el primero de ellos, el intercambiador de aniones Banda 3 tetramérica y la proteína vinculada con la expresión de grupos sanguíneos RhAG, unen la bicapa lipídica con el citoesqueleto mediante la interacción con las proteínas 4.2 y Ank. En el otro macrocomplejo, la Banda 3 se encuentra en forma de dímero y se une a aducina. Las restantes proteínas de este complejo (Rh, Duffy, Kell y XK) interacionan directamente con la Prot 4.1 *(Da Costa et al 2013)*. La unión directa de los dímeros de Banda 3 con la Prot 4.1 es controvertida aunque esta interacción parece ser funcionalmente importante *(Grace y Lux 2009)*. Debido a que la abundancia relativa de las proteínas es muy diversa, los complejos proteicos asociados con Banda 3 no son estequiométricos y por lo tanto poseen una variada composición. Mediante estudios de difusión de las moléculas en la membrana, se postula que la Banda 3 se encontraría no sólo en los macrocomplejos sino también en forma de dímeros libres *(Kodippili et al 2009)*. Se estima que el 70% de la Banda 3 existe como dímeros y el 30% como tetrámeros. Estos últimos asociados con el citoesqueleto mediante su interacción con la Ank *(Grace y Lux 2009)*.

Palek y colaboradores *(1983)* fueron los primeros en clasificar las interacciones en la membrana en dos categorías: las interacciones verticales y las horizontales. Las verticales, perpendiculares al plano de la membrana, estabilizan la bicapa lipídica. Estas interacciones incluyen la unión Sp-Ank-Banda 3 (macrocomplejo basado en ankirina) y la unión Sp-Prot 4.1-complejo de unión (macrocomplejo Prot 4.1), Sp-Ank-complejo Rh y las débiles interacciones entre las proteínas del citoesqueleto con las cargas negativas de los lípidos de la cara interna de la membrana. Las interacciones horizontales, paralelas al plano de la membrana, son las responsables de la integridad estructural cuando el eritrocito es sometido a estiramiento. Estas interacciones involucran la formación de los dímeros y los tetrámeros de espectrina y los contactos entre éstos con actina y Prot 4.1 en el complejo de unión. Aunque las interacciones entre las proteínas son mucho más complejas, la clasificación en este modelo es útil para comprender las patologías asociadas a alteraciones en las proteínas de la membrana eritrocitaria *(Gallagher 2013)*. Las proteínas de la membrana están sujetas a un gran número de modificaciones post-translacionales (fosforilación, metilación, glicosilación, deamidación, ubiquitinación, clivaje por calpaína, oxidación, etc) que ejercen efectos regulatorios sobre las interacciones proteicas.

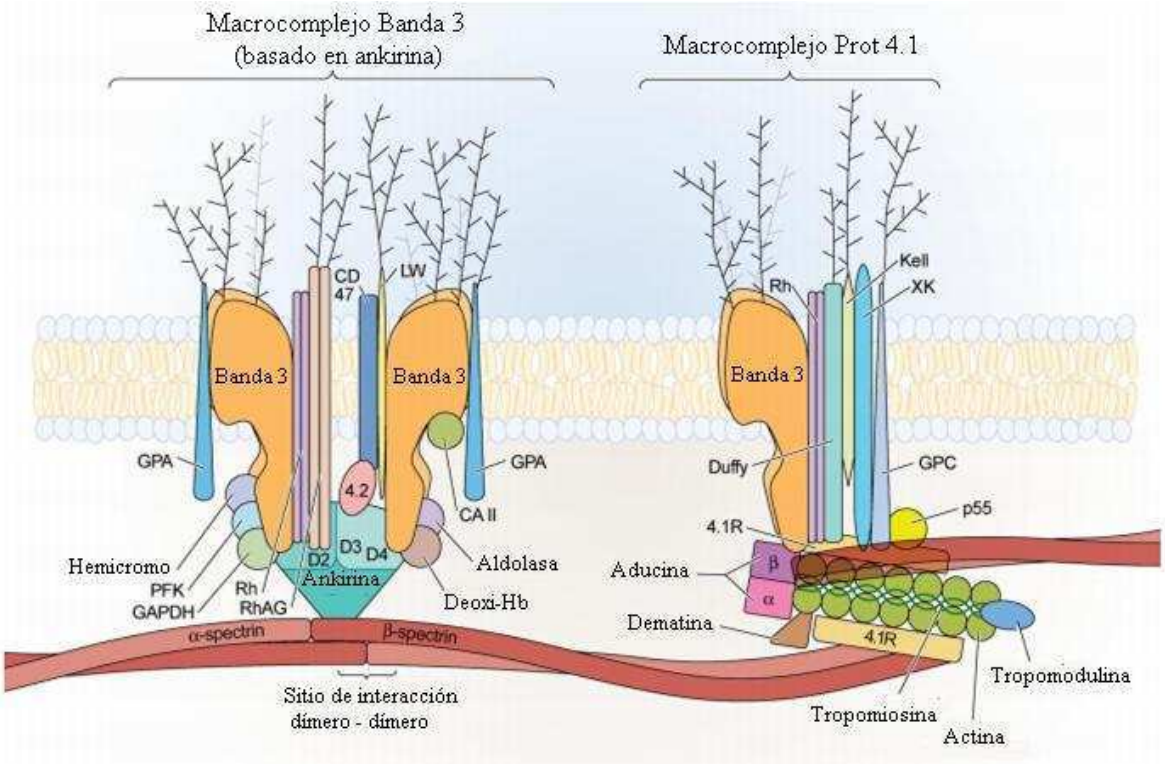


Figura 2: Representación esquemática de dos tipos de complejos multiproteicos en la membrana del glóbulo rojo. (Adaptado de *Salomao et al 2008*)

(Izquierda): El complejo proteico se une a la espectrina cerca del centro del tetrámero (sitio de interacción dímero-dímero). La proteína Banda 3 tetramérica se une a Ank y ésta a la Sp. La Prot 4.2 del citoesqueleto posee sitios de unión para Banda 3 y para Ank. Glicoproteínas transmembrana –GPA, Rh y RhAG– se unen a Banda 3 y CD47 (receptor de trombospondina) y LW (antígeno Lansteiner Wiener) se asocian a Rh/RhAG. Los dos dominios citoplasmáticos de Banda 3 poseen sitios de unión para proteínas solubles, el corto dominio C-terminal para CAII (anhidrasa carbónica), el largo dominio N-terminal para desoxihemoglobina y para enzimas glicolíticas (aldolasa, PFK: fosfofructoquinasa y GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa).

(Derecha): El complejo proteico en los complejos de unión del citoesqueleto. Los complejos de unión del citoesqueleto contienen el complejo ternario de la Sp, F-actina y Prot 4.1R, así como las proteínas tropomiosina, tropomodulina, aducina y dematina que se unen a actina. La Prot 4.1R entra en una interacción ternaria adicional con la proteína transmembrana Glicoforina C (GPC), p55 y Banda 3, en la forma de un dímero, que también lleva GPA. Las proteínas Rh, Kell y XK también poseen sitios de unión a 4.1R. Sin embargo, el número de copias de todas las proteínas transmembrana –excepto GPA y GPC– son bajos y por lo tanto no están presentes en todos los complejos.

Otro aspecto importante que regula y mantiene el tamaño del eritrocito es la permeabilidad de la membrana. Casi impermeable a cationes mono y divalentes, mantiene un alto contenido de potasio, bajo sodio y muy baja concentración de calcio. En contraste, es altamente permeable al agua y a los aniones. Los mecanismos de transporte son numerosos (figura 3). Dos de ellos son de fundamental importancia para la regulación del volumen: el cotransportador K^+-Cl^- y el canal Gardos. La activación de estos mecanismos ocasiona pérdida de K^+, generando deshidratación y destrucción

celular. El cotransportador se activa con el incremento del volumen celular ("*swelling*"), acidificación, depleción intracelular de Mg^{2+} y oxidación de tioles. El canal Gardos causa una pérdida selectiva de K^+ como respuesta al incremento de calcio intracelular (*Grace y Lux 2009*).

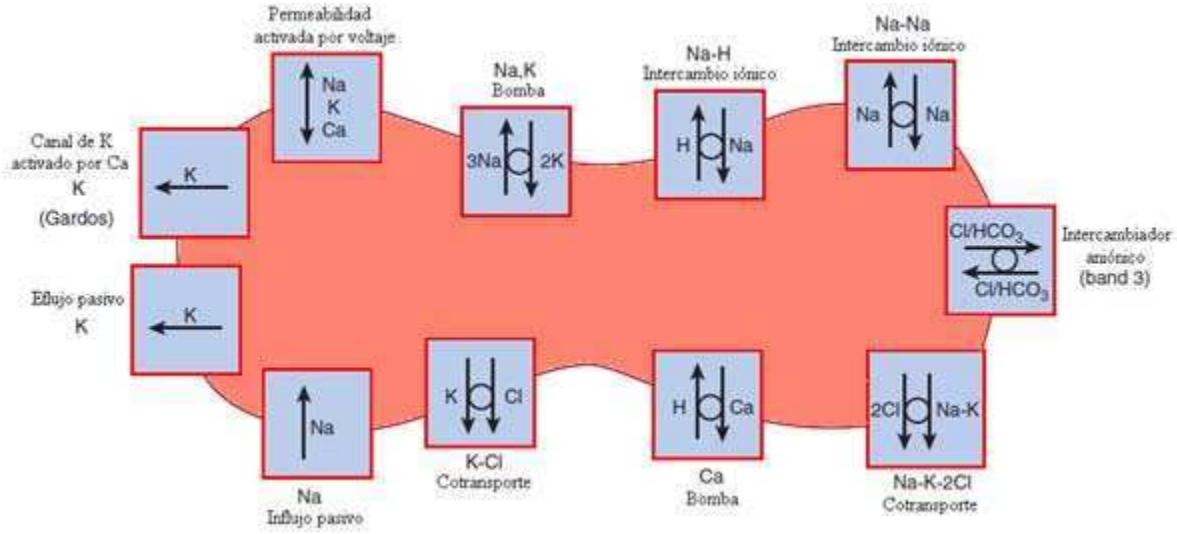


Figura 3: Transporte de iones a través de la membrana. Los mecanismos de transporte en el eritrocito pueden clasificarse en cinco categorías: canales de intercambio iónico, cotransportadores, difusión pasiva, bombas y el canal Gardos. (Adaptado de *Grace y Lux 2009*).

Diversos mecanismos pueden causar la remoción o destrucción de los eritrocitos. La vida del eritrocito es limitada debido a su falta de capacidad para sintetizar proteínas. Sin embargo, como en otras células, su vida y su muerte están bien reguladas *(Bosman et al 2005)*. Durante su vida, el eritrocito circula 1,7 x 10^5 veces por el organismo *(Arese et al 2005)*. Al atravesar capilares, sinusoides esplénicos, zonas con cambios de tonicidad y de alta turbulencia sufre estrés mecánico y osmótico. La bicapa lipídica proporciona rigidez y el citoesqueleto elasticidad, alcanzando una crítica combinación entre fuerza y flexibilidad necesaria para soportar el estrés mecánico. Los cotransportadores y las bombas contrarrestan los cambios osmóticos exteriores. En el interior del eritrocito, los numerosos ciclos de oxigenación-deoxigenación de la Hb dan lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxigen Species*) con la formación de meta-Hb. Esta molécula da origen a hemicromos con capacidad de unirse a proteínas de la membrana y de generar radicales libres que alteran los lípidos de la bicapa. El eritrocito posee mecanismos enzimáticos que requieren energía y poder reductor para revertir la meta-Hb a deoxi-Hb evitando el daño celular. Como ya se mencionó, no se dispone de mecanismos de síntesis proteica o lipídica, pero el

eritrocito posee sistemas enzimáticos y no enzimáticos destinados a evitar el daño de su estructura. Sin embargo, es posible que a lo largo de su vida surjan modificaciones en su membrana con expresión de neo-antígenos o aparición de antígenos crípticos que determinan su remoción. En condiciones fisiológicas, los eritrocitos senescentes (próximos a ser removidos), poseen anticuerpos autólogos IgG unidos a Banda 3. Estos anticuerpos median la fagocitosis de la célula. Los macrófagos que intervienen son principalmente las células de Kupper. Por lo tanto el reconocimiento y remoción de los eritrocitos fisiológicamente envejecidos se produce principalmente en el hígado, aunque en algunas circunstancias también pueden intervenir los macrófagos del bazo. El plasma contiene anticuerpos anti-eritrocitos específicos con diferentes afinidades, especificidades y actividades. Se ha demostrado *in vitro* que pueden activar o no el complemento, unirse a proteínas intracelulares como actina y Sp o a dominios extra e intracelulares de proteínas de membrana, tales como la Banda 3, con baja o alta afinidad. En cuanto a la importancia *in vivo*, la unión de 200 moléculas de IgG/eritrocito son suficientes para generar la fagocitosis y no requeriría la activación de complemento *(Bosman et al 2005)*. Otra molécula que está involucrada en el reconocimiento del eritrocito senescente es la integrina asociada a membrana (CD47). Esta molécula es reconocida por un receptor del macrófago que bloquea la fagocitosis. El eritrocito presenta una pérdida gradual de CD47 durante el envejecimiento –aproximadamente del 30%– impidiendo la generación de la señal inhibitoria y por lo tanto se facilitaría su remoción. Otras alteraciones que se producen en los eritrocitos senescentes son: glicosilación de hemoglobina, glicosilación, metilación y transamidación de las proteínas de membrana *(Grace y Lux 2009)*.

En condiciones patológicas, el estrés se encuentra exhacerbado y los mecanismos contenedores resultan insuficientes. La injuria acelera la senescencia y se desencadena la eriptosis. En forma similar a la muerte celular programada de las células nucleadas –apoptosis– la eriptosis consiste en una serie coordinada de eventos destinados a la eliminación del eritrocito dañado que evita la ruptura de la membrana y la liberación del contenido celular *(Lang et al 2012)*. Los principales mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la eriptosis son: la disminución de la carga energética, del poder reductor y del estrés osmótico, siendo, alguna o todas estas señales, puntos de convergencia de factores que pueden provocar eriptosis. El evento clave en los tres casos anteriormente citados es el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, aunque las vías por las cuales esto ocurre en cada caso sean diferentes *(Herlax et al 2011)*. La depleción de ATP (estrés energético) conduce al aumento de Ca^{2+} intracelular por disminución de la actividad la bomba de Ca^{2+}-ATPasa. En cambio, en el estrés oxidativo, la disminución de glutatión reducido (GSH) activa los canales catiónicos permitiendo un mayor influjo de Ca^{2+}. Los canales catiónicos también se activan con prostaglandina E2 (PGE2). Debido al estrés osmótico se activa fosfolipasa A2 que

libera ácido araquidónico que se convierte en PGE2 por acción de la ciclooxigenasa. El incremento en la concentración de calcio intracelular produce diversos efectos. Por un lado, la activación de PKC (proteína quinasa C, dependiente de calcio) ocasiona la fosforilación de las proteínas de la membrana inhibiendo las interacciones de las mismas. La activación de calpaína –endopeptidasa que degrada las proteínas del citoesqueleto– también contribuye a debilitar la membrana. Por otro lado, la entrada de calcio a través de los canales catiónicos activa al canal Gardos determinando la pérdida de potasio con la consecuente deshidratación y encogimiento celular. Por la tanto, el incremento de calcio intracelular produce un amplio rango de efectos deletéreos en el eritrocito (figura 4).

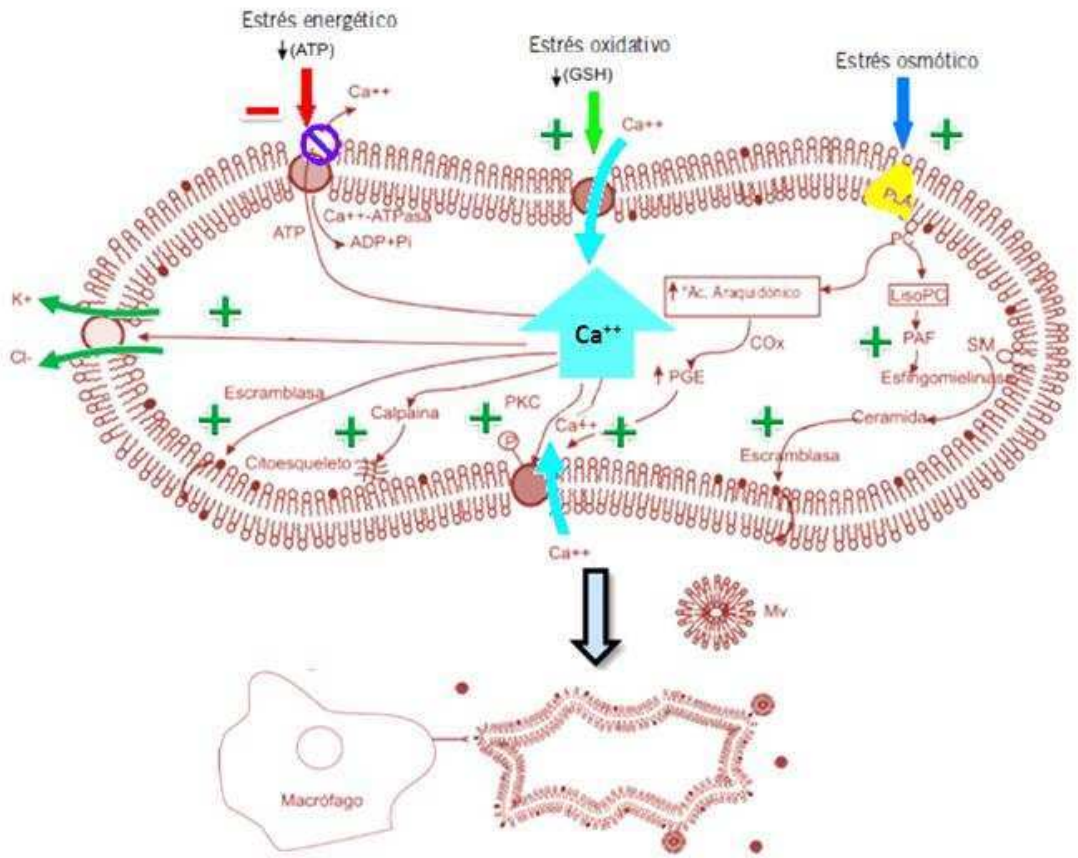


Figura 4: Eriptosis: el incremento de calcio intracelular desencadena el proceso eriptótico. De acuerdo al estímulo que recibe el eritrocito se activan canales que incrementan el influjo de Ca^{2+} o se inhibe la bomba impidiendo su eflujo. La activación del canal Gardos conduce a la deshidratación y encogimiento celular. Se genera la pérdida de membrana por formación de microvesículas (Mv) y exposición de fosfatidilserina. El eritrocito es removido por macrófagos evitándose la hemólisis intravascular. Adaptado de *Herlax et al 2011*.

Todos estos procesos conducen a la pérdida de membrana por desprendimiento de microvesículas *(Allan y Thomas 1981)* y estimulan la translocación de fosfolípidos produciendo la exposición de FS, característica que comparte con las células apoptóticas nucleadas *(Lang et al 2010)*. La traslocación de los fosfolípidos también es estimulada por ceramida generada a partir de esfingomielina *(Lang et al 2010)*. La exposición de FS altera las propiedades reológicas y homeostáticas de la membrana y determina una señal para que la célula sea removida por los macrófagos evitándose la hemólisis intravascular.

Numerosos factores pueden contribuir al acortamiento de la sobrevida eritrocitaria, proceso que se denomina hemólisis. En rigor, toda hemólisis es, en última instancia, consecuencia de fallas en la membrana eritrocitaria *(Grace y Lux 2009)*.

Epistemología de las anemias hemolíticas

La observación de signos y síntomas es de fundamental importancia para el avance del conocimiento médico. La primera descripción escrita de lo que pudo ser una anemia hemolítica fue realizada por Galeno en 150 a.C., describiendo una anemia hemolítica por mordedura de víbora. La comprensión de Galeno de la fisiología era tal que implicó al bazo en el proceso de la decoloración súbita de la piel. Sin embargo la asociación entre el bazo y la hemólisis sería confirmada recién a finales del siglo XIX. Johannes Actuarius, médico de la corte de Constantinopla, describe en 1529, en su obra "*De urinis*", el cambio de coloración en la orina de pacientes expuestos al frío, en la que probablemente sea la primera descripción de la "anemia paroxística a frigore".

A pesar del interés por la sangre, la primera observación de los eritrocitos fue probablemente hecha por Malpighi en 1661, 10 años después de la aparición del microscopio. Pero es van Leeuwenhoek quien una década después realizó una descripción detallada de los glóbulos rojos humanos, estableciendo su tamaño en aproximadamente 1/3.000 de una pulgada mediante la comparación de un eritrocito con un grano de arena de tamaño conocido. John Huxham, en 1770, describió cambios morfológicos en eritrocitos degenerados y atribuyó a esas células la aparición de hemoglobina en orina. En 1843, Andral describió el estado de anemia sin haber mediado pérdida visible de sangre.

Adolf Creite en 1869, mediante experimentos con animales, describió la participación de las proteínas plasmáticas en los procesos de aglutinación y hemólisis, anticipándose en un cuarto de siglo al descubrimiento de los anticuerpos. Esta constituye la primera descripción del fenómeno de aglutinación, llamado inicialmente "acumulación". En esta época la hemólisis era nombrada como

"disolución". Los términos actuales se utilizan a partir del 1900. En 1900 Karl Landsteiner, en base a procesos de aglutinación, descubrió el sistema ABO.

El concepto de la destrucción prematura de eritrocitos como un proceso patológico fue sugerido por primera vez en 1871 por Vanlair y Masius, describiendo una paciente con ictericia y marcada esplenomegalia, sin hepatomegalia, que presentaba ataques recurrentes de dolor agudo en abdomen superior. La madre y la hermana presentaban sintomatología similar. Si bien los autores no mencionaron la anemia ni plantearon el concepto de hemólisis como un proceso patológico, el valor de esta publicación residió en la descripción de la presencia de pequeños glóbulos rojos esféricos que denominaron microcitos (figura 5). Si bien postularon dos mecanismos diferentes para la ictericia clínica (el de origen hepático y el de origen sanguíneo) no se le prestó la atención merecida y durante casi 30 años la ictericia se asoció a enfermedad hepática.

Figura 5: Reproducción de la ilustración publicada por Vanlair y Masius en 1871 titulada "De la microcythémie". I) dibujo de la sangre del paciente. II) dibujo de la sangre de un control normal. De Dacie JV: The life span of the red blood cell and circumstances of its premature death. En: Wintrobe MM (ed): Blood, Pure and Eloquent. New York: McGraw-Hill Book Company, 1980: 211–255.

Hayem en 1898 y Minkowski en 1900 mostraron que la ictericia asociada a la anemia hemolítica era diferente a la secundaria a procesos hepáticos. Hayem no la describió como anemia hemolítica sino como "ictericia esplenomegálica infecciosa crónica". Es Minkowski quien asocia la anemia con la urobilinuria y la esplenomegalia, postulando que la destrucción de los eritrocitos era atribuible a lesiones en el bazo. De esta manera, es a Minkowski a quien se le atribuye el haber reconocido la ictericia como un proceso asociado a la anemia hemolítica. En la primera década del siglo XX Chauffard describió la prueba de fragilidad osmótica que le permitió observar que los eritrocitos de pacientes con ictericia congénita hemolizaban en soluciones salinas hipotónicas mientras que los eritrocitos de individuos normales no lo hacían. Las observaciones de ambos

autores llevaron a que posteriormente, y durante muchos años, la Esferocitosis Hereditaria (ESH) fuera denominada como "Enfermedad de Minkowski-Chauffard".

Christopher y Bentley, dos oficiales del ejército británico asignados a la India para el estudio de malaria, fueron los primeros en utilizar el término "esferocito" en una monografía publicada en 1909. Naegeli postuló que el esferocito era patognomónico de la ictericia hemolítica congénita. De hecho, por este motivo, durante los siguientes 15 - 20 años muchos científicos pensaban que los procesos de ictericia hemolítica adquiridos constituían variaciones de las formas congénitas.

La primera anemia hemolítica inmune claramente descripta, a fines del siglo XIX, fue la Anemia Paroxística *a frigore*. La asociación entre hemoglobinuria y hemólisis intravascular fue realizada por Kuessner en 1879, al observar que el plasma se teñía de rojo cuando el paciente presentaba hemoglobinuria. Donath y Landsteiner, en 1904, describieron la prueba para el diagnóstico de esta enfermedad que aún se utiliza y que puede ser considerada como la primera prueba inmunohematológica que se ha descripto. Chauffard (1907), Trosier (1908) y Vincent (1909) exploraron posteriormente los mecanismos de las anemias hemolíticas, describiendo pacientes que presentaban ictericia hemolítica aguda adquirida asociada a hemoglobinuria.

Entre 1908 y 1912, Widal, Abrami y Brule introdujeron el término anemia hemolítica adquirida. Estos investigadores describieron la ictericia hemolítica no congénita ni familiar, que podía aparecer gradual o abruptamente durante el curso de varias enfermedades o bien no asociada a ninguna enfermedad subyacente, casos que eran similares a los descriptos por Hayem 10 años antes. Los pacientes presentaban reticulocitosis, pero la alteración de la prueba de fragilidad era menos marcada que la obtenida en las formas congénitas. De esta manera quedaron definidas dos tipos de anemias hemolíticas: las congénitas de Minkowski y Chauffard y las adquiridas de Hayem y Widal.

Banti, en 1912, condujo una extensa investigación en patología esplénica. Describió el sistema reticuloendotelial y reconoció la importancia del bazo en los procesos hemolíticos, pero subrayando que no era el único ni el principal sitio de destrucción de los glóbulos rojos. Micheli, en Turín, practicó la primera esplenectomía en una anemia hemolítica adquirida.

La primera guerra mundial produjo un alto en la investigación y además, a juzgar por las publicaciones posteriores a la misma, llevó a la pérdida del grado de conocimiento alcanzado a principios de siglo. Se había borrado la distinción clara entre anemias hemolíticas congénitas y adquiridas establecidas por los investigadores franceses. Para ese entonces John Dacie, en Inglaterra, asumió que la anemia hemolítica en adultos era una forma latente de ESH. La falta de pruebas diagnósticas específicas y la presencia de esferocitos en ambos tipos de anemia hemolítica confluyeron para establecer esa errónea conclusión. Contrariamente, en 1938 y 1940, Dameshek y Schwartz propusieron que todos los casos de ictericia hemolítica eran causados por hemolisinas, y

que el diferente grado de severidad clínica podría ser explicado por la cantidad de hemolisinas circulantes. El concepto resultó correcto únicamente para las ictericias hemolíticas adquiridas, pero fue errónea su extrapolación a la participación de las hemolisinas en las anemias hemolíticas congénitas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la presencia de hemolisinas no podía ser detectada con las técnicas disponibles. A partir de entonces, y durante las décadas siguientes, el minucioso trabajo de Dacie en Londres permitió delinear características serológicas y clasificar las diversas anemias hemolíticas inmunes.

En 1923 Rous planteó el interrogante sobre si los eritrocitos tienen una vida limitada y cuál es su duración en circulación. Dacie y Mollison, en 1943, mostraron que los glóbulos transfundidos a pacientes que presentaban ictericia familiar sobrevivían 100 - 120 días, mientras que la sobrevida era mucho menor si se transfundían a pacientes con anemias hemolíticas adquiridas. También evaluaron la sobrevida de los eritrocitos de los pacientes en receptores normales, comprobando que los eritrocitos de pacientes con ictericia congénita tenían una sobrevida acortada aún si provenían de pacientes esplenectomizados. Estos hallazgos dieron sustento a pensar que habría mecanismos intrínsecos y extrínsecos para el desarrollo de los procesos hemolíticos.

En 1945, Robin Coombs describe la prueba indirecta de antiglobulina (prueba de Coombs indirecta, PCI) y posteriormente desarrolla la prueba de aglutinación directa (prueba de Coombs directa, PCD), aplicada en sangre de cordón de niños que presentaban enfermedad hemolítica del recién nacido. Al momento del desarrollo de estas pruebas aún era difícil distinguir los procesos hemolíticos adquiridos y los familiares. La única prueba de laboratorio disponible era la fragilidad osmótica, que estaba muy alterada en las hemólisis familiares (hoy conocidas como Esferocitosis Hereditaria). Sin embargo, Dameshek y Schwartz señalaron que dicha prueba presentaba alteraciones también en casos que eran claramente anemias hemolíticas adquiridas. Barbara Dodd y Kathleen Boorman, bajo la dirección de John Loutit, en 1946, comprobaron que 17 pacientes con anemia familiar arrojaban resultados negativos para la prueba de Coombs, mientras que los eritrocitos de 5 pacientes con hemólisis adquirida daban resultados positivos. Así, esta prueba permitió discriminar entre ictericia familiar y adquirida, demostrando también la diferente etiología de ambos procesos hemolíticos *(Petz y Garratty 2004)*.

Esferocitosis Hereditaria

La ESH es una anemia hemolítica de observación frecuente, en la cual defectos en las proteínas de la membrana eritrocitaria llevan a la formación de hematíes de forma esférica, osmóticamente

frágiles, que son selectivamente atrapados y destruidos en el bazo, dando como resultado una sobrevida eritrocitaria acortada.

Aspectos epidemiológicos

La ESH es la anemia hemolítica hereditaria más frecuente en el mundo *(Gallagher 2013)*. Si bien se presenta en todos los grupos étnicos y raciales, es particularmente frecuente en la población de Europa del norte, con una prevalencia reconocida de 1 en 5.000 personas *(Morton et al 1962)*. Sin embargo, dada la frecuencia de formas muy leves de enfermedad que sólo se pueden detectar a través de pruebas de laboratorio muy sensibles, se estima que esta prevalencia probablemente sea 4 a 5 veces mayor *(Godal y Heist 1981, Eber et al 1992)*. En Estados Unidos se ha informado que afecta a 1 de cada 2.500 personas *(Gallagher 2013)*. No hay estimaciones confiables en otras poblaciones, pero su frecuencia parece ser especialmente baja en africanos y en personas del sudeste asiático *(Gallagher 2000)*. En nuestro país tampoco existen estimaciones de prevalencia, pero es la anemia hereditaria más frecuentemente observada después de la β-talasemia heterocigota.

Transmisión genética

La ESH puede ser transmitida en forma autosómica dominante o recesiva. La forma de transmisión más frecuente, que se observa en aproximadamente el 75% de las familias afectadas, es la autosómica dominante *(Gallagher 2000, Glader y Allen 2005)*. Con la excepción de algunas muy aisladas comunicaciones, casi no hay casos conocidos de homocigotas, por lo que se supone que esta situación es incompatible con la vida. En el restante 20 a 25% de los casos ninguno de los padres presenta evidencia hematológica de la enfermedad, y las pruebas de laboratorio confirmatorias son normales o sólo presentan alteraciones mínimas *(Stevens y Evans 1981)*. Son las llamadas formas recesivas o no-dominantes. Si bien se supone que en estas familias la transmisión es autosómica recesiva, no se puede descartar en forma absoluta la presencia de casos de transmisión autosómica dominante con penetrancia reducida. En 5 a 10% de estos pacientes con formas no-dominantes se considera que se trata de una mutación "*de novo*". Un estudio realizado en Italia demostró que la ocurrencia de estas mutaciones no-dominantes es seis veces más frecuente que para las mutaciones recesivas *(Miraglia del Giudice et al 2001)*.

Etiopatogenia

El defecto molecular primario reside en un defecto cuali o cuantitativo en las proteínas de membrana, especialmente aquéllas con interacciones verticales que conectan el esqueleto de la membrana a la capa bilipídica (figura 6) *(Liu et al 1990, Delaunay et al 1996, Tse y Lux 1999).*

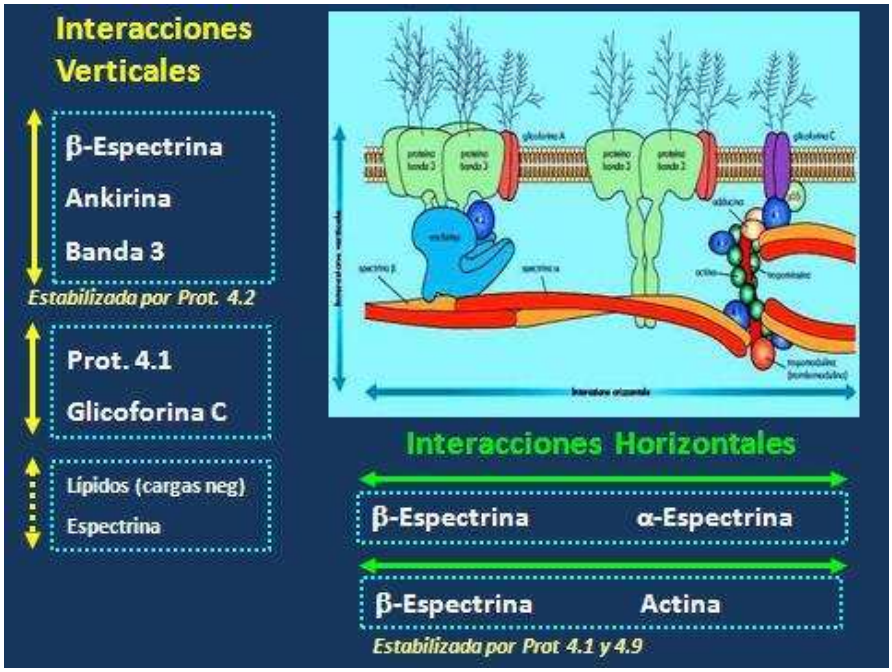


Figura 6: Modelo de las interacciones de las proteínas del citoesqueleto y de la membrana eritrocitaria. Las verticales, perpendiculares al plano de la membrana, estabilizan la bicapa lipídica. Las interacciones horizontales, paralelas al plano de la membrana, son las responsables de la integridad estructural cuando el eritrocito es sometido a estiramiento. Defectos en las interacciones verticales se vinculan a la Esferocitosis Hereditaria. Defectos en las interacciones horizontales se asocian a Eliptocitosis Congénita.

Las deficiencias más frecuentemente observadas corresponden a Ank y Sp, ya sea en forma aislada o asociada a otras deficiencias. Estos datos son coincidentes entre la mayoría de los publicados en el mundo *(Costa et al 1990, Miraglia del Giudice et al 1994, Saad et al 1994, Lanciotti et al 1997, Dhermy et al 1999, Premetis et al 1999, Ricard et al 2000, Sánchez-López et al 2003),* aunque difieren de otros en los que se ha comunicado que la deficiencia predominante es de Banda 3 *(Cynober et al 1996, Yawata et al 2000, Rocha et al 2005, Mariani et al 2008).*

Estas deficiencias de las proteínas producen a su vez alteraciones secundarias en la membrana. La teoría más aceptada dice que la ESH es causada por la desconexión entre el citoesqueleto y la capa bilipídica, seguida de vesiculación de los componentes de superficie que han perdido su soporte (figura 7) (*Gallagher 2000*). Este fenómeno lleva, a su vez, a una progresiva reducción del área de

superficie de membrana y, como consecuencia, al cambio de forma del hematíe. La pérdida de 15 a 20% de los lípidos de membrana, característica de la ESH, es simétrica, no estando alteradas las proporciones relativas de colesterol ni fosfolípidos.

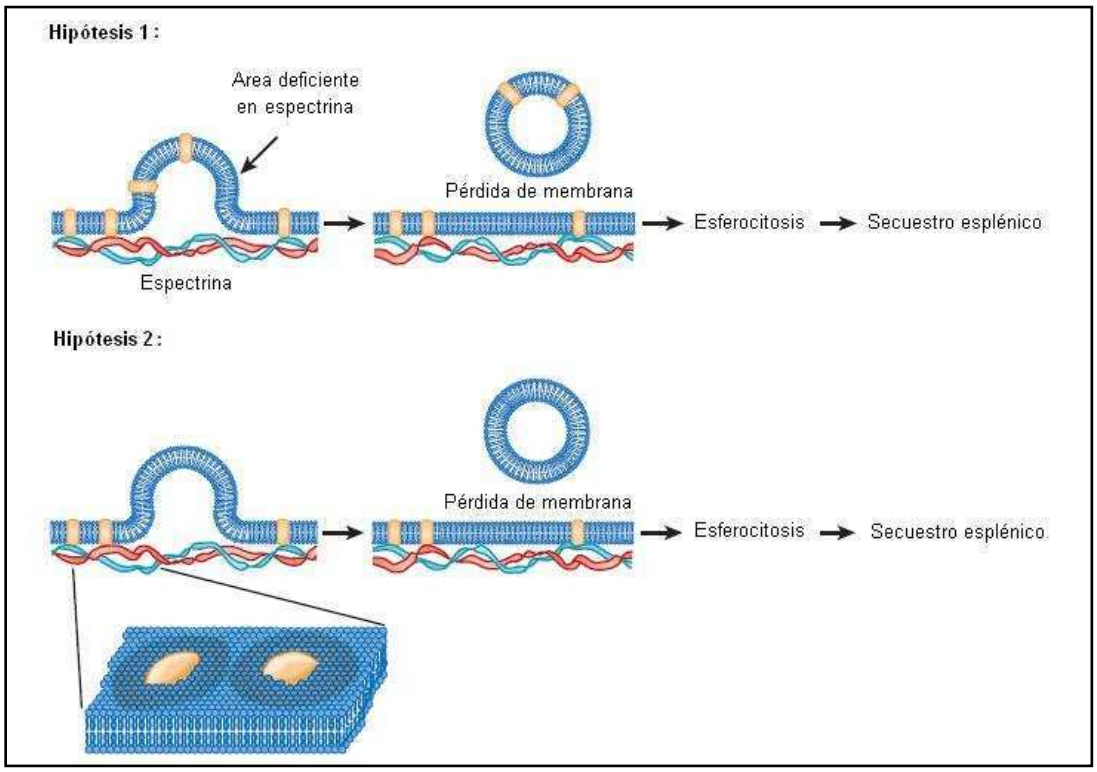


Figura 7: Mecanismo de la pérdida de membrana. En la hipótesis 1 se asume que la membrana lipídica con sus proteínas integrales es directamente estabilizada por las interacciones con Sp u otros elementos del citoesqueleto. Las áreas deficientes en espectrina pierden el soporte y se desprenden generando la esferocitosis. La hipótesis 2 asume que la membrana se estabiliza mediante interacciones de Banda 3 con los lípidos vecinos. La influencia de la Banda 3 se extiende en el medio de lípidos debido a que la primera capa de lípidos inmovilizados disminuye la movilidad de los lípidos en la capa siguiente y así sucesivamente. Los lípidos parcialmente inmovilizados se representan como un anillo azul oscuro alrededor de la proteína. En células deficientes de Banda 3, el área con moléculas de lípidos no inmovilizados aumenta y se pierden. Las deficiencias de Sp-Ank generan el mismo efecto: por falta de anclaje las moléculas de Banda 3 difunden y se agrupan transitoriamente incrementando el area de lípidos no inmovilizados. (Adaptado de *Grace y Lux 2009*)

Otra de las consecuencias de estas alteraciones de la membrana es que la célula se vuelve más permeable al sodio y al potasio. Este excesivo flujo de Na^+ hacia el interior del eritrocito activa a la ATPasa, y por ende a la bomba de Na^+/K^+. Por lo tanto aumenta el recambio de ATP y, como consecuencia, se produce un aumento de la glicólisis destinado fundamentalmente a mantener esta mayor demanda de ATP para el funcionamiento acelerado de la bomba de Na^+. En el esferocito, la relación superficie/volumen está reducida, lo cual lleva a una disminución de su deformabilidad. En el bazo la mayor parte de la sangre arterial fluye directamente hacia los cordones esplénicos, una

masa tortuosa de pasajes estrechos interconectados entre sí, formados por células reticulares y revestidos por fagocitos. Para reingresar a la circulación, los eritrocitos deben atravesar espacios entre las células endoteliales que forman las paredes de los sinusoides venosos *(Chen y Weiss 1973)*. Estos espacios, aún en su máximo punto de distensión, son invariablemente más pequeños que los glóbulos rojos, los cuales para atravesarlos deben entonces deformarse en gran medida (figura 8) *(Weiss y Tavassoli 1970)*.

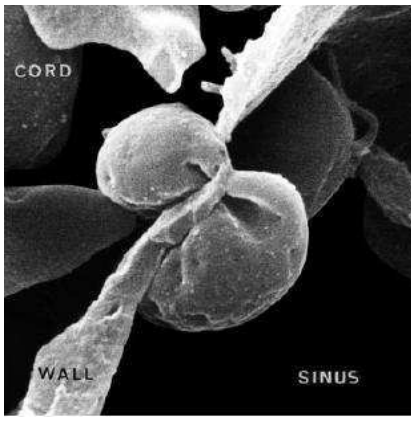


Figura 8: Un reticulocito que atraviesa desde el cordón esplénico al sinusoide. Notar la marcada deformación que sufre la célula en este pasaje. Imagen tomada de An and Mohandas. Disorders of red cell membrane. British Journal of Haematology, 2008; 141: 367-375.

Existe abundante evidencia experimental demostrando que los esferocitos, al haber perdido su capacidad de deformarse, son entonces selectivamente secuestrados en estos espacios. El tiempo de tránsito a través de los cordones esplénicos, que es de 30 a 40 segundos para un eritrocito normal, se encuentra prolongado de 15 a 150 minutos en el caso de los esferocitos *(Ferrant et al 1987)*. En consecuencia, el bazo de pacientes con ESH presenta cordones masivamente congestionados, pero con sinusoides relativamente vacíos, lo cual contrasta con la situación observable en bazos normales. Durante su detención en el bazo los esferocitos sufren distintos cambios que los llevan finalmente a su destrucción (figura 9) *(Weiss y Tavassoli 1970, Chen y Weiss 1973, Mayman y Zipursky 1974, Lusher y Barnhart 1980, Myhre Jensen y Kristensen 1986, Palek y Jarolim 1993, Lux y Palek 1995, Gallagher 2000, Glader y Allen 2005)*.

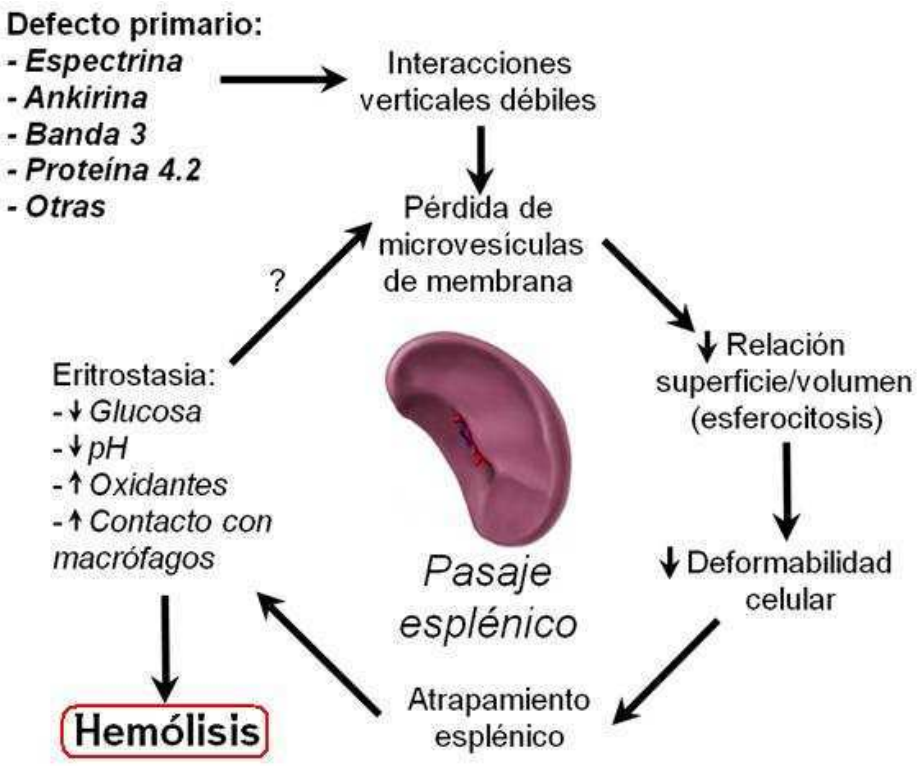


Figura 9. Fisiopatogenia de la destrucción eritrocitaria en la Esferocitosis Hereditaria. El defecto proteico conduce a la formación de esferocitos. La disminución de la deformabilidad es responsable de un mayor tiempo de retención de la célula en el bazo. La eritrostasia conduce al secuestro esplénico (hemólisis extravascular) o bien a la liberación del eritrocito con una mayor pérdida de membrana.

Manifestaciones clínicas

La ESH se expresa a través de una combinación de manifestaciones clínicas y de laboratorio *(Lux y Palek 1995, Gallagher et al 1998, Packman 2001, Gallagher 2013, Donato et al 2014)*. Los signos clínicos típicos de la enfermedad son anemia, ictericia y esplenomegalia (*Da Costa et al 2013, Gallagher 2013)*. Como fue expresado anteriormente, la historia familiar es positiva en aproximadamente el 75% de los casos. Se manifiesta por primera vez generalmente en lactantes o niños mayores, raramente en la adultez *(Donato et al 2014)*. El síntoma de presentación más común, que se observa en aproximadamente el 50% de los casos, es la anemia, pero en 10 a 15% de los pacientes pueden ser la ictericia y/o la esplenomegalia *(Krueger y Burgert 1966)*.

Aproximadamente 2/3 partes de los pacientes con ESH cursan con hemólisis parcialmente compensada, por lo que sólo sufren anemia leve a moderada. Por lo tanto, estos niños pueden ser asintomáticos o presentar sólo síntomas mínimos, como algún grado de fatiga y/o palidez. La ictericia se presenta, en algún momento de la vida, en la mitad de los casos (*Krueger y Burgert*

1966, Gallagher et al 1998). En muchas oportunidades es una infección viral la que hace que se manifieste la ictericia. La esplenomegalia se detecta en 50% de los lactantes afectados y en 75 a 95% de los niños mayores o adultos *(Young et al 1951, MacKinney et al 1962, Krueger y Burgert 1966)*. Generalmente es moderada, pero en algunos casos puede llegar a ser masiva *(Diamond 1938)*.

Datos de laboratorio

La mayoría de los niños presentan anemia, con niveles de hemoglobina generalmente entre 9 y 12 g/dL. En las formas moderadas a severas los valores están por debajo de 9 g/dL. Otros pacientes presentan un estado hemolítico compensado, con valores de hemoglobina dentro de límites normales. Los recuentos reticulocitarios están siempre elevados y su nivel está en relación con la severidad de la hemólisis. La observación del extendido de sangre periférica suele ser fundamental para el diagnóstico. El hallazgo característico es la visualización de esferocitos, que son hematíes que han perdido su característica forma bicóncava y se muestran redondeados, hipercrómicos, sin el halo claro central, y de tamaño inferior al eritrocito normal. Es de destacar que en los extendidos de pacientes con ESH, los esferocitos son prácticamente la única forma anormal de eritrocitos presente.

De los índices hematimétricos, solo la CHCM es patológica, con valores que están frecuentemente por encima de lo normal, reflejando el grado relativo de deshidratación celular que presentan los hematíes *(MacKinney et al 1962, Mohandas et al 1986, Pati et al 1989, Gilsanz et al 1993, Michaels et al 1997)*. La determinación de la ADE es importante, ya que está significativamente aumentada (*Michaels et al 1997, Pati et al 1989)*.

En la ESH la hemólisis es fundamentalmente extravascular, ya que es en el bazo donde habitualmente se produce la destrucción eritrocitaria. Por lo tanto, las pruebas indicativas de hemólisis que presentan estos pacientes son niveles elevados de bilirrubinemia indirecta y de urobilinógeno fecal.

En la mayoría de los casos la asociación de historia familiar positiva, hallazgos clínicos característicos, evidencia de laboratorio de hemólisis extravascular, visualización de esferocitos en el extendido de sangre periferica y prueba de Coombs directa (PCD) negativa es suficiente para confirmar la enfermedad *(Hassoun y Palek 1996, Bolton-Maggs et al 2004, Gallagher 2005, Grace y Lux 2009)*. Por el contrario, en otros casos el diagnóstico puede ser difícil. En la ESH leve los pacientes pueden tener niveles de hemoglobina y bilirrubina normales y observarse muy pocos o

ningún esferocito en el extendido (sólo en 25-30% de estos pacientes se visualizan los mismos) (*MacKinney et al 1962, Mohandas et al 1986, Eber et al 1992, Grace y Lux 2009)*. Por el contrario, en la ESH severa se pueden observar, además de los esferocitos, eritrocitos con otras alteraciones morfológicas (acantocitos, equinocitos, poiquilocitos, etc.), planteándose entonces el diagnóstico diferencial con otras anemias hemolíticas *(Agre et al 1982, Coetzer et al 1988, Gallagher et al 1998, Grace y Lux 2009)*. En estas situaciones, entonces, es imprescindible realizar pruebas especiales confirmatorias del diagnóstico *(Da Costa et al 2013)*. Sin embargo, ninguna de estas pruebas puede detectar el 100% de los pacientes *(Gallagher 2000, Bolton-Maggs et al 2004, Iolascon y Avvisati 2008, Grace y Lux 2009, Bianchi et al 2012, King y Zanella 2013)*. Actualmente se dispone de nuevas pruebas diagnósticas, más específicas y sensibles, que presentan además la ventaja de requerir menor cantidad de sangre para el procesamiento *(Streichman y Gescheidt 1998, King et al 2004, King et al 2008, Won y Suh 2009)*. En nuestro país, algunas de éstas (CH, 5'EMA-CF, FOE-CF) fueron desarrolladas como parte de esta tesis doctoral e implementadas a partir del año 2007.

Evolución y formas clínicas

La ESH puede presentarse con diferentes grados de severidad que se expresan en distintas formas clínicas. La clasificación más tradicionalmente usada toma en cuenta niveles de hemoglobina, bilirrubina y reticulocitos, contenido de espectrina y otros parámetros (tabla 2) *(Eber et al 1990, Pekrun et al 1993, Savvides et al 1993, Gallagher et al 1998, Stenson et al 2003, Bolton-Maggs et al 2004).*

Parámetro	Portador sano	Leve	Moderada	Moderadamente severa	Severa
Transmisión	Recesiva	Dominante o Recesiva	Dominante o Recesiva	Recesiva	Recesiva
Hemoglobina (g/dL)	Normal	11 – 15	8 – 12	6 – 8	< 6
Reticulocitos (%)	1 – 3	3 – 8	≥ 8	≥ 10	≥ 10
Bilirrubina (mg/dL)	0 – 1	1 – 2	≥ 2	2 – 3	≥ 3
Contenido de espectrina (% del valor normal)	100	80 – 100	50 – 80	40 – 80	20 – 50
Esferocitos en sangre periferica	No	+	++/+++	++/+++	++/+++ *
Fragilidad osmótica					
Basal	N	N/↑	↑↑	↑↑	↑↑
Diferida	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑
Esplenomegalia	No	Generalmente no	Si	Si	Si

**poiquilocitosis*

Tabla 2. Clasificación clínica de la esferocitosis hereditaria.

Una forma más reciente de clasificación, y que parece ser de mayor utilidad en la práctica clínica habitual, considera exclusivamente los niveles de hemoglobina, dividiendo a las ESH de la siguiente manera *(Mariani et al 2008)*:

- Leve: hemoglobina > 10 g/dL
- Moderada: hemoglobina 8-10 g/dL
- Severa: hemoglobina < 8 g/dL

***ESH leve**:* En 20 a 30% de los pacientes la destrucción eritrocitaria está total o casi totalmente compensada por la producción, por lo que la anemia es muy leve o inexistente (hemoglobina habitualmente > 10 g/dL). Por lo general tampoco tienen ictericia ni esplenomegalia, y sólo en el 60% de los casos se pueden observar esferocitos en cantidad significativa en sangre periférica. En muchas oportunidades la enfermedad recién se hace evidente durante el curso de enfermedades virales, embarazo o ejercicio. Generalmente estas formas clínicas se diagnostican durante la realización de estudios familiares, o por la aparición de esplenomegalia o litiasis biliar en niños mayores o adultos.

***ESH moderada**:* Estos pacientes usualmente tienen hemoglobina entre 8 y 10 g/dL, recuentos reticulocitarios cercanos a 10% y bilirrubinemia entre 2 y 3 mg/dL. Se ve tanto en pacientes con formas dominantes como con recesivas.

***ESH severa**:* En estos casos la anemia es lo suficientemente severa como para implicar compromiso de vida, con niveles de hemoglobina inferiores a 8 g/dL, por lo que son transfusión-dependientes. La morfología eritrocitaria en muchas oportunidades muestra, además de los característicos esferocitos, esferocitos con contornos irregulares y/o poiquilocitos. Esta forma clínica se ve casi exclusivamente en pacientes con la forma recesiva de la enfermedad.

***Portador sano**:* Esta forma se diagnostica fundamentalmente en los padres de los pacientes en los que no se puede demostrar una transmisión autosómica dominante. No presentan anemia, ictericia ni esplenomegalia, y en el extendido de sangre periférica no se observan esferocitos. La enfermedad se evidencia sólo por una ligera reticulocitosis (en promedio 2,1 ± 0,8%), FOE ligeramente aumentada y AH aumentada. En algunos casos la única alteración se encuentra a través del análisis de las proteínas de membrana.

En el recién nacido esta enfermedad se presenta con algunas características especiales *(Donato et al 2007, Donato et al 2014)*. La ictericia es el síntoma más frecuente en periodo neonatal *(Burman 1958, Trucco y Brown 1967, Schröter y Kashnitz 1983)*, se estima que aproximadamente el 50% de los pacientes a los que se les diagnostica ESH presentan como antecedente el haber padecido ictericia neonatal *(Stamey y Diamond 1957, Burman 1958, Schröter y Kashnitz 1983, Pinto et al 1995, Donato et al 2014)*. Generalmente la hiperbilirrubinemia aparece en las primeras 48 horas de vida, originada por una combinación de hemólisis y capacidad reducida del hígado para conjugar la bilirrubina (*Stamey y Diamond 1957, Burman 1958, Trucco y Brown 1967)*. Si bien la enorme mayoría de estos neonatos pueden ser controlados con luminoterapia, en casos severos la hiperbilirrubinemia puede alcanzar niveles muy elevados, por lo que el riesgo de kernicterus está siempre latente *(Burman 1958, Berardi et al 2006, Sgro et al 2006)*. Por lo tanto, la ESH es uno de los diagnósticos principales a tener en cuenta al evaluar un recién nacido con anemia hemolítica. La anemia se observa en el 50 - 80% de estos pacientes, siendo a veces lo suficientemente severa como para requerir transfusión *(Burman 1958, Schröter y Kashnitz 1983, Gallagher et al 1998, Grace y Lux 2009)*. En el recién nacido la esplenomegalia es muy poco frecuente (*Stamey y Diamond 1957, Trucco y Brown 1967)*. Esta etapa de ictericia y/o anemia correspondiente a los primeros días de vida es transitoria, y luego el cuadro remite y se estabiliza sin necesidad de posteriores transfusiones *(Glader y Allen 2005)*. Sin embargo, en algunos niños la anemia persiste durante varias semanas sin que se observe una respuesta eritropoyética adecuada al grado de anemia *(Gallagher et al 1998, Delhommeau et al 2000)*. Existen opiniones controvertidas respecto a si el grado de anemia y la existencia o severidad de la hiperbilirrubinemia en periodo neonatal son factores predictivos de la gravedad de la enfermedad en etapas posteriores de la vida (*Stamey y Diamond 1957, Trucco y Brown 1967, Gallagher et al 1998, Donato et al 2014)*.

La visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica puede ayudar al diagnóstico, pero no es un dato tan definitorio como en el niño mayor ya que la presencia de una cantidad no muy elevada de esferocitos en período neonatal es normal. Además, la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido por incompatibilidad sanguínea del sistema ABO (EHRN-ABO) es una patología mucho más frecuente que la ESH y presenta invariablemente esferocitos en cantidad significativa. En algunos niños originalmente diagnosticados como EHRN-ABO el diagnóstico definitivo de ESH sólo se realiza meses o años después, frente a la persistencia de anemia y/o ictericia con presencia continua de esferocitos en sangre periférica *(Glader y Allen 2005, Donato et al 2007)*. La situación inversa, es decir el diagnóstico de ESH en periodo neonatal que luego debe ser retrospectivamente cambiado a EHRN-ABO por desaparición definitiva de los signos de enfermedad, es menos frecuente pero también puede producirse.

Diagnóstico diferencial

Frente a un cuadro de anemia hemolítica con presencia de esferocitos en sangre periférica, los diagnósticos diferenciales no son muchos. En periodo neonatal, como se ha descripto previamente, muchas veces es casi imposible diferenciar entre la EHRN-ABO y la ESH, ya que la PCD es negativa en la mayoría de los casos de EHRN-ABO y, por otra parte, la prueba de FOE no sirve para diferenciar entre ambas (*Oski y Naiman 1982)*. La detección de anticuerpos inmunes anti-A o anti-B por elución de glóbulos rojos aumenta la probabilidad de confirmar la EHRN-ABO *(Gallagher et al 1998, Cid Vidal y Elies Fibla 2000)*. En adultos y niños mayores, la otra enfermedad que se manifiesta por la presencia predominante de esferocitos es la anemia hemolítica autoinmune (AHAI), cuyo diagnóstico se confirma mediante la positividad de la PCD en la enorme mayoría de los casos. Si bien ésta no es una patología que se manifieste en el recién nacido, puede presentarse un cuadro similar como consecuencia del pasaje transplacentario de anticuerpos en neonatos hijos de madre con AHAI. También pueden presentarse dificultades diagnósticas en aquellos casos en que la manifestación inicial de la enfermedad se da como crisis aplásica, ya que la reticulocitopenia hace desviar el diagnóstico hacia otras patologías, no hemolíticas. En el corto plazo, la recuperación de la hemopoyesis permite llegar al diagnóstico de ESH sin mayores dificultades.

Problemas diagnósticos provocados por la coexistencia con otras patologías

Algunas patologías, permanentes o transitorias, pueden complicar el diagnóstico de ESH por su interferencia sobre las manifestaciones clínicas y las pruebas de laboratorio tradicionales. La ictericia obstructiva lleva a un aumento del colesterol y de los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria, que da como resultado un aumento del área de superficie de la membrana. Como consecuencia, la esferocitosis mejora y las pruebas de FOE y de AH se normalizan *(Cooper y Jandl 1969)*. La anemia por deficiencia de hierro y las anemias megaloblásticas (ya sea por deficiencia de folato o de B_{12}) también disminuyen el grado de esferocitosis y llevan a la normalización de las pruebas de FOE *(Blecher 1988, Pautard et al 1988)*. Mas aún, en algunas oportunidades estas pruebas terminan demostrando una disminución de la fragilidad osmótica. La coexistencia con hemoglobina SC suele agravar el cuadro clínico de la hemoglobinopatía *(Warkentin et al 1990)*. La coexistencia con β-talasemia menor aminora el cuadro de ESH *(Bain 2006)*. Las pruebas diagnósticas desarrolladas en la última década presentan la ventaja de no modificar sus resultados ante las situaciones descriptas.

Complicaciones

Las complicaciones en pacientes con ESH están relacionadas fundamentalmente con la hemólisis crónica y la anemia. La formación de cálculos de bilirrubinato –***litiasis biliar***– es una de las

complicaciones más comunes. La mayoría de los casos son diagnosticados entre los 10 y 30 años de edad pero su aparición en niños menores no es rara *(Bates y Brown 1952).* En individuos en los cuales hay co-herencia de ESH y sindrome de Gilbert, la incidencia de litiasis biliar es 5 veces mayor que en la población general *(Kumar et al 2012).*

En la ESH se pueden manifestar tres tipos de crisis que llevan a agravamiento súbito de la anemia *(Rapett et al 2005)*. Las ***crisis hemolíticas*** son las más frecuentes. Característicamente se presentan durante el curso de infecciones virales de cualquier tipo, y en niños menores de 6 años, pero también pueden aparecer espontáneamente y a cualquier edad. En general son de intensidad leve a moderada, manifestándose como exacerbación de la sintomatología habitual de anemia, ictericia, hiperreticulocitosis y esplenomegalia, y no requieren transfusiones. Sin embargo, en algunas oportunidades son severas y requieren hospitalización, transfusiones y control estricto.

Las ***crisis aplásicas*** son menos frecuentes que las hemolíticas pero mucho más graves, pudiendo llevar a insuficiencia cardíaca congestiva y muerte *(Mallouh y Qudah 1995)*. El agente causal es el parvovirus B19, agente etiológico de la 5ta Enfermedad (Eritema Infeccioso) *(Kelleher et al 1983, Young 1988).* El virus infecta selectivamente a los precursores eritropoyéticos, inhibiendo su desarrollo, lo que lleva a un cese casi total de la eritropoyesis de aproximadamente una semana de duración *(Mortimer et al 1983, Ozawa K et al 1986)*. Este cuadro hematológico generalmente va acompañado de ligera trombocitopenia y neutropenia, probablemente por un mecanismo similar sobre los progenitores de cada una de estas progenies. En algunas oportunidades, la infección por parvovirus B19 y la consecuente crisis aplásica son la manifestación inicial de la ESH. Esta situación se produce especialmente en aquellos pacientes con hemólisis compensada, que generalmente no tienen diagnóstico previo de la enfermedad por no padecer anemia.

Las ***crisis megaloblásticas*** son muy poco frecuentes, y se deben a deficiencia de folatos. Es para evitar esta complicación que todos los pacientes con anemias hemolíticas crónicas deben recibir suplementos adecuados de folato *(Gallagher et al 1998*).

Tratamiento

El tratamiento de la ESH incluye varios aspectos.

Terapia transfusional de soporte

Se debe transfundir con glóbulos rojos de acuerdo a los requerimientos de cada paciente. En la población pediátrica se trata de mantener los niveles de hemoglobina por encima de 7 - 8 g/dL, hasta que el paciente alcance una edad en la que la esplenectomía pueda ser realizada con mínimo

riesgo. En el recién nacido no se pueden establecer valores mínimos de hemoglobina para indicar una transfusión, debiéndose evaluar el estado hemodinámico del paciente y la severidad de la hemólisis para decidirla *(Donato et al 2007)*. La indicación de exanguinotransfusión, al igual que para cualquier otra causa de ictericia neonatal, depende de la edad gestacional, la edad cronológica, los niveles de bilirrubina indirecta alcanzados y el ritmo de ascenso de la bilirrubinemia.

Esplenectomía

La esplenectomía corrige la sintomatología de la enfermedad en casi todos los pacientes con ESH, debido a que se elimina el principal órgano donde los eritrocitos sufren severos cambios y son finalmente destruidos. La anemia y la hiperbilirrubinemia se corrigen totalmente, el recuento reticulocitario desciende a valores normales o cercanos a lo normal, la sobrevida eritrocitaria se normaliza y la curva de FOE inmediata muestra una franca mejoría *(Gallagher et al 1998)*. En algunos raros casos en que la esplenectomía no corrige totalmente los síntomas, igualmente lleva a una importante disminución en la intensidad de la hemólisis *(Agre et al 1986)*.

La principal limitación para realizar una esplenectomía es el riesgo de sepsis fulminante post-esplenectomía *(Eraklis y Filler 1972, Krivit et al 1979, Posey y Marks 1983, Schilling 1995, Bolton-Maggs et al 2012)*. Las indicaciones sobre cuáles pacientes son pasibles de esplenectomía, balanceando los riesgos y los beneficios, son aún motivo de controversia, ya que no existe consenso y están sujetas a opiniones de expertos *(Casale y Perrotta 2011, Wood et al 2011)*. Los lineamientos expuestos a continuación son los más aceptados *(Sieff y Williams 1995, Bolton-Maggs et al 2004, Rapetti et al 2005, Grace y Lux 2009, Bolton-Maggs et al 2012)*. En la *ESH severa* la esplenectomía es mandatoria. En la *ESH moderada sintomática* (mala calidad de vida, fatiga, úlceras de piernas, etc.) está habitualmente indicada para mejorar calidad de vida. En la *ESH moderada asintomática* su realización es controvertida; es una indicación probable para esplenectomía parcial. En la *ESH leve* habitualmente no es necesario realizarla. En pacientes con indicación de colecistectomía por litiasis biliar actualmente es motivo de controversia si se debe realizar esplenectomía en forma simultánea con la colecistectomía, independientemente del grado de severidad de la anemia. La edad de elección para realizar el procedimiento es a partir de los 6 años, cuando el riesgo de sepsis postesplenectomía es considerablemente menor.

Ácido fólico

Los niños con ESH presentan una actividad eritropoyética aumentada varias veces por encima de lo normal, por lo que su consumo de folatos está francamente aumentado. Es imprescindible la suplementación con ácido fólico en las ESH moderadas y severas, siendo materia opinable su indicación en los casos leves (*Bolton-Maggs et al 2004, Bolton-Maggs et al 2012)*.

Estimulación de la eritropoyesis

La médula ósea del recién nacido presenta un cierto grado de respuesta inadecuada frente a la anemia. Los niveles de eritropoyetina sérica en neonatos y lactantes menores de 6 meses están disminuidos en comparación con niños mayores o adultos, a cualquier valor de hemoglobina *(Yamashita et al 1994, Kling et al 1996).* Esta característica probablemente explique el hecho de que frecuentemente los recién nacidos con ESH deben recibir varias transfusiones durante el periodo neonatal, pero a medida que van creciendo el requerimiento transfusional se reduce significativamente, a veces en forma total. Se ha observado que mientras el 70 - 80% de niños con ESH requieren 1 o 2 transfusiones durante sus primeros 12 meses de vida, solo el 10 - 30% necesitan soporte transfusional posteriormente *(Pinto et al 1995, Delhommeau et al 2000).* Basados en esta observación, algunos autores utilizan eritropoyetina humana recombinante para producir una estimulación de la eritropoyesis que pueda compensar total o parcialmente el grado de hemólisis *(Tchernia et al 2000, Donato et al 2014).*

OBJETIVOS

General

Contribuir al diagnóstico de la Esferocitosis Hereditaria y al conocimiento de su fisiopatología.

Específicos

- Caracterizar mediante parámetros de laboratorio general a los pacientes con ESH.
- Establecer el perfil de proteínas de membrana deficientes de los pacientes con ESH en nuestra población.
- Detectar formas asintomáticas de la enfermedad.
- Establecer el patrón de herencia en nuestra población.
- Implementar nuevas pruebas diagnósticas para ESH no realizadas en nuestro país.
- Reducir el volumen de sangre requerido para establecer el diagnóstico en forma precoz.
- Establecer si existe relación entre los resultados de las pruebas diagnósticas y la severidad de la enfermedad.
- Evaluar el grado de eriptosis basal de los eritrocitos de pacientes con Esferocitosis Hereditaria. Observar el comportamiento frente al estímulo térmico explorando los mecanismos involucrados en la exacerbación de la anemia durante los procesos febriles.
- Determinar el nivel de expresión y la influencia de la AQP-1 en la Esferocitosis Hereditaria.

MATERIALES y MÉTODOS

Consideraciones éticas

Todos los estudios comprendidos en el presente trabajo de tesis fueron realizados bajo las condiciones éticas de la investigación clínica, cumpliendo con los requisitos que son exigidos por la reglamentación general y la declaración de Helsinki y sus posteriores enmiendas. Los protocolos *"Utilidad de nuevos métodos diagnósticos en la Esferocitosis Hereditaria"* y *"Fisiopatología de los eritrocitos en las anemias hereditarias"* comprenden los estudios aquí presentados y fueron aprobados por el Comité de Docencia e Investigación y el Comité de Bioética del Hospital Nacional Prof. A. Posadas.

Población

Se estudiaron 180 individuos con signos y síntomas de anemia hemolítica, de los cuales 51 tenían diagnóstico previo de ESH por la evolución clínica y/o las pruebas tradicionales (curvas de fragilidad osmótica y autohemólisis). Siempre que fuera posible se extendió el estudio al grupo familiar. De esta forma fueron estudiados un total de 282 individuos. Paralelamente se estudiaron 569 controles normales.

Reactivos

Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck o Biopack). Las soluciones y reactivos fueron preparadas con agua estéril.

Citómetros

El citómetro utilizado para las pruebas de uso diagnóstico fue el FacScalibur (Becton Dickinson) con el software CELLQuest (Hospital Nacional Prof. A. Posadas).

Para los ensayos de investigación básica se empleó el citómetro de flujo FACS AREA (BD) (Servicio de Citometría deI Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA).

Analizador automático para hematología

Los hemogramas fueron realizados en el analizador hematológico Counter 19 de Wiener lab.

Pruebas para el diagnóstico

PRUEBA DE AUTOHEMOLISIS (AH)

Se cuantifica la hemólisis producida durante una incubación de 48 h en baño de agua termostatizado a 37 °C de los eritrocitos suspendidos en su propio plasma. Paralelamente se evalúa el efecto en el porcentaje de hemólisis obtenido habiendo agregado glucosa *(Selwyn y Dacie 1954, Young et al 1956).*

Las muestras se procesan inmediatamente de realizada la extracción. Se procesa simultáneamente al menos una muestra correspondiente a un individuo normal (donante sano). Se determina el hematocrito de las muestras. Se prepara en tubos estériles el "patrón" y el "blanco" por dilución con NH_3 0,04% de sangre entera (1:200) y plasma (1:10) respectivamente. Se conservan a 0 °C durante 48 h. Para cada muestra se coloca en dos tubos estériles 1 mL de sangre heparinizada. A uno de ellos se le agrega 0,2 mL de su propio plasma (tubo I), al otro igual cantidad de glucosa al 5% (tubo II). Se incuba a 37 °C durante 48 h y luego se centrifugan suavemente. Se efectúa una dilución 1:10 de los sobrenadantes con NH_3 0,04%. Se efectúan las lecturas de absorbancia a 540 nm y se determina el porcentaje de hemólisis obtenido en los tubos I y II.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A_i - A_{blanco}) \cdot (100 - Hto)}{(A_{patrón} - A_{blanco}) \cdot 20}$$

A_i = absorbancia del Tubo I ó II
Hto = Hematocrito (%)

Valores de referencia

Los límites de % de hemólisis normales para 48h de incubación son:

Sin glucosa añadida (tubo I) = 0,2 a 2 %

Con glucosa añadida (tubo II) = 0 a 0,9 %

Interpretación de los resultados

La prueba permite demostrar un aumento de hemólisis y por lo tanto es una confirmación de que existe un proceso hemolítico. En la ESH se observa autohemólisis aumentada que corrige con el agregado de glucosa.

Los esferocitos además de poseer una relación área/volumen alterada presentan hiperactividad de la bomba de Na^+, y una glucólisis aumentada para balancear el flujo de Na^+. La depleción de la fuente de energía impide equilibrar el movimiento de cationes produciéndose lisis osmótica. Para el esferocito la lisis se inicia antes y progresa más rápidamente por su consumo basal de glucosa

incrementado. Si el paciente presenta gran cantidad de esferocitos en estado prelítico puede no observarse corrección con glucosa y la prueba de autohemólisis arrojaría resultados falsos negativos para la corrección. Sin embargo la población esferocítica se evidenciaría en la curva basal de fragilidad eritrocitaria.

.

FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA (FOE)

Se cuantifica la hemólisis producida en eritrocitos suspendidos en soluciones de hipotonía creciente. La muestra a utilizar es sangre anticoagulada con heparina, estéril, recientemente extraída.

Simultáneamente con las muestras se procesa sangre de al menos un individuo normal (*Parpart et al 1947).*

A partir de la solución madre de NaCl 10% en *buffer* fosfato (NaCl 18,0 g; Na_2PO_4H 2,731 g; $NaPO_4H_2.2H_2O$ 0,486 g; H_2O dest. c.s.p. 200 mL) se preparan diluciones de concentración final de NaCl 0,10%; 0,20%; 0,30%; 0,35%; 0,40%; 0,45%; 0,50%; 0,55%; 0,60%; 0,65%; 0,75%; 0,85% y 1,20%. La prueba se realiza en dos etapas:

Curva basal: se añaden 50 µL de sangre entera recién extraída en 5 mL de las diluciones mencionadas (desde 0,10% a 0,85%) y en agua destilada. Se homogeiniza suavemente por inmersión y se deja reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se homogeiniza nuevamente y se centrifuga durante 5 min a 2000 rpm. Se determina la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm. Se utiliza como blanco de lectura la absorbancia correspondiente al sobrenadante de la dilución de 0,85% de NaCl. La absorbancia del sobrenadante obtenido en agua destilada (A_{total}) representa la hemólisis total.

Curva diferida: se incuba 1-2 mL de sangre heparinizada recién obtenida durante 24 h a 37 °C en forma estéril. Luego se procede de igual forma que en la curva basal empleando además la dilución 1,20% de NaCl para ser utilizado como blanco de lectura.

Expresión de los resultados

Para cada muestra analizada se registra:

– %Hemólisis obtenido en cada tubo,calculada de la siguiente forma

$$\%\text{Hemólisis}_{(\text{dilución i})} = \frac{A_{\text{sobrenadante i}} \times 100}{A_{\text{total}}}$$

– Gráfico: %Hemólisis vs %NaCl. A partir de estos gráficos se obtiene por interpolación la fragilidad corpuscular media basal y diferida (FCM)

- Gráfico: Incremento del %Hemólisis vs %NaCl. Mediante estos gráficos se pondrá en evidencia las diferentes poblaciones eritrocitarias.
- Resistencia Mínima (Rmín): *concentración de la dilución (%NaCl) en la que se visualiza el primer indicio de hemólisis.*
- Fragilidad Corpuscular Media (FCM): *%NaCl al cual se produce el 50% de hemólisis*.
- Resistencia máxima (Rmáx): *%NaCl en el que se visualiza la primera ausencia de eritrocitos precipitados (hemólisis completa)*

Valores de referencia

- Gráficos (ver figura M&M1)
- R mín basal: 0,45 - 0,55 % diferida: 0,60 - 0,75 %
- R máx basal: 0,30 - 0 % diferida: 0,40 - 0 %
- FCM basal: 0,400 - 0,445 % diferida: 0,465 - 0,590 %

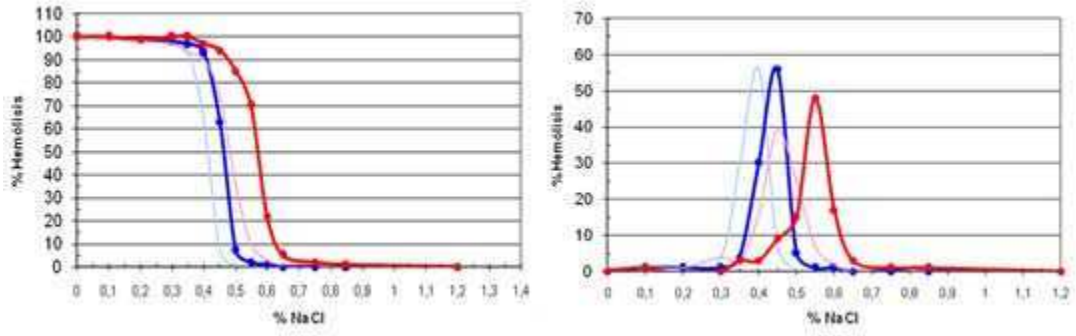
Interpretación de los resultados

En el corto período de incubación en los medios hipotónicos no se produce intercambio de cationes, sólo se produce la entrada de agua al eritrocito generando su lisis cuando alcanza un volumen crítico. La resistencia o fragilidad osmótica depende principalmente de la relación que existe entre la superficie y el volumen del eritrocito (S/V).

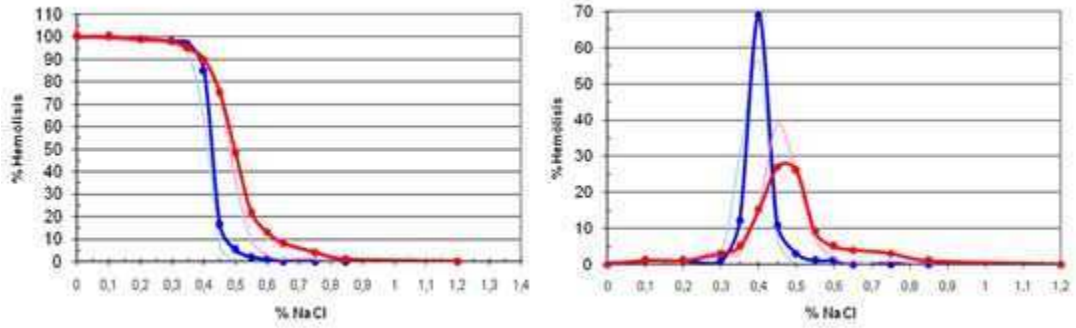
La curva diferida permite acentuar las diferencias respecto de la población eritroide normal. Durante la incubación se produce la maduración de los reticulocitos (osmóticamente resistentes) y se somete a los eritrocitos a un excesivo stress metabólico incrementandose la pérdida de membrana.

Los esferocitos poseen una relación S/V disminuida por lo tanto presentan una mayor fragilidad osmótica. Los efectos que se visualizan pueden ser desde un corrimiento paralelo de la curva normal (Tipo I), visualización de una cola que corresponde a la población esferocítica en estado lítico (Tipo II) o perfiles completamente alterados (Tipo III) (figura M&M 1). En aquellos casos en que se observe un corrimiento de la curva en sentido inverso deberá dirigirse el estudio hacia la búsqueda de una hemoglobinopatía (figura M&M 2). En hepatopatías, deficiencia de hierro, vitamina B_{12} o ácido fólico pueden observarse subpoblaciones osmóticamente resistentes.

Tipo I



Tipo II



Tipo III

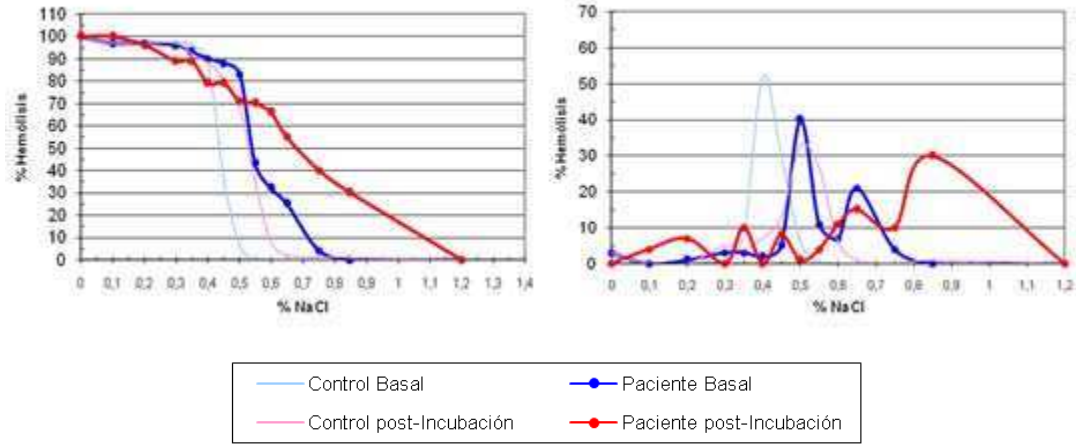


Figura M&M 1: Curvas de Fragilidad Osmótica Eritrocitaria (FOE). En la esferocitosis hereditaria puede visualizarse un corrimiento paralelo de la curva normal (Tipo I), visualización de una cola que corresponde a la población esferocítica en estado lítico (Tipo II) o perfiles completamente alterados (Tipo III). Las gráficas corresponden a pacientes diagnosticados en el presente trabajo.

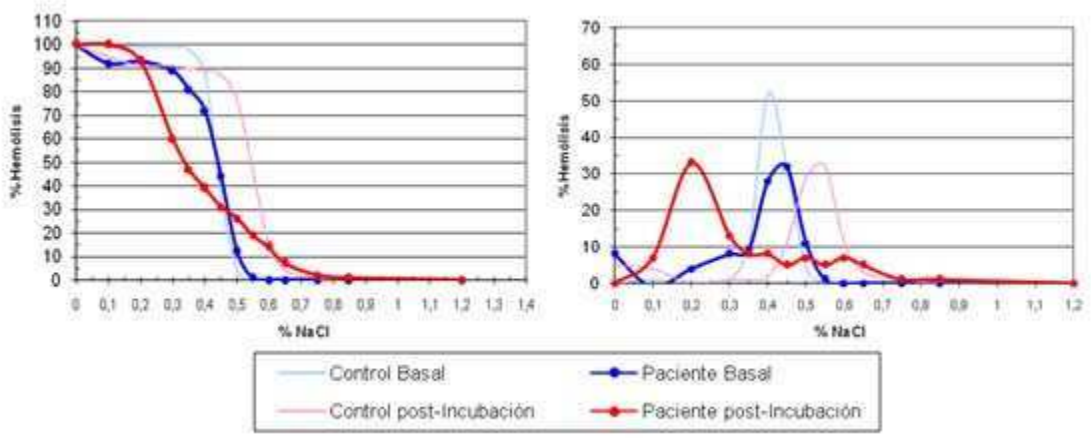


Figura M&M 2: Curvas FOE correspondientes a un paciente talasémico. La curva diferida presenta resistencia osmótica aumentada, observándose un corrimiento inverso a la observada en la esferocitosis hereditaria.

CRIOHEMOLISIS HIPERTÓNICA (CH)

Se cuantifica la hemólisis que se produce cuando eritrocitos suspendidos en un medio hipertónico son sometidos a un brusco cambio de temperatura *(Streichman et al 1990, Streichman y Gescheidt 1998)*. La muestra, sangre anticoagulada con EDTA o heparina puede conservarse hasta 24 h posteriores a su extracción. La técnica utilizada posee leves modificaciones respecto a la descripta por los autores originales *(Crisp et al 2011).*

Se prepara *buffer* sucrosa disolviendo 2,4 g de sucrosa (Biopack) en 10 mL de *buffer* fosfato 50 mM (NaH_2PO_4 0,3387 g; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 3,4657 g; H_2O c.s.p. 250 ml, pH 7,4). Los eritrocitos se lavan 3 veces con solución fisiológica (SF) fría y se suspenden al 50 - 70% en SF conservándolos en frío hasta el inicio de la prueba. Se preincuba 2 mL de *buffer* sucrosa a 37 °C en baño de agua y se agrega 50 µL de la suspensión de eritrocitos. Se agita vigorosamente unos segundos y se continúa la incubación durante 10 min. Se transfiere el tubo a baño de hielo durante 10 min. Se agita vigorosamente unos segundos y se centrifuga 5 min a 3500 rpm. Se determina la absorbancia del sobrenadante a 540 nm (Abs_1). Paralelamente se hemolizan 50 µL de la suspensión de eritrocitos en 2 mL de agua. Se centrifuga, se diluyen 200 µL del sobrenadante –que representa el 100% de hemólisis– en 4 mL de agua y se determina la absorbancia a 540 nm ($Abs_{Total\ dil}$). El porcentaje de criohemólisis se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Criohemólisis} = (Abs_1 / Abs_{Total\ dil}) \times 5$$

Valores de Referencia

Los valores de referencia fueron determinados en la población de donantes sanos dado que la técnica presenta variaciones respecto a la descripta por Streichman y colaboradores.

VN: (1,48 ± 0,57) % (X ± DE N= 214 controles sanos)

Interpretación de los resultados

Los eritrocitos de las esferocitosis hereditarias son más susceptibles que los eritrocitos normales a los cambios bruscos de temperatura obteniéndose mayor porcentaje de hemólisis. La prueba no depende de la relación S/V sino de la integridad de las proteínas de membrana. Esta prueba presenta la ventaja de arrojar resultados normales cuando la presencia de esferocitos se relaciona con anemias hemolíticas autoinmunes.

CITOMETRIA DE FLUJO CON 5'EOSINA MALEIMIDA (5'EMA - CF)

Se evalúa la intensidad de fluorescencia emitida por el reactivo 5'eosina maleimida que interacciona covalentemente con las proteínas Banda 3 (principalmente), RhAG, Rh y CD47 de la membrana eritrocitaria *(King et al 2000, King et al 2004)*. Se utiliza sangre anticoagulada con EDTA del paciente y de seis individuos normales obtenida el mismo día que la del paciente, de manera de asegurar el mismo tiempo de envejecimiento de las mismas. Las muestras deben conservarse a 4 °C hasta su procesamiento (≤ 72 h). El reactivo 5'EMA (Sigma – Fluka 63184) disuelto en PBS estéril (0,5 mg/mL) se conserva a -70 °C.

Se lavan 30 μL de sangre con *buffer* fosfato salino (PBS) tres veces descartando los sobrenadantes. Se colocan 5 μL del paquete globular en un tubo conteniendo 10 μL de reactivo (5'EMA 0,5 mg/mL en PBS estéril) homogeneizando eficientemente. Se incuba en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se lava con PBS hasta que los sobrenadantes sean claros (2 - 3 veces) y se resuspende en 1 mL del mismo *buffer*. Se adquieren 20.000 eventos a velocidad baja. Se determina en el detector FL-1 la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (IFM) y su correspondiente coeficiente de variación (CV).

Resultado

Se determina el porcentaje de disminución de la IFM y el porcentaje de aumento del CV respecto del promedio obtenido para 6 controles normales procesados simultáneamente y que posean el mismo tiempo de almacenamiento que la muestra testeada (≤ 72 h).

Interpretación de los resultados

En la ESH, cualquiera sea la proteína deficiente primaria, se obtiene una disminución de la fluorescencia debido a la pérdida de membrana que contiene las proteínas que reaccionan con el reactivo fluorescente (figura M&M 3). Es importante destacar que en otras anemias hemolíticas la fluorescencia emitida es normal de manera que permite diferenciar los esferocitos presentes en la ESH de aquellos presentes en las anemias hemolíticas autoinmunes. No discrimina la Eliptocitosis Congénita (EC) de la población normal pero sí la piropoiquilocitosis hereditaria (PPH) en la cual aparece un doble pico en el histograma de fluorescencia, por lo tanto este método es útil para diferencia ESH, EC y PPH entre sí *(King et al 2000)*.

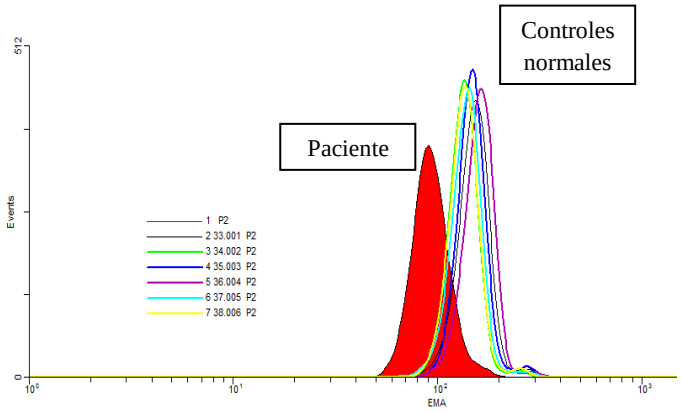


Figura M&M 3: histogramas superpuestos correspondientes al detector FL-1 de 6 controles normales y un paciente con diagnóstico de ESH. Se observa la marcada disminución de la intensidad de fluorescencia del reactivo 5'eosina maleimida en los eritrocitos del paciente. Los datos corresponden a un paciente diagnosticado en el presente trabajo.

FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA POR CITOMETRIA DE FLUJO (FOE- CF)

Se cuantifican los eritrocitos resistentes a la hemólisis producida por el agregado de agua a una suspensión de sangre entera en solución fisiológica *(Won y Suh 2009)*. Puede utilizarse sangre anticoagulada con EDTA o con heparina que debe ser procesada dentro de las 24 h de obtenida.

Se suspenden 25 µL de sangre entera en 1 ml de solución fisiológica. Inmediatamente se agregan 10 µL de esta suspensión a un tubo de citómetro conteniendo 1,1 mL de solución fisológica. Se realiza la adquisición en el citómetro durante 25 segundos, registrando los parámetros del detector frontal FSC (*Foward Scatter Channel*), y el detector ortogonal SSC (*Side Scatter Channel*) y el tiempo. Se pausa la adquisición, se retira el tubo del citómetro y se agregan 0,9 mL de agua destilada homogeneizando por inversión 1 vez. Se continúa la adquisición durante 2 min (figura M&M 4).

Análisis de los resultados

En el histograma de tiempo, se establecen marcas consecutivas que involucren un mismo período de tiempo (*markers* de igual longitud). Se comprueba la estabilidad de los eventos remanentes en los tiempos más avanzados. Se generan regiones a partir de las marcas anteriores: una en los tiempos iniciales (R_2: suspensión de eritrocitos en SF) y otras dos (R_3, R_4) en las etapas finales de la adquisición (figura M&M 5). Se obtiene el número de eventos de cada región y se calcula el porcentaje de células residuales con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células Residuales} = \frac{(\text{Eventos } R_3 + \text{Eventos } R_4) : 2 \quad \text{x } 100}{\text{Eventos } R_2 \text{ x } (1{,}1 : 2{,}0)}$$

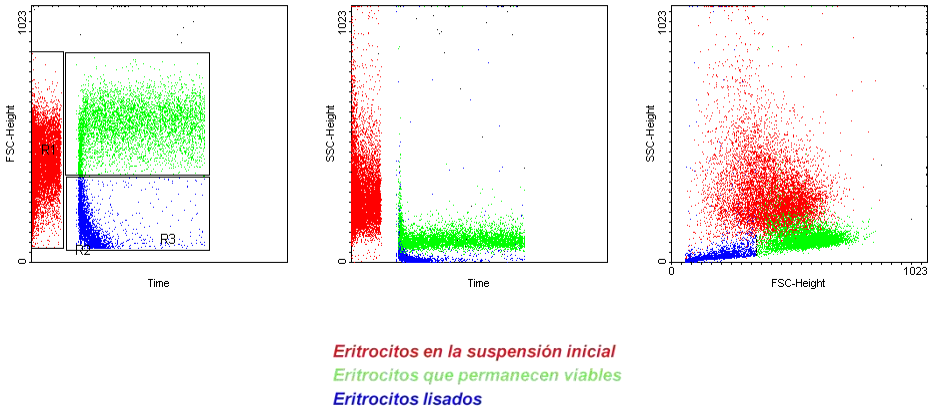


Figura M&M 4: Dot-plot visualizados al realizar la FOE-CF. En rojo: los eritrocitos se encuentran suspendidos en SF. La zona de interrupción (sin eventos) corresponde al tiempo transcurrido durante el agregado de agua. En verde: los eritrocitos que permanecen viables presentan un mayor FSC y un menor SSC por aumento de su volumen en el medio hipotónico y disminución de su complejidad por pérdida de su forma bicóncava.

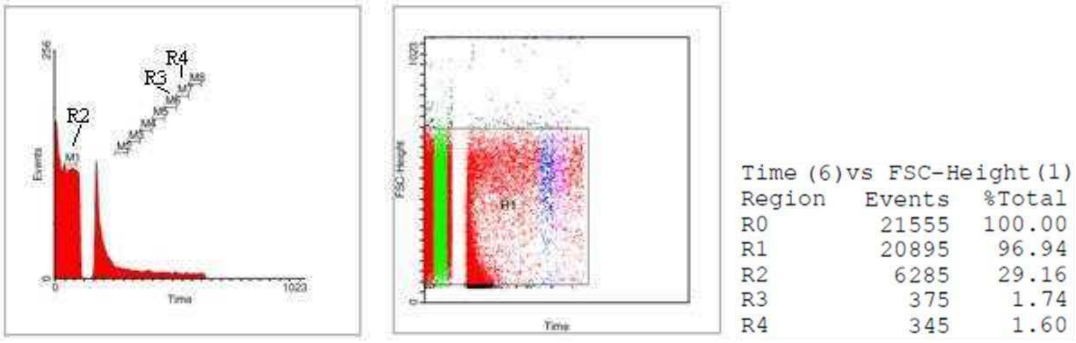


Figura M&M 5: Análisis de los resultados. A la derecha: histograma de tiempo en el que se determinan marcas que abarquen iguales tiempos. A la izquierda: Dot-plot donde se observan las regiones generadas a partir de las marcas del histograma R_2, R_3 y R_4 en verde azul y violeta respectivamente. La tabla informa el número de eventos de cada zona para realizar el cálculo del porcentaje de células residuales.

Valores de referencia

Se establecieron los valores de referencia en controles normales dado que la técnica fue recientemente descripta.

Células Residuales = (60,2 ± 21,3) % (X ± DE, N= 38)

Interpretación de los resultados

Los esferocitos presentan una menor resistencia ante el medio hipotónico debido a su relación S/V alterada que determina un menor porcentaje de eritrocitos remanentes en la suspensión.

PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITARIA

Los eritrocitos se lisan y luego de exhaustivos lavados se obtienen las membranas (*ghost*) que se fraccionan por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes *(Vittori et al 2002)*. Posteriormente se cuantifica por densitometría.

Obtención de las membranas eritrocitarias (*ghost*)

Una alícuota de sangre estéril anticoagulada con heparina se lava 3 veces con *buffer* fosfato salino (PBS: NaCl 0,137 M; KCl 3 mM; NaH_2PO_4 1,9 nM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4). La muestra se mantiene refrigerada y todas las centrifugaciones se realizan a 4 °C para evitar la degradación proteica (centrífuga refrigerada Hermle Z323K). Para asegurar la remoción de leucocitos y plaquetas, se descartan 3 - 4 mm de la porción superior de la columna de eritrocitos. La hemólisis se lleva a cabo por dilución 1:13 del paquete globular con *buffer* fosfato de sodio hipotónico 5 mM, pH 8,0; conteniendo inhibidor de proteasas fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 50 μM. Luego de incubar 15 min en hielo, se centrifuga a 13000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción citosólica) se descarta y las membranas se lavan exhaustivamente con el mismo buffer hasta obtener sobrenadante libre de hemoglobina. Las centrifugaciones se realizan bajo las mismas condiciones descriptas. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Lowry *(Lowry et al 1951)*. Las membranas eritrocitarias se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realiza la electroforesis de las membranas eritrocitarias en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La diferencia de distancia recorrida por las proteínas en un gel restrictivo se basa en diferencias entre sus tamaños moleculares, dado que el tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las mismas.

Se utiliza una cuba electroforética Miniprotean II (Bio-Rad) y una fuente de poder EPS 600 (Pharmacia) con el sistema discontinuo de Laemmli *(1970)*. Se preparan mini-geles (7 cm x 8 cm x

1 mm). La concentración de monómero (T) en el gel concentrador es 4% (acrilamida 39 g/L; bisacrilamida 1 g/L; SDS 1 g/L) en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se emplea N, N, N', N'- tetrametilendiamina (TEMED $\delta = 0,77 \pm 0,02$ g/L) 0,3 ml/L y persulfato de amonio 0,37 g/L como iniciador. El T utilizado en el gel separador es 8% (acrilamida 78 g/L; bisacrilamida 2,1 g/L; SDS 1 g/L; TEMED 0,3 ml/L; persulfato de amonio 0,37 g/L) en Tris-HCl 375 mM, pH 8,8.

Las membranas se solubilizan en el *buffer* de muestra (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; conteniendo SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,01 g/L) por calentamiento a ebullición durante 1 min. Una masa de 15 µg de proteínas se siembra en cada calle. En cada placa se siembra la muestra del paciente por triplicado, 6 calles con membranas pertenecientes a controles normales (donantes) diferentes y un marcador de pesos moleculares preteñido.

La electroforesis se desarrolla a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y 25 mA en el gel separador utilizando *buffer* de corrida de pH 8,3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%).

Al finalizar la electroforesis (aproximadamente 1 h), el gel se colorea utilizando azul brillante de Coomassie R-250 0,2% en solución decolorante (metanol: ácido acético: agua destilada, 3:1:6 v/v/v) durante 30 min y posteriormente se decolora.

Cuantificación de las proteínas de membrana

Las proteínas se cuantifican por densitometría. Se analiza cada calle utilizando el *software* GelPro Analyzer 4.0, determinando el porcentaje relativo de las bandas involucradas en la patología: α-Sp, β-Sp, Ank, Banda 3, Prot 4.1 y Prot 4.2.

Se promedian los resultados obtenidos en las tres calles correspondientes a la muestra del paciente.

Para establecer la/s proteína/s deficiente/s se genera un intervalo de predicción del 90% a partir de la cuantificación porcentual de los seis individuos normales corridos simultáneamente en el gel. Si el valor promedio obtenido para el paciente se encuentra por debajo del límite inferior del intervalo de predicción se concluye la deficiencia de la proteína y se calcula el porcentaje de deficiencia considerando los valores medios del paciente y los controles normales. Este procedimiento se realiza para cada una de las proteínas analizadas (figura M&M 6).

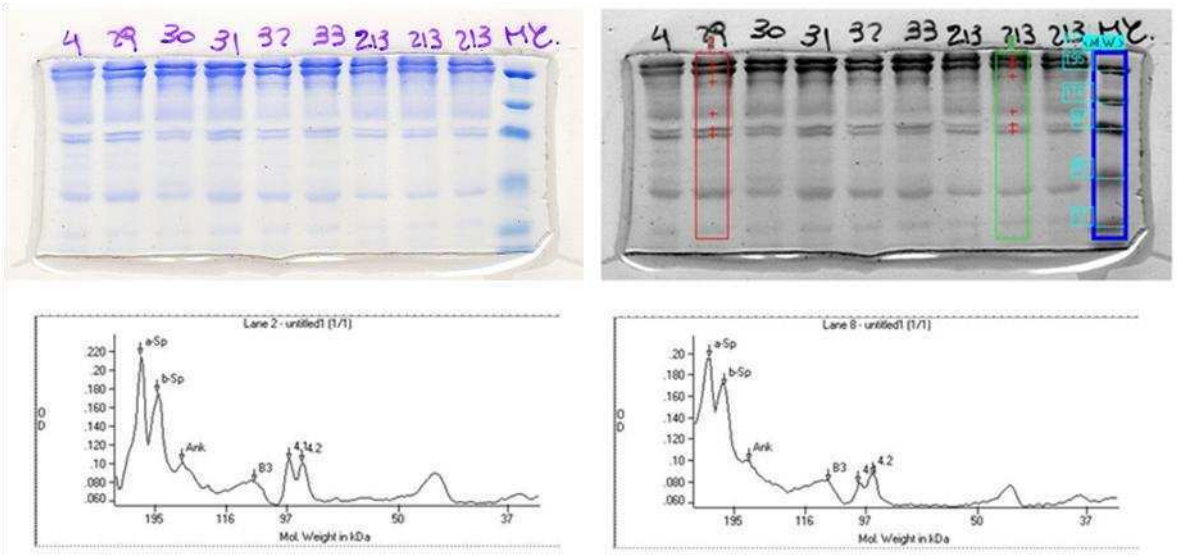
El intervalo unilateral de predicción es: $\overline{X} - t \,.\, DE \,.\, \sqrt{(1 + 1/n)}$ ó bien $\overline{X} - 1,59.DE$

Donde t = 1,476 para una probabilidad del 90% para 5 grados de libertad.

Grados de libertad = n-1, donde n = número de controles normales.

La interpretacion es que hay un 90% de probabilidad de que un futuro valor sea igual o mayor que el punto establecido, si el individuo es normal. Si el futuro valor resulta menor que ese punto, se puede inferir que es una reducción significativa.

Utilizar una probabilidad del 90% es aceptable en una situación en la que se entiende que no se pueden correr de rutina, más que unos pocos individuos controles.



	Controles Normales (n=6)		**$\bar{x}_{CN}$ ± 1,59 x DE $_{CN}$**		**Paciente**
Proteína	$\bar{x}$	DE	Valor Mínimo	Valor Máximo	$\bar{x}$
α-Sp	19,57	0,51	18,75	20,38	19,45
β-Sp	18,80	2,03	15,57	22,03	19,43
Ank	19,77	0,61	18,81	20,73	20,94
Banda 3	23,78	1,55	21,31	26,24	23,96
Prot 4.1	8,82	0,56	7,93	9,71	**6,86**
Prot 4.2	9,26	0,99	7,69	10,84	9,36

Figura M&M 6: Ejemplo de la cuantificación de las proteínas de membrana. Arriba a la izquierda: imagen del gel correspondiente al estudio del familiar de un paciente (ID 213). La muestra se siembra por triplicado. Las primeras seis calles corresponden a membranas obtenidas de donantes sanos (ID 4, 29, 30, 31, 32 y 33) y la última al marcador de pesos moleculares. Arriba a la derecha: se muestra la imagen para el análisis del mismo gel. Se identifican dos de las calles cuyos densitogramas figuran abajo (línea 2 (ID 29) y línea 8 (ID 213). En la tabla se informa los valores porcentuales promedio obtenidos para los 6 controles normales y los valores máximos y mínimos obtenidos en los intervalos de predicción del 90% para cada proteína relevada. En este estudio se concluye que el individuo (ID 213) presenta deficiencia de Prot 4.1 dado que el valor promedio obtenido en su muestra es inferior al valor mínimo que corresponde al intervalo de predicción.

Ensayos para investigación

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La observación con el microscopio electrónico de barrido y la obtención de las fotografías se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica de CITEFA.

Las muestras se colocan sobre vidrios de 50 mm^2 de área, y se fijan durante 20 min con glutaraldehído 3% (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4. Luego de efectuar 3 lavados con el mismo *buffer*, se deshidratan mediante sucesivos lavados con acetona de concentración gradualmente creciente (de 25% a 100%, v/v). El secado se completa con en una bomba para punto crítico (Balzers CPD 030) utilizando dióxido de carbono como fluido de transición. Las muestras se cubren con una fina capa de oro y paladio (Balzers Union SCD 040) y se examinan en el microscopio electrónico de barrido (Phillips 515) tomando fotografías digitales de los campos representativos.

DETERMINACIÓN DE LA OSMOLALIDAD SÉRICA

Se determina la osmolalidad sérica de individuos normales y pacientes mediante un osmómetro de presión de vapor (WESCOR VAPRO modelo 5600). El equipo se calibra con soluciones patrones de 100; 290 y 1000 mmol/Kg. Cada determinación se realiza por triplicado.

EXPRESIÓN DE AQUAPORINA 1 (AQP-1)

La expresión de AQP-1 en los eritrocitos se evalúa por citometría de flujo. El anticuerpo utilizado reconoce específicamente los residuos 242 a 260 de la AQP-1 humana obligando a permeabilizar previamente los eritrocitos.

La sangre entera anticoagulada con heparina se suspende (dilución 1/50) en solución fijadora fría (0,05% de gluteraldehído en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente. El proceso de fijación finaliza por centrifugación a 4000 rpm durante 4 min y tres lavados con PBS adicionado con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1%. Posteriormente los eritrocitos se suspenden en la solución permeabilizante (0,1% Tritón en 0,1% BSA-PBS) durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lava una vez y se resuspende el sedimento en la solución de lavado. Se procede a la marcación tomando un volumen de suspensión que contenga aproximadamente 10^6 eritrocitos totales agregando anticuerpo policlonal de conejo anti-AQP1 0,4 mg/mL (Millipore) en dilución final 1/12,5 incubando 1 h a temperatura ambiente. Los eritrocitos se lavan y resuspenden al volumen inicial en 0,1% BSA-PBS. Se agrega el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo obtenido en ratón conjugado con FITC (1 mg/mL) en dilución final 1/50; se incuba 30 min a temperatura

ambiente en oscuridad. Finalizada la incubación se agrega 1 mL de solución de lavado, se centrifuga y se resuspende en 1% de formaldehido en 0,1% BSA-PBS y se analiza en el citómetro.

Control negativo: se prepara una suspensión de los eritrocitos fijados y permeabilizados mezclando iguales volúmenes de todas las muestras y el control procesados en el día, se utiliza como anticuerpo primario IgG de conejo (1mg/mL) en dilución final 1/50.

Control de permeabilización: se procede con el mismo protocolo utilizando como anticuerpo primario anti-Hb en dilución final 1/50 para cada una de las muestras individuales. Los resultados se expresan en función del control normal procesado simultáneamente, mediante las medianas de intensidad de fluorescencia sustrayendo la fluorescencia obtenida para el control negativo (Med F* corregida):

% Expresión de AQP= (Med F*corregida del paciente/ Med F*corregida del control) x 100.

Cuantificación

La determinación cuantitativa del número de moléculas de AQP-1 por eritrocito se realiza bajo el mismo protocolo pero utilizando el anticuerpo secundario conjugado a ficoeritrina (PE). La curva de calibración se realizó con microesferas QuantiBrite PE (Becton Dickinson). Este fluorocromo no es el más conveniente cuando la marcación es intracelular ya que presenta un mayor impedimento estérico pero debió ser utilizado debido a que las microesferas que permiten la cuantificación sólo están disponibles en nuestro mercado conjugadas con PE.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN

Se realizan las pruebas diagnósticas que involucran el pasaje de agua a través de la membrana en presencia de inhibidores de AQP-1: Hg^{2+} y Cu^{2+}. Muestras de sangre anticoaguladas con heparina se incuban previamente entre 1 h y un máximo de 3 h 20 min con $HgCl_2$ en concentraciones finales entre 0,1 a 40 μM o con $CuCl_2$ 400 mM. Las curvas de fragilidad eritrocitaria y las criohemólisis son realizadas de acuerdo a técnicas ya descriptas.

ESTUDIOS DE ERIPTOSIS

Se evalúa la eriptosis generada por efecto de la temperatura en muestras de sangre periférica heparinizada (heparina-litio) de pacientes con ESH y de controles normales. Las muestras se centrifugan por 15 min a 500 g y 4 ºC, el plasma y los leucocitos y plaquetas se remueven

cuidadosamente. Los eritrocitos se lavan 3 veces con PBS y se suspenden al 1% en buffer HEPES (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, glucosa 10 mM y BSA 0,1% (p/v); pH 7,4). En algunos ensayos se utiliza buffer HEPES libre de Ca^{2+} obtenido por adición de EGTA 2 mM y sin el agregado de $CaCl_2$. Luego de los tratamientos (incubación a 36,5 y 38,5 °C durante 24 h) se centrifuga a 2000 rpm, 5 min resuspendiendo el *pellet* al 1% con PBS.

Células senescentes

Se evalúa la senescencia celular por citometría de flujo analizando el tamaño y la complejidad interna mediante los detectores *Foward* (FSC) y *Side Scatter* (SSC). Se consideran senescentes aquellas células que hayan disminuido su volumen y/o aumentado su complejidad respecto de su correspondiente control en el ensayo.

Translocación de fosfatidilserina

La pérdida de la asimetría de la membrana plasmática es considerada una caracterítica específica de la eriptosis. Se identifica mediante citometría de flujo el fosfolípido fosfatidilserina (FS) traslocado hacia la capa externa de la bicapa lipídica por la unión con la proteína Anexina V conjugada con isocianato de fluoresceína (FITC). A un volumen de 10 μL de la una suspensión de eritrocitos al 1% se añade 90 μL de *binding buffer* (HEPES/NaOH 0,01 M pH 7,4; NaCl 0,14 M; $CaCl_2$ 2,5 mM) y 5 μL de Anexina V-FITC (BD Biosciences). Se incuba 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detiene por el agregado de 400 μL de *binding buffer* y el análisis se efectúa dentro de la primera hora subsiguiente.

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se diluye 1:10 en PBS la suspensión de eritrocitos al 1%. Se incuba durante 15 min a 37 °C en atmósfera conteniendo 5% de CO_2 con el reactivo 2' 7' diacetato de diclorofluorescina DCFH-DA (Sigma) en concentración final 0,4 mM *(Ghoti et al 2007)*. Finalizada la incubación, la reacción se detiene por el agregado de PBS frío y se analiza inmediatamente.

Las células son permeables al reactivo no fluorescente. En el interior de las células es hidrolizado por las esterasas y por oxidación se transforma en 2', 7' diclorofluoresceína (compuesto altamente fluorescente) realizando su detección por citometría de flujo (figura M&M 7). Permite determinar en forma rápida y sensible las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan durante el metabolismo oxidativo.

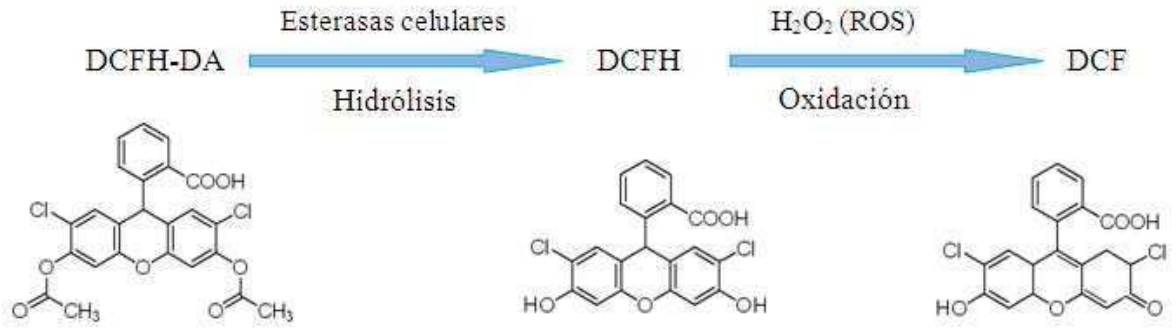


Figura M&M 7: Secuencia de reacciones que se producen en el interior del eritrocito en la detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Glutation reducido (GSH)

Para la cuantificación de los niveles de GSH intracelular, se diluye 1:10 en PBS la suspensión de eritrocitos al 1%. La temperatura debe mantenerse en 0 °C durante todo el ensayo. A un volumen de de la suspensión se le agrega el reactivo *Mercury Orange* (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 μM (figura M&M 8). Luego de 3 min exactos se analiza la suspensión por citometría de flujo adquiriendo 20.000 eventos en FL-2. El reactivo naranja de mercurio forma aductos fluorescentes con el GSH mediante sus grupos tioles (SH). La reacción es más rápida con GSH que con los grupos SH de proteínas, de manera que puede alcanzarse especificidad para la determinación de GSH bajo condiciones de reacción controladas. En los eritrocitos los grupos tioles no proteicos están constituidos casi totalmente por GSH.

La difusión de GSH fuera de las células se evita manteniendo baja la temperatura durante la reacción y en todos los pasos previos. El reactivo se disuelve en acetona conservándolo en frío y oscuridad.

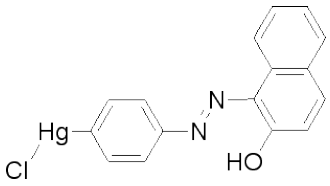


Figura M&M 8: Estructura química del reactivo Naranja de Mercurio (*Mercury Orange*) utilizado en para la determinación de glutatión reducido intracelular.

CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para cuantificar la variación del contenido de calcio libre intracelular $[Ca]_i$, los eritrocitos se lavan e incuban con la sonda fluorescente Fluo-4 acetometil ester (Fluo-4 AM, Invitrogen) en una concentración final de 2,5 μM, a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Luego de ser lavados, los eritrocitos se suspenden en PBS y se analizan a los 30 min por citometría de flujo. El contenido de calcio se expresa mediante la intensidad de fluorescencia media.

El reactivo FLUO-4 AM es un indicador de calcio incoloro que entra a la célula libremente y es hidrolizado por esterasas intracelulares no específicas que genera un producto fluorescente al unirse al $[Ca]_i$ libre.

Tratamiento estadístico

Los resultados obtenidos para las pruebas diagnósticas se expresan como media aritmética y desvío estándar (Media ± DE) como medidas de tendencia central y de dispersión.

La determinación de los valores de corte, la sensibilidad y especificidad fueron obtenidos mediante el análisis de curvas ROC.

Para establecer la/s proteína/s deficiente/s se generaron intervalos de predicción del 90% (para cada una de las proteínas analizadas) a partir de la cuantificación porcentual de individuos normales analizados simultáneamente en el gel. Si el valor promedio obtenido para el paciente se encuentra por debajo del límite inferior del intervalo de predicción se concluye la deficiencia de la proteína y se calcula el porcentaje de deficiencia considerando los valores medios del paciente y los controles normales.

Los resultados relacionados a investigación básica se expresan como media aritmética y error estándar de la media (Media ± SEM).

La prueba de Kruskall-Wallis se utilizó para comparar más de dos grupos independientes. De hallarse diferencias significativas, posteriormente se realizó la prueba de Mann-Whitney entre dos grupos para comparar distribuciones poblacionales. En el caso de muestras pareadas se utilizó la prueba de Wilcoxon. Diferencias de hasta $P < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

CAPITULO I: Características de la población estudiada

Controles normales (CN)

Se realizó el estudio en 569 controles normales, donantes del banco de sangre del Hospital Nacional Prof. A. Posadas. El rango de edad estuvo comprendido entre 18 y 66 años (36,6 ± 10,8 años). No fue posible obtener muestras de controles normales pediátricos pues no se contó con la aprobación de los comités de bioética correspondientes. Aquellos que prestaron su consentimiento resultaron predominantemente del sexo masculino (64,3%) con relación M/F = 1,8. En 252 (44,3%) controles normales se registró el grupo y factor sanguíneo. El 92,1% fueron Rh positivos y los grupos ABO más frecuentes fueron el O (58,3%) y el A (29,8%) (figura I-1).

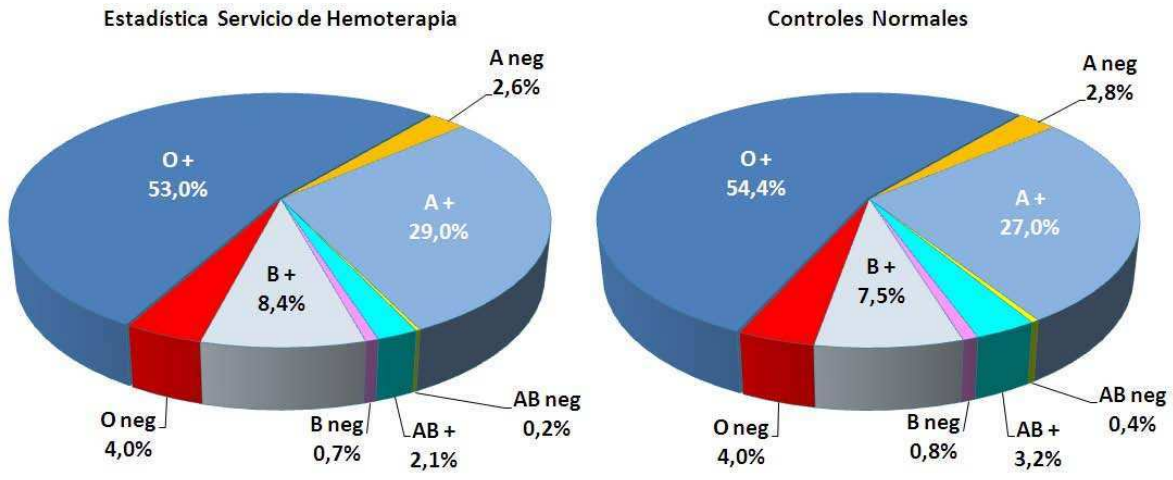


Figura I-1: Distribución de grupos sanguíneos ABO y Rh de los donantes concurrentes al Servicio de Hemoterapia (2010 a 2013; N= 24483) y de los donantes que fueron analizados como controles normales en el presente estudio.

El ofrecimiento a participar en el presente estudio fue al azar de manera que se presume que los controles utilizados son representativos de la población de donantes habituales. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de grupos sanguíneos de los controles asignados en el presente estudio respecto de los mismos parámetros analizados en la población total del Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Posadas (tabla I-1). El Servicio de Hemoterapia no realiza la estadística según sexo de manera que no pudo contrastarse esta prevalencia en la población de donantes totales. Probablemente el predominio masculino se deba a un mayor rechazo de donantes femeninos por presentar una mayor incidencia de anemia ferropénica. El descenso del hematocrito por debajo de 38% descalifica al individuo como donante independientemente del sexo.

GRUPO y FACTOR	Estadística Servicio de Hemoterapia (2010-2013)		Controles normales del presente estudio		Prueba de diferencia de proporciones	
	N	%	N	%	Chi-cuadrado	P valor
A neg	629	2,57	7	2,78	0,00009	0,9924
A +	7105	29,02	68	26,98	0,41000	0,5220
AB neg	53	0,22	1	0,40	0,00472	0,9453
AB +	519	2,12	8	3,17	0,82300	0,3642
B neg	163	0,67	2	0,79	0,02420	0,8763
B +	2051	8,38	19	7,54	0,13300	0,7153
O neg	987	4,03	10	3,97	0,01270	0,9102
O +	12976	53,00	137	54,37	0,13700	0,7113
TOTAL	24483	100,00	252	100,00		

Tabla I-1: Distribución de donantes totales ingresados al Servicio de Hemoterapia en el período 2010-2013 y de los donantes incluídos como controles normales en el presente estudio, prueba de diferencias de proporciones: no hay diferencias significativas entre las poblaciones testeadas (P > 0,05).

El análisis por grupos sanguíneos de los dadores permite confirmar que las muestras seleccionadas son representativas de la población normal disponible como donantes voluntarios. La clasificación por grupo y factor permitirá evaluar (ver capítulo V) la influencia en los resultados de la prueba diagnóstica 5'EMA-CF dado que el 20% de este reactivo se une proteínas Rh *(King et al 2004)*.

Familiares directos

En todo estudio de procesos hereditarios hay indicación de estudiar a los familiares directos. Con este propósito se estudiaron 125 familiares directos, de ellos 24 manifestaron poseer diagnóstico de ESH realizado en otros centros (confirmándose en 23) y los restantes no presentaban signos ni síntomas de anemia (figura I-2). Una vez realizado el estudio, los familiares sanos con alguna deficiencia de proteína de membrana, pero por lo demás asintomáticos y con las otras pruebas diagnósticas negativas, fueron considerados portadores sanos (PS). El estudio extendido permitió detectar 27% de familiares afectados por la patología en estudio: 18% PS y 9% presentando al menos dos pruebas diagnósticas positivas aunque no padecían síntomas (figura I-3). Además, al disponerse del estudio certero de los progenitores, pudo establecerse el patrón de dominancia en 77 pacientes.

Figura I-2: Relación de parentesco de los familiares asintomáticos estudiados respecto del propósito

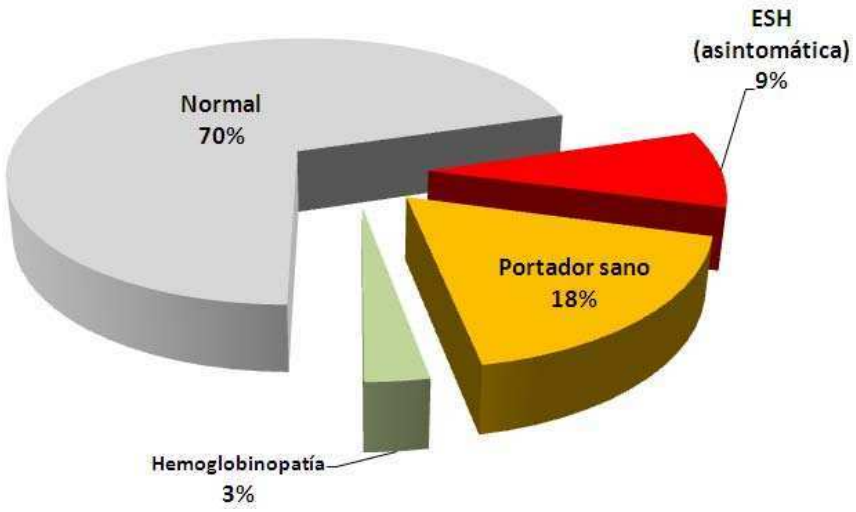


Figura I-3: Diagnósticos realizados en los familiares asintomáticos.

Pacientes estudiados

Fueron estudiados 180 individuos con anemia, de los cuales 51 poseían diagnóstico previo de ESH (23 familiares directos y 28 pacientes que concurrieron por primera vez a nuestra consulta pero que refirieron conocer su diagnóstico) estableciéndose el diagnóstico *"de novo"* en 65 pacientes. Complementando con otros estudios se establecieron los diagnósticos de β-talasemia (n=4), hemoglobinopatías asociadas a Hb S (n= 3), hemoglobinas inestables (n=2), eliptocitosis (n=1), anemias hemolíticas no esferocíticas (n=23), deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (n=2), deficiencia de Piruvato Kinasa (n=2) y ausencia de patología hereditaria en 27 casos.

En la figura I-4 se representa la distribución de diagnósticos realizados teniendo en cuenta la totalidad de los individuos estudiados (pacientes y familiares relacionados).

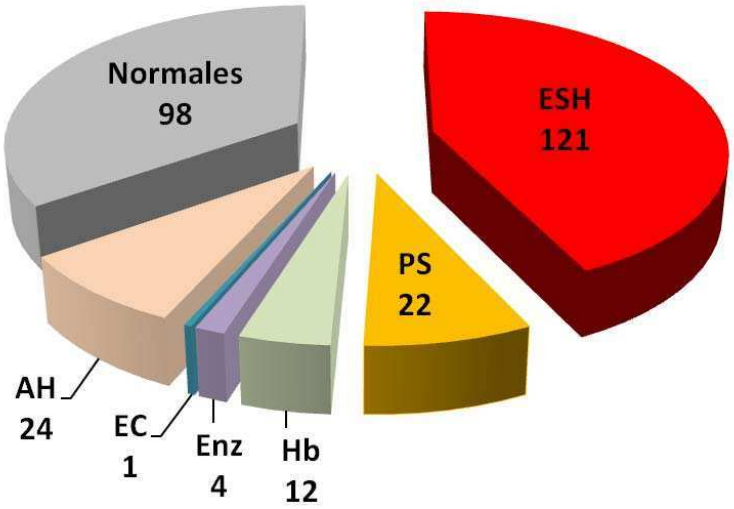


Figura I-4: Distribución de diagnósticos realizados en la totalidad de individuos estudiados (N=282) (pacientes y familiares). ESH (esferocitosis hereditaria); PS (portador sano de ESH); Hb (talasemias y hemoglobinopatías); Enz (enzimopatías); EC (eliptocitosis congénita); AH (anemias hemolíticas no esferocíticas)

Características de la población con diagnóstico de Esferocitosis Hereditaria

Los 143 individuos en los que se estableció el diagnóstico de ESH pertenecen a 84 familias argentinas no relacionadas (tabla I-2). Sus edades al momento del estudio oscilaron entre 2 días y 63 años, siendo 65 de ellos menores de 18 años.

Cantidad de individuos	Motivo de estudio	Diagnóstico previo de ESH	Diagnóstico final
28	Paciente	Sí	ESH
23	Familiar	Sí	ESH
61	Paciente	No	ESH
4	Paciente	No	PS + anemia carencial
9	Familiar	No	ESH asintomática
18	Familiar	No	PS

Tabla I-2: Clasificación de los individuos en los cuales se estableció el diagnóstico definitivo de Esferocitosis Hereditaria. Los portadores sanos (PS) fueron identificados mediante el estudio de membranas (SDS-PAGE) siendo todas las otras pruebas diagnósticas de ESH negativas.

La edad al diagnóstico presuntivo inicial también varió entre 2 días y 63 años, con la siguiente distribución: < 1 mes 20,7%; 1-12 meses 25%; 1-12 años 25%; 12-18 años 4,3%; y > 18 años 25%. En la figura I-5 puede observarse que esta patología si bien es congénita, manifestándose principalmente en la niñez, también puede manifestarse inicialmente en los adultos, siendo menos frecuente su diagnóstico en la adolescencia.

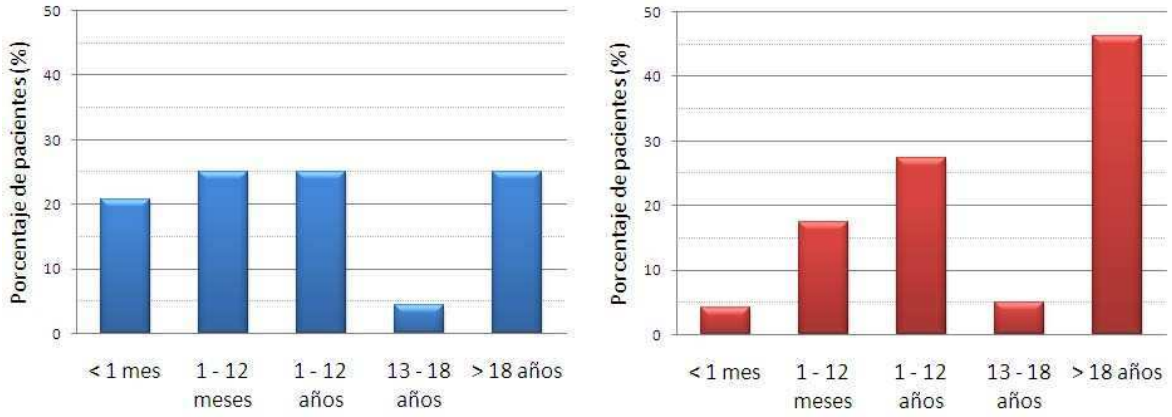


Figura I-5: Distribución de grupos etarios. A la izquierda: al momento de la presunción diagnóstica. A la derecha: al momento de su estudio en el presente protocolo.

El estudio extendido al grupo familiar del propósito permitió establecer el patrón de transmisión en 77 casos, siendo dominante en 65 (84%) y no-dominante en 12 (16%) pacientes.

En la figura I-6 puede observarse la distribución de los pacientes esplenectomizados y no esplenectomizados categorizados por el grado de severidad, según criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al 2008)*, de acuerdo al nivel de hemoglobina que presentaron al momento de realizar las pruebas diagnósticas. En la distribución de severidad reportada para pacientes con ESH predominan las formas moderadas o típicas (50 - 60%), seguidas por las leves (20 - 30%), siendo menores al 10% las formas severas *(Iolascon et al 1998)*. El predominio de formas leves en nuestra serie de casos probablemente sea debido a una pesquisa sistemática efectuada con la implementación del protocolo de investigación.

Los pacientes esplenectomizados previamente al estudio eran en su mayoría adultos (figura I-7). El presente protocolo de estudio permitió diagnosticar niños menores de 1 año de vida que no poseían diagnóstico previo (figura I-8) (ver capítulo IV: diagnóstico con sangre capilar).

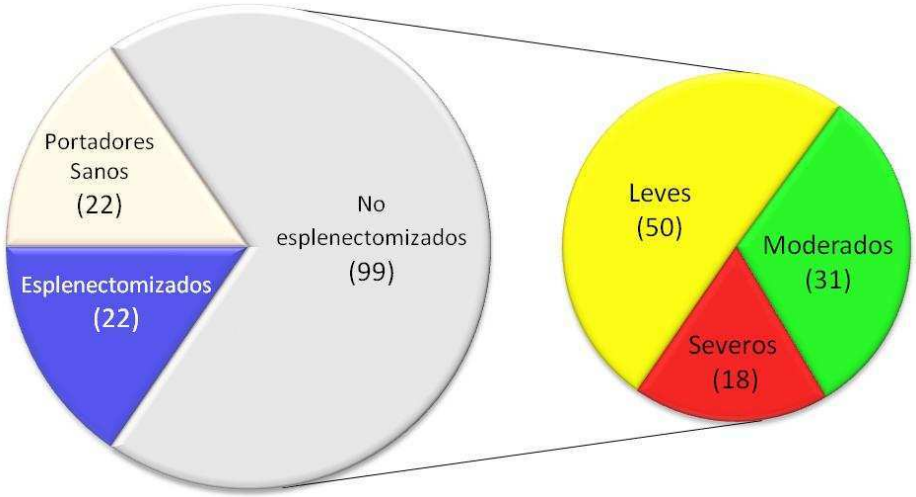


Figura I-6: Distribución de los pacientes en los cuales se arribó al diagnóstico de ESH categorizados de acuerdo al grado de severidad al momento de realizar las pruebas diagnósticas.

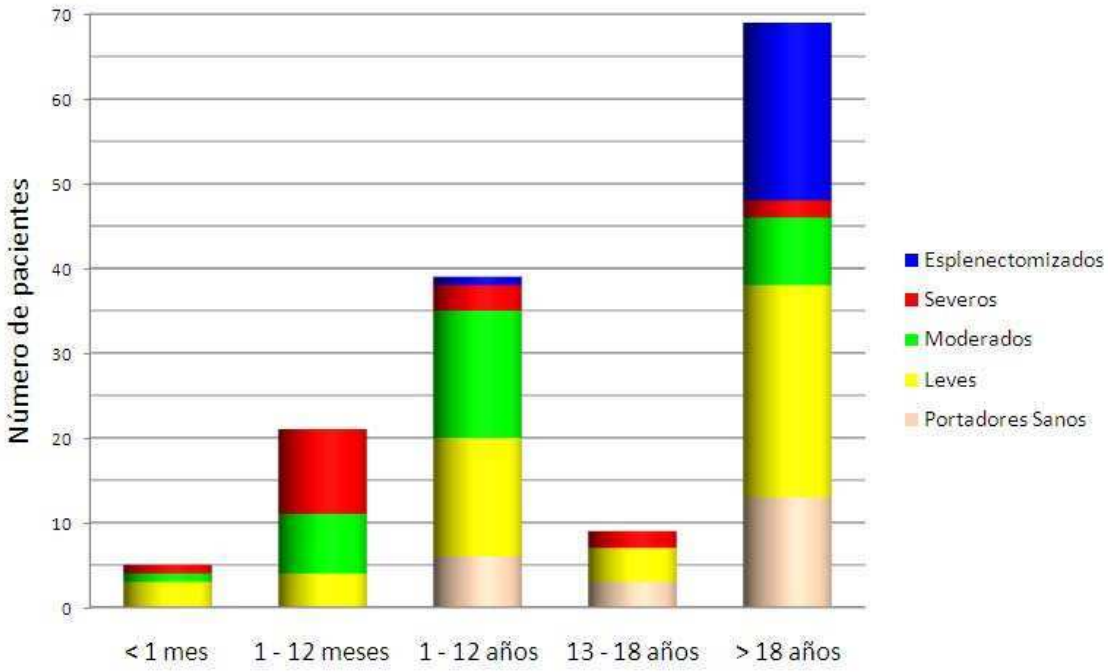


Figura I-7: Distribución de los pacientes en los cuales se arribó al diagnóstico de ESH según grupo etario y grado de severidad al momento de realizar las pruebas diagnósticas.

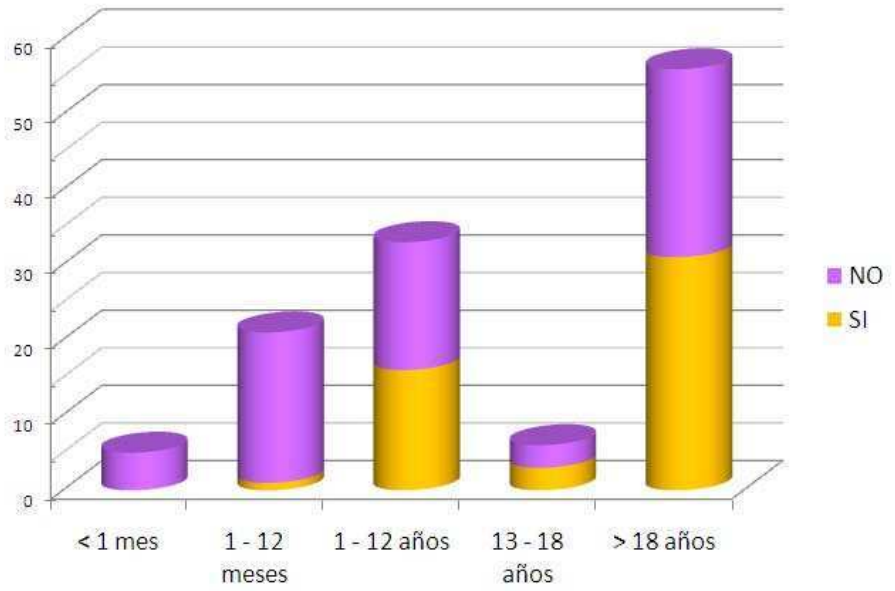


Figura I-8: Distribución de los pacientes en los cuales se arribó al diagnóstico de ESH según grupo etario y existencia de diagnóstico previo.

CAPITULO II: Parámetros y análisis del laboratorio general

En el estudio del síndrome anémico, la determinación de los índices hemátimétricos permite establecer la clasificación morfológica propuesta por Wintrobe que sigue aún plenamente vigente *(Wintrobe 1930, 1931, 1934)*. Con el advenimiento de los analizadores automatizados, no sólo pueden determinarse los índices hematimétricos con mayor exactitud sino que además puede disponerse de las distribuciones con sus correspondientes coeficientes de variación (tabla II-1). En 1983 se propone una modificación a la clasificación de las anemias incorporando la amplitud de distribución del volumen eritrocitario (ADE) *(Bessman et al 1983)*. Posteriormente, varias fórmulas han sido propuestas para discriminar entre anemias de diferentes etiologías y numerosos han sido los trabajos publicados a fin de establecer su equivalencia o superioridad respecto del poder discriminatorio de los tradicionales índices hematimétricos *(Brugnara y Mohandas 2013)*. El objetivo de la estrategia es poder definir los estudios específicos para confirmar la etiología de la anemia y detectar aún los casos asintomáticos. Por ejemplo, aplicado al diagnóstico diferencial de ESH, la determinación del porcentaje de eritrocitos hipercrómicos, definidos como aquéllos que poseen una concentración de hemoglobina corpuscular mayor a 410 g/L, muestra ser de gran utilidad como prueba de tamizaje, incluso en los casos leves *(Pati et al 1989)*. Sin embargo, este índice presenta la limitación de no estar ampliamente disponible ya que se requiere que el hemograma sea efectuado en modernos analizadores. Además, debe tenerse en cuenta que las determinaciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos y HCM son coincidentes entre los diferentes equipos pero no así el VCM y la CHCM *(Buttarello y Plebani 2008)*.

Distribución	**Valor medio Índice hematimétrico**	**Coeficiente de Variación**
Volumen celular	VCM Volumen corpuscular medio	ADE ó RDW Amplitud de distribución eritrocitaria *Red cell distribution width*
Masa de hemoglobina	HCM Hemoglobina corpuscular media	CHDW *Cell haemoglobin distribution width*
Concentración de hemoglobina	CHCM Concentración de hemoglobina corpuscular media	HDW *Haemoglobin distribution width*

Tabla II-1: Distribuciones evaluadas por los analizadores automatizados actuales. Los índices hematimétricos pueden obtenerse por cálculo a partir de las determinaciones de hematocrito, hemoglobina y recuento eritrocitario. Los coeficientes de variación sólo pueden obtenerse a partir de los histogramas correspondientes. Las distribuciones de masa y concentración de hemoglobina son proporcionadas por un número limitado de analizadores capaces de efectuar la determinación en cada célula individual.

Numerosos trabajos intentan establecer pautas a partir del hemograma y los índices para desestimar u orientar el diagnóstico hacia la ESH *(Pati et al 1989, Da Costa et al 2001, Danise et al 2001, Broséus et al 2010)* y además, una vez arribado el diagnóstico, construir índices marcadores de severidad para la ESH *(Rocha et al 2011)*.

En este capítulo se describen los valores hematimétricos de las muestras obtenidas en nuestro hospital, evaluando los resultados de los pacientes clasificados por su severidad. Debido a que los índices no son extrapolables entre diferentes equipos *(Buttarello y Plebani 2008)* se obtienen –con los valores propios– los cocientes predictores de severidad propuestos por Rocha y colaboradores.

Valores hematimétricos

Se realizó el hemograma de las muestras correspondientes a los controles normales y los pacientes utilizando el equipo Wiener Lab Counter 19. Los valores de los índices hematimétricos fueron corroborados con la observación del frotis correspondiente. En la tabla II-2 se detallan los valores obtenidos.

	Controles Normales	ESH		
		No esplenectomizados	Esplenectomizados	Portadores sanos
Hematocrito (%)				
$\bar{x}$ ± DE	42,2 ± 3,5	30,6 ± 7,1	41,9 ± 4,1	40,8 ± 5,8
Mediana	42,1	30,0	41,3	40,9
Hemoglobina (g/dL)				
$\bar{x}$ ± DE	14,2 ± 1,2	11,0 ± 2,6	14,4 ± 1,2	13,5 ± 1,8
Mediana	14,2	10,7	14,3	13,2
Eritrocitos ($x10^{12}$/L)				
$\bar{x}$ ± DE	4,72 ± 0,42	3,85 ± 0,71	4,68 ± 0,41	4,55 ± 0,77
Mediana	4,70	3,86	4,60	4,31
VCM (fL)				
$\bar{x}$ ± DE	89,7 ± 4,8	83,1 ± 7,6	89,1 ± 4,6	90,2 ± 7,1
Mediana	89,3	83,5	87,5	89,7
ADE (%)				
$\bar{x}$ ± DE	13,7 ± 0,8	18,1 ± 3,7	14,0 ± 1,7	13,5 ± 0,8
Mediana	13,6	17,9	13,8	13,5
HCM (pg)				
$\bar{x}$ ± DE	30,0 ± 1,9	28,5 ± 2,9	30,7 ± 1,4	29,9 ± 2,9
Mediana	30,1	28,9	30,7	29,9
CHCM (g/dL)				
$\bar{x}$ ± DE	33,5 ± 1,1	34,4 ± 1,7	34,6 ± 1,5	33,1 ± 1,4
Mediana	33,6	34,4	34,8	32,9

Tabla II-2. Hemograma: valores correspondientes a la serie roja de los controles normales y los pacientes.

Los pacientes presentan una marcada anemia, con un VCM menor acompañado de una marcada anisocitosis evidenciada por una elevada ADE, presentando todos los parámetros diferencias significativas respecto de los valores obtenidos para los controles normales ($P < 0,0001$). En los pacientes esplenectomizados se evidencia la normalización del hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos, VCM y ADE (CN vs esplenectomizados, $P > 0,05$), permaneciendo elevada la CHCM ($P < 0,0001$). Los valores hematimétricos obtenidos en los portadores sanos no difieren significativamente de los determinados para los controles normales ($P > 0,05$).

Valores hematimétricos y su relación con la severidad

En la tabla II-3 se visualizan los valores eritrocitarios para los pacientes no esplenectomizados al momento del estudio, clasificados por severidad. La severidad al momento del diagnóstico se estableció en función de la concentración de hemoglobina de acuerdo a los criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al 2008)*. Por este motivo se observa una clara diferencia en los valores de hematocrito, hemoglobina y recuento de eritrocitos entre los diferentes grupos. Sin embargo, los valores de los índices hematimétricos y el ADE no logran diferenciar a todos los subgrupos entre sí (tablas II-3, figura II-1) de manera que no puede estimarse la severidad en función de ellos.

	ESH no esplenectomizados		
	Leves	**Moderados**	**Severos**
Hematocrito (%)			
$\bar{x}$ ± DE	35,6 ± 5,0	27,1 ± 1,8	21,2 ± 3,6
Mediana	35,0	27,0	22,1
Hemoglobina (g/dL)			
$\bar{x}$ ± DE	12,6 ± 1,7	9,3 ± 0,7	7,2 ± 1,4
Mediana	12,2	9,4	7,7
Eritrocitos ($x10^{12}$/L)			
$\bar{x}$ ± DE	4,23 ± 0,56	3,49 ± 0,41	2,85 ± 0,29
Mediana	4,08	3,41	2,77
VCM (fL)			
$\bar{x}$ ± DE	86,0 ± 6,4	79,0 ± 7,7	79,1 ± 7,1
Mediana	86,0	79,3	80,9
ADE (%)			
$\bar{x}$ ± DE	17,1 ± 3,5	19,6 ± 3,1	20,0 ± 4,7
Mediana	15,9	19,2	18,1
HCM (pg)			
$\bar{x}$ ± DE	29,8 ± 2,2	27,0 ± 2,9	26,4 ± 3,0
Mediana	29,4	27,3	26,0
CHCM (g/dL)			
$\bar{x}$ ± DE	34,8 ± 1,6	34,2 ± 1,6	33,4 ± 2,4
Mediana	34,5	34,3	32,7

Variable	Leve	Moderada	Severa	P valor K-W
Hematocrito	C	B	A	< 0,0001
Hemoglobina	C	B	A	< 0,0001
Rto GRojos	C	B	A	< 0,0001
VCM	B	A	A	0,0006
ADE	A	B	AB	0,0069
HCM	B	A	A	0,0001
CHCM	A	A	A	0,1709

Tabla II-3. Arriba: valores hematimétricos presentados por los pacientes no esplenectomizados, clasificados por su severidad al momento del estudio. Abajo: análisis mediante la prueba de Kruskal Wallis. Los índices hematimétricos no permiten diferenciar completamente los tres grupos de severidad clínica. Grupos con letra en común no son significativamente diferentes.

Observación de los frotis

Todos los pacientes a los cuales se les asignó el diagnóstico de ESH presentaron esferocitos en el frotis. El número promedio de esferocitos por campo con aumento 100x fue mayor en los pacientes esplenectomizados (10,7; rango 2-50). Las ESH leves presentaron el valor promedio más bajo (6,9; rango 1-22), mientras que en las moderadas (9,6; rango 1-40) y severas (8,6; rango 1-30) se hallaron valores intermedios. La ausencia de secuestro esplénico justifica el mayor número de esferocitos circulantes en los pacientes esplenectomizados. Frecuentemente se visualizaron esferocitos espiculados. La presencia de eritrocitos con forma de hongo se constató en el 10 a 15% de los frotis –incluso en los PS– pero en ninguno de los pacientes esplenectomizados. La poiquilocitosis fue poco frecuente ya que se observó en menos del 5% de los frotis. La presencia de dianocitos sólo se constató en casos en los que existía otra patología asociada.

La visualización de policromasia fue una constante en todos los subgrupos excepto en los pacientes esplenectomizados, en los que la observación fue poco frecuente. Este hecho es esperable por la normalización de los valores de hemoglobina con la subsecuente reducción en la producción reticulocitaria. Se observó hipocromía en el 10 - 15% de ESH moderadas y severas y en los PS que presentaron anemia carencial.

En el 20% de los frotis se halló punteado basófilo –independientemente de la severidad– y sólo en el 9% de los pacientes esplenectomizados.

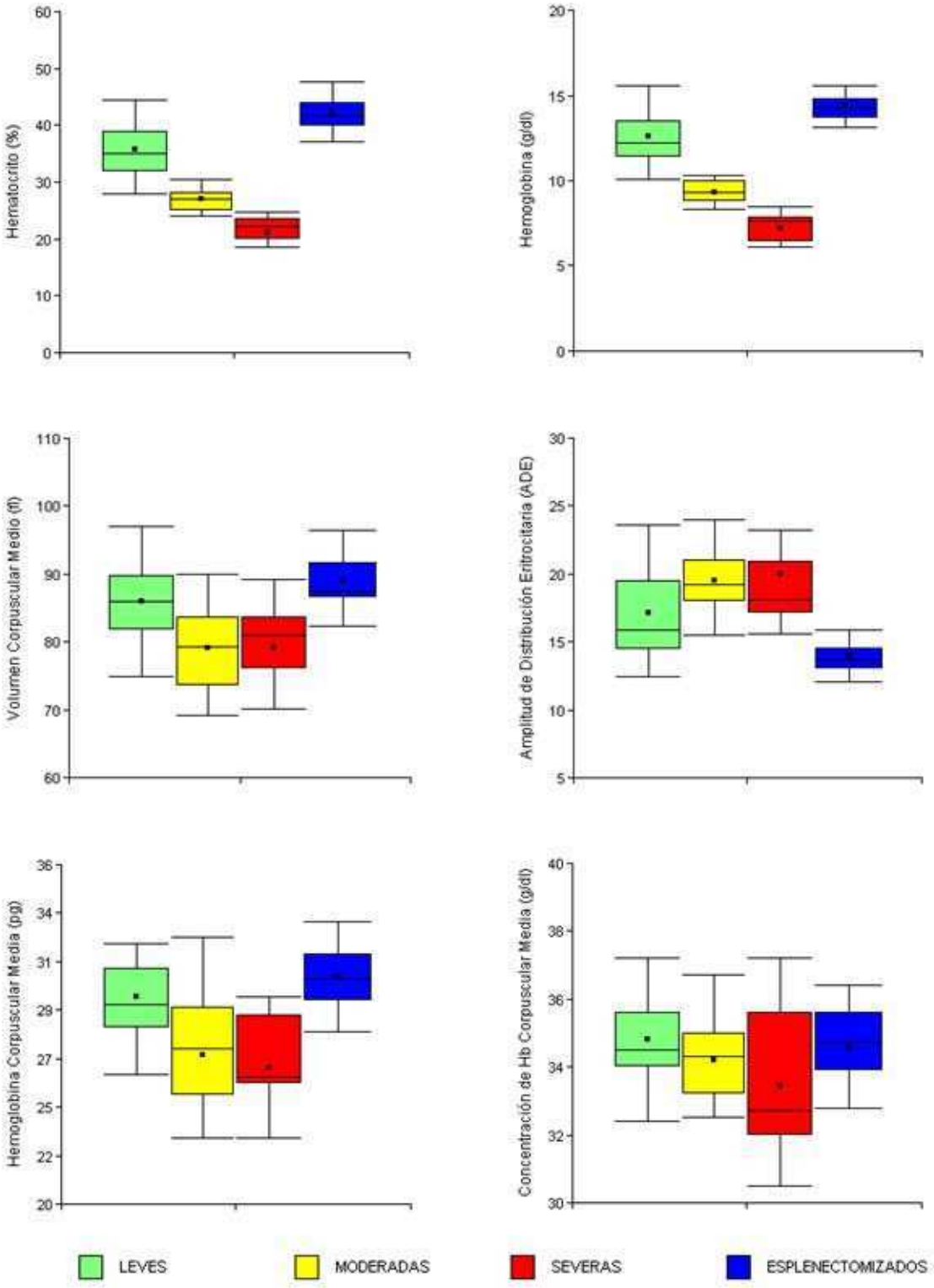


Figura II-1. Box-plots que muestran la distribución de los valores hematimétricos presentados por los pacientes al momento del estudio. El grado de severidad en los pacientes no esplenectomizados es asignado en función del nivel de hemoglobina al momento del estudio de acuerdo a los criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al 2008)*.

Indices marcadores de severidad

Recientemente, Rocha y colaboradores han propuesto la construcción de índices para predecir la severidad en la ESH *(Rocha et al 2011)*. En el cálculo utilizan parámetros cuyos resultados pueden no coincidir entre los diferentes equipos y por lo tanto los valores de corte no deben ser extrapolados *(Buttarello y Plebani 2008)*. Dado que los hemogramas fueron realizados en un equipo diferente, se calcularon estos índices en la población en estudio (tabla II-4) con el objetivo de verificar la utilidad de los mismos.

	Controles Normales	ESH		
		No esplenectomizados	Esplenectomizados	Portadores sanos
Hb / ADE				
$\bar{x}$ ± DE	1,04 ± 0,11	0,64 ± 0,23	1,04 ± 0,14	1,00 ± 0,13
Mediana	1,04	0,56	1,06	1,00
Hb / CHCM				
$\bar{x}$ ± DE	0,42 ± 0,03	0,32 ± 0,07	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,06
Mediana	0,42	0,31	0,41	0,41
CHCM / ADE				
$\bar{x}$ ± DE	2,46 ± 0,17	1,97 ± 0,41	2,49 ± 0,26	2,46 ± 0,20
Mediana	2,48	1,92	2,55	2,47

Indice	CN	ESH	Esplenect	PS	P valor K-W
Hb / ADE	A	B	A	A	< 0,0001
Hb / CHCM	A	B	A	A	< 0,0001
CHCM /ADE	A	B	A	A	< 0,0001

Tabla II-4: Indices propuestos por Rocha y colaboradores. Arriba: valores obtenidos en la población del presente estudio. Abajo: analisis de los resultados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Grupos con letra en común no son significativamente diferentes.

En primer lugar se analizó si los índices propuestos por Rocha y colaboradores permitían distinguir en los individuos estudiados a los pacientes con ESH. En este análisis, fueron analizados por separado los individuos portadores sanos y los pacientes esplenectomizados ya que en ambos casos los parámetros hematimétricos no son significativamente diferentes a los presentados por los controles normales (ver valores hematimétricos, tabla II-2 del presente capítulo). En la figura II-2 puede observarse que los índices arrojan valores más bajos para los pacientes con diagnóstico de ESH no esplenectomizados permitiendo diferenciar este subgrupo. Los valores obtenidos para los

pacientes esplenectomizados y portadores sanos no difieren significativamente de los obtenidos para los controles normales (tabla II-4)

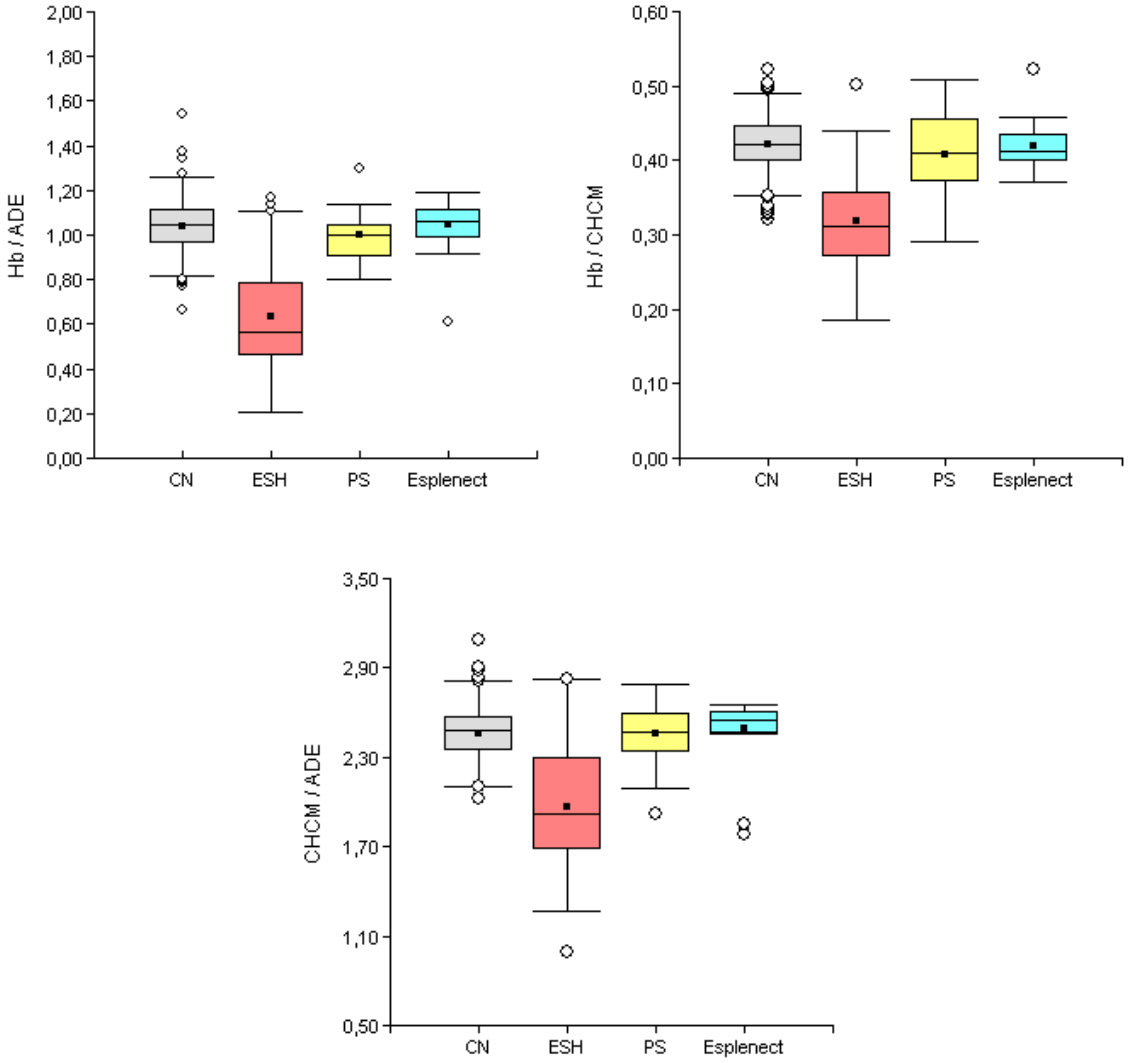


Figura II-2: Box-plot de los Indices propuestos por Rocha y colaboradores. Para la población en estudio. CN, controles normales; ESH, pacientes no esplenectomizados, PS, portadores sanos; Esplenect, pacientes esplenectomizados.

Habiendo establecido que los índices propuestos por Rocha y colaboradores son significativamente diferentes para los pacientes no esplenectomizados, se decidió evaluar estos índices en los pacientes clasificados por su severidad al momento del estudio (tabla II-5). El análisis estadístico muestra que los pacientes con anemia leve presentan índices significativamente superiores a los de mayor severidad. Los índices no son diferentes en pacientes clasificados como moderados o severos (tabla II-5).

	ESH no esplenectomizados		
	Leves	**Moderados**	**Severos**
Hb / ADE			
$\bar{x}$ ± DE	0,77 ± 0,22	0,49 ± 0,08	0,39 ± 0,09
Mediana	0,75	0,48	0,40
Hb / CHCM			
$\bar{x}$ ± DE	0,36 ± 0,05	0,27 ± 0,02	0,22 ± 0,02
Mediana	0,35	0,27	0,23
CHCM / ADE			
$\bar{x}$ ± DE	2,11 ± 0,41	1,80 ± 0,34	1,74 ± 0,35
Mediana	2,15	1,75	1,72

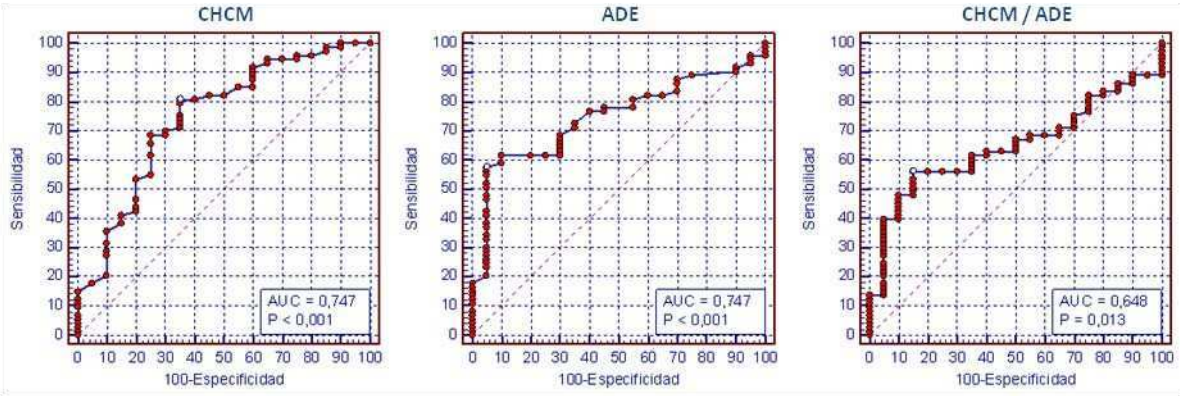
Indice	LEVES	MODERADOS	SEVEROS	P valor K-W
Hb / ADE	B	A	A	< 0,0001
Hb / CHCM	B	A	A	< 0,0001
CHCM /ADE	B	A	A	0,0038

Tabla II-5: Indices propuestos por Rocha y colaboradores y su relación con la severidad. Arriba: valores obtenidos en la población de pacientes no esplenectomizados en estudio clasificados por su severidad de acuerdo con Mariani y colaboradores. Abajo: análisis de los resultados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Grupos con letra en común no son significativamente diferentes.

El mayor dilema a resolver consiste en poder diferenciar la ESH de otras anemias hemolíticas. Si los índices pudieran colaborar en esta clasificación podría establecerse una secuencia adecuada para proceder a los estudios confirmatorios del diagnóstico. Con este objetivo fueron evaluados los pacientes estudiados con diagnóstico presuntivo de ESH en los cuales se arribó a un diagnóstico diferente (ver figura I-4: distribución de diagnósticos realizados en pacientes y familiares). El análisis estadístico permite establecer que de los tres índices construidos por Rocha y colaboradores, sólo el índice CHCM/ADE presenta diferencias significativas entre los subgrupos de pacientes anémicos (tabla II-6). Sin embargo, los parámetros individuales CHCM y ADE presentan mayor poder discriminatorio que el índice compuesto (tabla II-7). Los demás índices hematimétricos (VCM y HCM) no muestran diferencias significativas entre pacientes con ESH y los pacientes con anemia hemolítica no esferocítica ($P > 0,05$).

	Anemias Hemolíticas no esferocíticas	Anemias ESH no esplenectomizadas	P valor Prueba de Wilcoxon
Hb / ADE			
$\bar{x} \pm$ DE	0,70 ± 0,18	0,64 ± 0,23	0,1621
Mediana	0,68	0,56	
Hb / CHCM			
$\bar{x} \pm$ DE	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,07	0,7294
Mediana	0,32	0,31	
CHCM / ADE			
$\bar{x} \pm$ DE	2,16 ± 0,27	1,97 ± 0,41	0,0444
Mediana	2,16	1,92	

Tabla II-6: Indices propuestos por Rocha y colaboradores analizados para las anemias hemolíticas esferocíticas y no esferocíticas.



Curva ROC	Area	DE	Criterio para ESH	Especificidad	Sensibilidad
CHCM	0,7466	0,0656	> 33	80,8	64,2
ADE	0,7469	0,0543	> 17	95,0	57,5
CHCM /ADE	0,6476	0,0592	≤ 1,956	85,0	56,2

Tabla II-7: Utilidad de los parámetros individuales –CHCM y ADE– y el índice compuesto CHCM/ADE para discriminar la ESH de las anemias hemolíticas no esferocíticas (AH-no esf). Arriba: curvas ROC obtenidas con los parámetros determinados en pacientes ESH (n=73) y pacientes con AH-no esf (n=20). Abajo: tabla de los parámetros que caracterizan a las curvas ROC.

Discusión

Dos de los índices hematimétricos (VCM y HCM) y la ADE han permitido discriminar los pacientes anémicos con diagnóstico de ESH de los individuos sin anemia (controles normales, los portadores sanos y los pacientes esplenectomizados, tabla II-2), aunque no permiten diferenciar las anemias hemolíticas entre sí. Tampoco permiten diferenciar en forma acabada a los pacientes ESH según su grado de severidad (tabla II-3).

Establecer la severidad en los pacientes con ESH permite direccionar el tratamiento, dado que la esplenectomía es mandatoria en los casos más severos *(Bolton-Maggs et al 2004, Bolton-Maggs et al 2012, Grace y Lux 2009, Rapetti et al 2005, Donato et al 2014)*. La severidad de la patología involucra una mayor pérdida de membrana, en consecuencia se incrementa la concentración de hemoglobina corpuscular. La progresiva pérdida de membrana genera esferocitos rígidos susceptibles a un mayor secuestro esplénico que conlleva el descenso pronunciado del hematocrito y la hemoglobinemia. La producción de reticulocitos por la respuesta eritropoyética genera anisocitosis incrementando el ADE, en forma más pronunciada en los casos más severos. De esta forma, los índices construidos por Rocha y colaboradores entre variables que se modifican en sentido opuesto –la Hb disminuye y la CHCM y ADE se incrementan– podrían ser más sensibles para discriminar los pacientes de acuerdo al grado de severidad. En los pacientes ESH de este estudio, el análisis de los índices muestra una disminución progresiva con la severidad (tabla II-5). Sin embargo, en el grupo de pacientes en estudio no esplenectomizados, los índices sólo permiten discriminar a las ESH leves (tabla II-5) de los casos más severos. Esta conclusión difiere de la obtenida por Rocha y colaboradores quienes encuentran valores de los índices significativamente diferentes para los tres subgrupos *(Rocha et al 2011)*. La discrepancia podría ser atribuída al número de pacientes evaluados, ya que en el estudio de Rocha y colaboradores el número de pacientes moderados y severos involucrados es levemente superior al del presente estudio (moderados: 27 vs 21; severos 6 vs 4). Sin embargo, no puede descartarse la influencia del diferente autoanalizador utilizado en este estudio (Sysmex Wiener Counter 19) en cuanto a su precisión en determinar la CHCM.

Es interesante resaltar que con la esplenectomía se logran normalizar todos los valores e índices hematimétricos a excepción de la CHCM. De manera que, no sólo la pérdida sucesiva de la membrana intervendría en generar un aumento de la CHCM. Recientemente se ha postulado que el gen *TAF3* está asociado a los niveles de CHCM y se lo requiere para la transcripción del gen SPTA1 que codifica la α-Sp *(Pistis et al 2013)*. Los niveles de CHCM genéticamente determinados explicarían la ausencia de normalización de este parámetro al eliminar el bazo.

En función de los datos obtenidos, se puede concluir que los parámetros obtenidos en el hemograma son buenos marcadores de la patología ya que los pacientes no esplenectomizados presentan valores significativamente diferentes de los controles normales. Además, frente a un cuadro de anemia hemolítica, un valor de ADE > 17 y un valor de CHCM > 33 son orientativos de ESH (tabla II-7). La construcción de cocientes a partir de las determinaciones del hemograma es de utilidad limitada. La esplenectomía logra normalizar los valores a excepción del CHCM.

CAPITULO III: Evaluación de la aplicabilidad de las técnicas diagnósticas

Fragilidad Osmótica Eritrocitaria (FOE)

La FOE junto con la autohemólisis son las pruebas diagnósticas más antiguas utilizadas en la ESH. Tradicionalmente se grafica el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NaCl (figura III-1: gráfico convencional). Sin embargo algunos trabajos publicados en la primera mitad del siglo pasado *(Suess et al 1948, Ponder 1948)* utilizan gráficos basados en el incremento de la hemólisis (figura III-1: gráfico no convencional). En función de esto se realizó un estudio retrospectivo de curvas de fragilidad de pacientes y controles normales. Los resultados permitieron observar que se visualizan en forma más eficiente las alteraciones utilizando la gráfica no tradicional *(Crisp et al 2007)*. En la confección de todos los informes realizados durante el presente estudio se utilizaron ambos tipos de gráficos (figura III-1). La iniciativa fue bien recibida por el personal médico a cargo de los pacientes ya que les facilitó la interpretación de los resultados.

Gráfico convencional ***Gráfico no convencional***

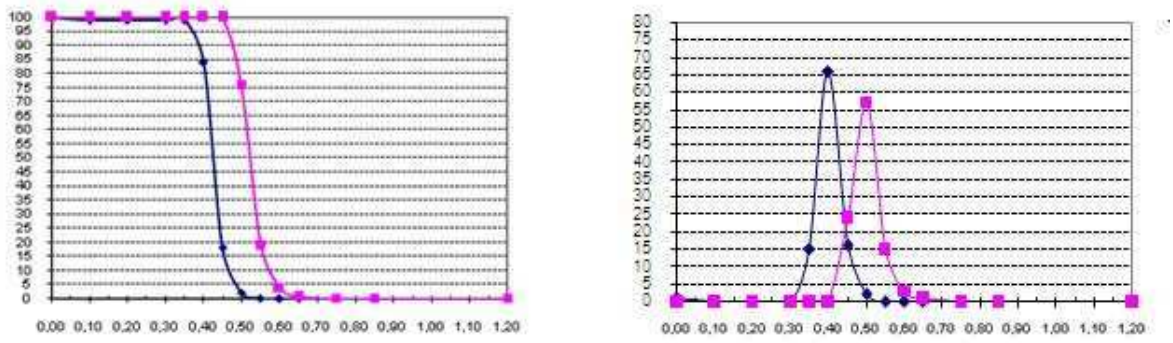


Figura III-1: Diferentes formas de graficar la FOE. Convencional: se grafica el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NaCl. No convencional: se grafica el incremento del porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NaCl.

Criohemólisis Hipertónica (CH)

El mecanismo de la lisis hipertónica en la ESH no ha sido dilucidado pero se postula que el defecto cuali/cuantitativo de las proteínas de membrana sería responsable de la falta de plasticidad del eritrocito ante los cambios bruscos de la temperatura en dicho medio.

Para investigar este mecanismo, se procedió a "visualizar" los cambios morfológicos que experimentan durante la prueba los eritrocitos ESH con respecto a los normales, empleando

microscopía electrónica de barrido y evaluándolos a diferentes tiempos. En la primera fase, durante la incubación en el medio hipertónico a 37 °C, los eritrocitos de los controles normales se deshidratan generando estructuras aplanadas y espiculadas. En los pacientes se observa que las células más grandes no adquieren dicha morfología, sino que se contraen en forma irregular o bien permanecen con forma esférica (figura III-2). Además puede observarse que los esferocitos pequeños presentan bordes irregulares, probablemente por la pérdida de membrana o bien debido a una lisis prematura durante la prueba (figura III-3)

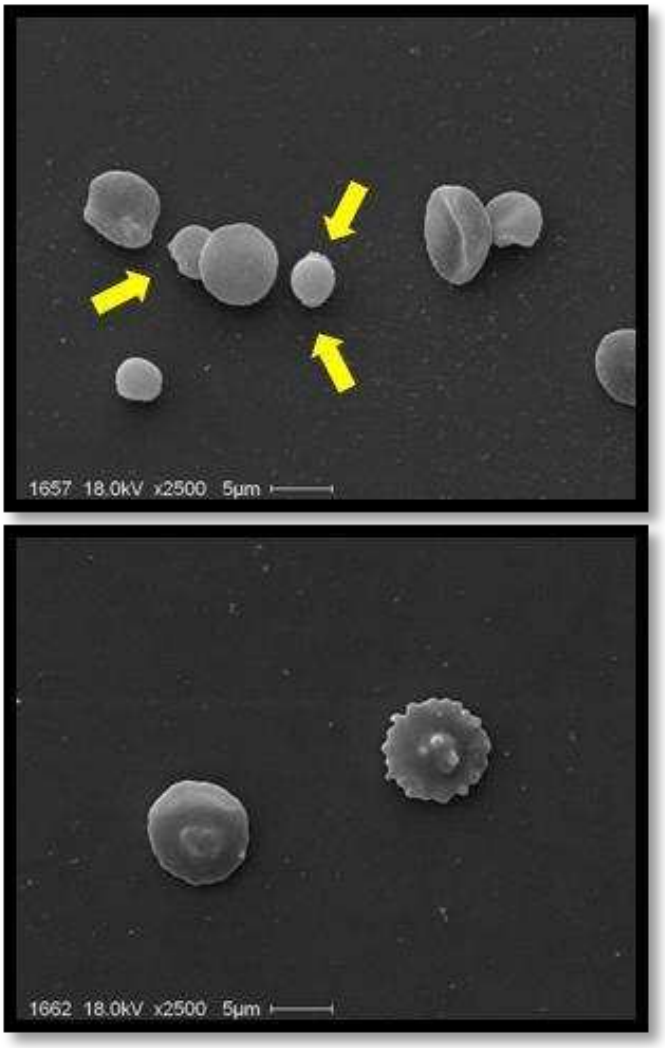


Figura III-2: Microscopía electronica de barrido. Durante la prueba de criohemólisis se tomaron alícuotas de las suspensiones a los 10 min de la incubación en el medio hipertónico a 37 °C. Arriba: eritrocitos de un paciente. Las flechas señalan los bordes irregulares que presentan los esferocitos (ver texto). Abajo: eritrocitos de un control normal.

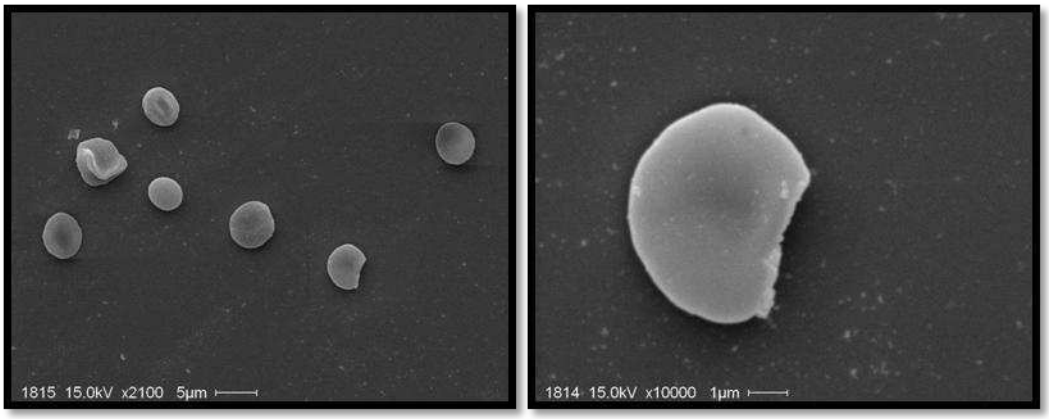


Figura III-3: Microscopía electronica de barrido. Eritrocitos de un paciente a los 10 min de la incubación en el medio hipertónico a 37 °C. A la izquierda: esferocitos con diferentes grados de deformación. A la Derecha: Se observa a mayor aumento el esferocito que ha sufrido la ruptura de su membrana.

Una vez completada la incubación a 37 °C, la suspensión se traspasa a un baño de hielo. En estas condiciones los eritrocitos normales mantienen la morfología adquirida durante la incubación previa, mientras que los esferocitos ahora muestran el hundimiento de algunos sectores de la membrana (figura III-4).

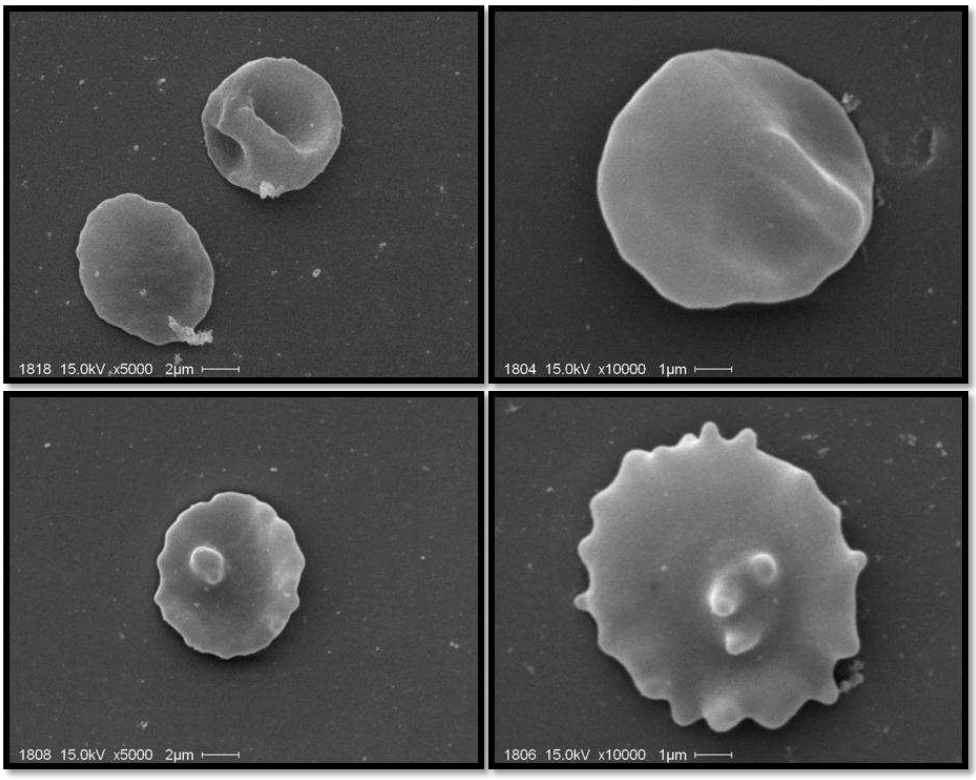


Figura III-4: Microscopía electronica de barrido de los eritrocitos de un paciente y un control normal suspendidos en medio hipertónico a los 5 min del traspaso a 0 °C. En las imágenes superiores se observa la escasa plasticidad del esferocito que contrasta con la alta deformación del eritrocito normal visualizado en las imágenes inferiores.

De acuerdo a las imágenes observadas, podemos concluir que en la prueba de criohemólisis la deshidratación de los eritrocitos normales en el medio hipertónico, lleva al aplanamiento de la célula, con formación de pequeñas y numerosas proyecciones o espículas y que este proceso no se ve afectado por el enfriamiento. Por el contrario, los esferocitos presentarían una mayor resistencia a perder su forma esférica en las primeras etapas de la prueba, pero en la deshidratación con enfriamiento se producen depresiones o aplastamientos que generan una imagen similar a la de una "pelota rígida desinflada". En la figura III-5 se compara la morfología de los eritrocitos en su propio plasma con la obtenida durante la etapa de enfriamiento en la prueba de criohemólisis hipertónica para un paciente y un control normal.

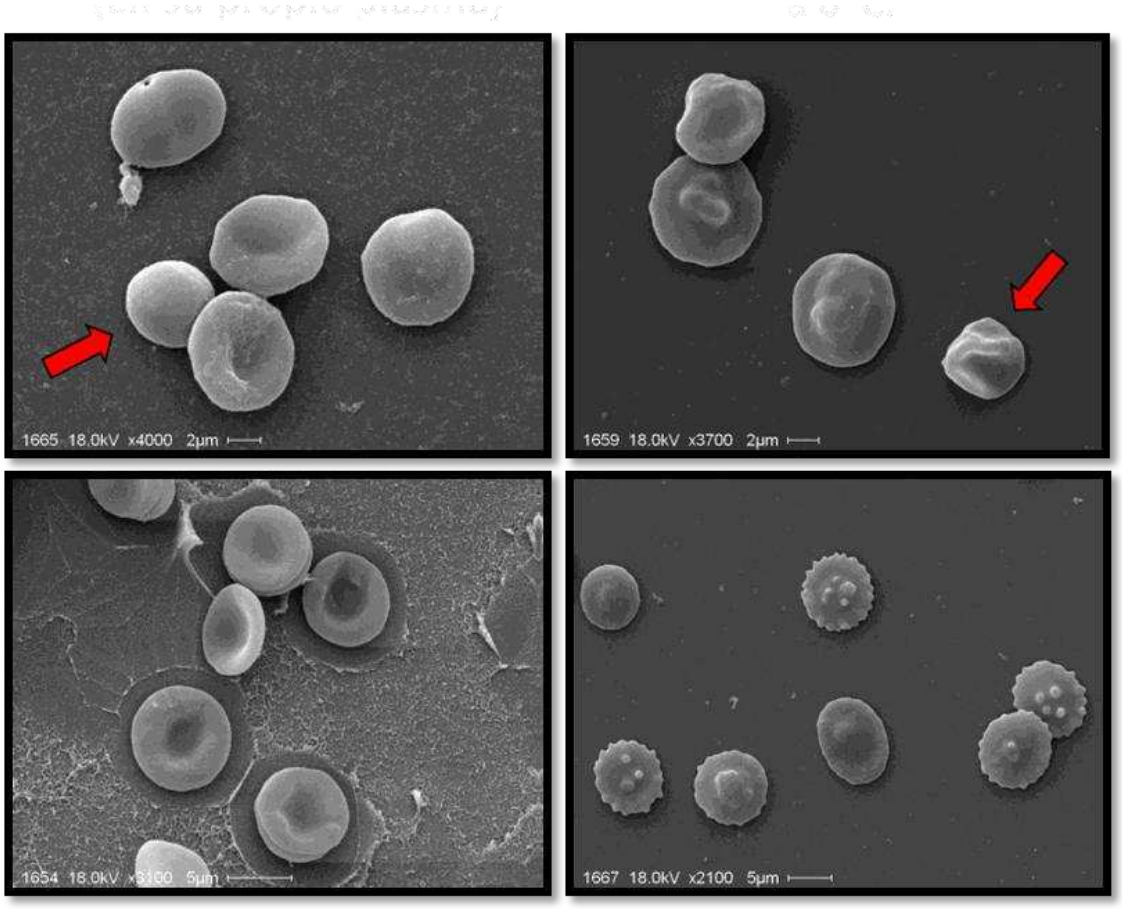


Figura III-5: Microscopía electronica de barrido. Las imágenes de la parte superior corresponden a un paciente con diagnóstico de ESH. Las imágenes inferiores a un control normal procesado simultáneamente. A la izquierda muestras en su propio plasma, a la derecha las muestras incubadas en el medio hipertónico luego de 5 minutos del traspaso a 0 °C. Las flechas señalan al esferocito.

Se ha sugerido que durante el enfriamiento los lípidos de la bicapa sufren una transformación del estado fluido a gel *(Green y Jung 1977)*. Estudios posteriores atribuyen la hemólisis hipertónica en

estas condiciones a la imposibilidad del acomodamiento mecánico de la bicapa por alteración de la estructura proteica de la membrana *(Dubbelman et al 1979)*. La disminución de la relación superficie/volumen no sería determinante de la hemólisis sino la integridad de las proteínas de la membrana. Este concepto se refuerza con la observación de que los esferocitos obtenidos artificialmente por métodos químicos o físicos, si bien son frágiles, muestran niveles normales para la criohemólisis *(Streichman et al 1990)*. El análisis de las imágenes obtenidas por MEB permitió constatar el diferente comportamiento de la membrana de los esferocitos de los pacientes respecto de la de los controles sugiriendo que la prueba podía ser considerada potencialmente específica para el diagnóstico de ESH.

Al realizar la prueba de CH sistemáticamente se observó que los valores obtenidos en individuos normales y pacientes no eran coincidentes con los reportados en la literatura. Debido a esto se analizaron los datos de los primeros 18 pacientes estudiados mediante el empleo de curvas ROC y se validaron con los subsiguientes pacientes y controles incorporados al protocolo. Se logró validar los resultados ya que se obtuvo el mismo valor de corte, sensibilidad y especificidad siendo grupos independientes (tabla III-1).

CRIOHEMOLISIS	*Análisis primer corte*	*Validación*
N° Controles Normales	103	115
N° de Pacientes	18	31
Valor de corte	2,8 %	2,8 %
Sensibilidad	78 %	77 %
Especificidad	96 %	95 %

Tabla III-1: Criohemólisis Hipertónica. El análisis mediante curvas ROC permite establecer el valor de corte en 2,8% dado que fue validado mediante dos series independientes de controles normales y de pacientes.

Cabe mencionar que Streichman y Gescheidt reportaron como rango normal 3 - 15% siendo indicativo de ESH valores > 20% de lisis. Sin embargo Roper y Layton aconsejan determinar los valores de referencia en cada laboratorio ya que encontraron, en su práctica personal, que la mayoría de las muestras normales arrojaban valores inferiores a 3% *(Roper y Layton 2011)*. Esta observación es coincidente con los resultados aquí presentados.

Estandarización del análisis de proteínas de membrana

El análisis de las proteínas de la membrana del eritrocito constituye una prueba irrefutable para el diagnóstico de ESH ya que permite determinar cuál es la proteína deficiente. Sin embargo existe una gran variabilidad en los métodos para la preparación y evaluación de la SDS-PAGE *(Iolascon y Avvisati 2008)*. De manera que debieron determinarse las condiciones óptimas para realizar los desarrollos electroforéticos y establecer la metodología para la cuantificación.

Las variables analizadas en diferentes desarrollos electróforéticos fueron: concentración del gel separador, masa de proteína a ser sembrada por calle, intensidad de corriente para el desarrollo electroforético, reproducibilidad en la obtención de membranas y reproducibilidad intra e interensayo para la cuantificación de las bandas.

Se utilizaron diferentes geles con T % (concentración de acrilamida + bisacrilamida) de 10%, 8% y 7% para el gel separador manteniendo una concentración de 4% para el gel concentrador. El T % óptimo fue establecido en 8% ya que una concentración menor de monómeros no mostró mayor resolución para las bandas de interés y generaba un gel de difícil manejo y una concentración mayor no permitía la resolución de las bandas de espectrina.

Para establecer la masa proteica a analizar se sembró un gel con diferentes masas en cada calle (15 a 40 μg de proteína por calle). Cantidades entre 15 y 20 μg mostraron ser óptimas para la visualización y análisis de las bandas.

Las condiciones eléctricas fueron descriptas en Materiales y Métodos. Pequeñas variaciones de estas condiciones no alteran los resultados pero no debe superarse el voltaje máximo de 250 V.

La reproducibilidad intra-ensayo se estableció sembrando diferentes calles con una misma muestra y cuantificando las proteínas de interés. Se observa que el coeficiente de variación es igual o inferior a 6% para todas las bandas de interés (tabla III-2).

Gel 1	Calle1	Calle2	Calle3	Calle4	Calle5
Banda	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
α-Sp	24,93	25,38	25,05	25,43	24,77
β-Sp	22,03	21,53	21,17	21,82	21,06
Ank	7,89	7,98	7,78	8,94	7,97
B 3	30,70	31,19	31,84	30,61	32,93
4.1	8,54	7,67	7,94	7,44	7,37
4.2	5,92	6,26	6,23	5,76	5,91
Suma	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

	Prom	DE	CV(%)
α-Sp	25,11	0,29	1,1
β-Sp	21,52	0,41	1,9
Ank	8,11	0,47	5,8
B 3	31,45	0,96	3,0
4.1	7,79	0,47	6,1
4.2	6,02	0,22	3,6

Gel 2	Calle1	Calle2	Calle3	Calle4	Calle5	Calle6
Banda	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
α-Sp	28,19	28,41	27,68	26,92	26,58	25,74
β-Sp	22,21	21,93	22,38	22,71	22,03	21,60
Ank	8,25	8,25	8,52	8,95	8,78	8,95
B 3	26,93	27,64	27,72	27,56	28,22	29,07
4.1	7,90	7,55	7,75	7,69	7,67	8,46
4.2	6,52	6,23	5,95	6,18	6,72	6,18
Suma	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

	Prom	DE	CV(%)
α-Sp	27,25	1,03	3,8
β-Sp	22,14	0,38	1,7
Ank	8,62	0,32	3,8
B 3	27,86	0,72	2,6
4.1	7,84	0,33	4,2
4.2	6,30	0,28	4,4

Gel 3	Calle1	Calle2	Calle3	Calle4
Banda	(%)	(%)	(%)	(%)
α-Sp	23,03	23,01	23,19	23,00
β-Sp	18,86	19,34	19,27	19,04
Ank	6,81	6,99	7,03	7,03
B 3	32,18	32,33	31,78	32,07
4.1	9,59	9,00	9,63	9,29
4.2	9,53	9,32	9,09	9,56
Suma	100,0	100,0	100,0	100,0

	Prom	DE	CV(%)
α-Sp	23,06	0,09	0,4
β-Sp	19,13	0,22	1,1
Ank	6,97	0,11	1,5
B 3	32,09	0,23	0,7
4.1	9,38	0,29	3,1
4.2	9,38	0,22	2,3

Tabla III-2: Reproducibilidad intra-ensayo. Se estableció sembrando diferentes calles en un mismo gel con una misma muestra y cuantificando las proteínas de interés. Se observa que el coeficiente de variación es igual o inferior al 6% para todas las bandas de interés.

En la evaluación de la reproducibilidad de los geles analizados en diferentes ensayos se observa que la variabilidad inter-ensayo se ve incrementada superando en todos los casos el 5% y alcanzando en algunos casos valores muy elevados (tabla III-3).

	Valor Promedio (%)		
Banda	GEL 1	GEL 2	GEL 3
α-Sp	25,11	27,25	23,06
β-Sp	21,52	22,14	19,13
Ank	8,11	8,62	6,97
B 3	31,45	27,86	32,09
4.1	7,79	7,84	9,38
4.2	6,02	6,30	9,38

	Prom	DE	CV
α-Sp	25,14	1,71	6,81
β-Sp	20,93	1,30	6,21
Ank	7,90	0,69	8,73
B 3	30,47	1,86	6,12
4.1	8,33	0,74	8,84
4.2	7,23	1,52	21,05

Tabla III-3: Reproducibilidad inter-ensayo. Se muestra el valor promedio de las cuantificación de las fracciones proteicas obtenidas en diferentes geles para una misma muestra. La variabilidad supera en todos los casos el 5%, alcanzando en algunos casos valores muy elevados.

En base a estos resultados se decide que la cuantificación de las proteínas de membrana debe realizarse en un mismo gel, comparando los resultados obtenidos para el individuo en estudio con los obtenidos para diferentes controles normales (atentos a la variabilidad individual) según lo expuesto precedentemente en la descripción de la técnica (ver Materiales y Métodos).

Estandarización de la citometría de flujo con 5'eosina maleimida

La prueba diagnóstica se basa en la unión del reactivo fluorescente a proteínas de la membrana eritrocitaria (figura III-6). Debido a que es de reciente utilización, no hay uniformidad en el tratamiento de los resultados. Varios autores *(Stoya et al 2006, Won 2010, Golafshan et al 2014)* utilizan la intensidad de la fluorescencia media (IFM) en valores absolutos mientras que otros *(Girodon et al 2008, Bianchi et al 2012)* evalúan la disminución de la intensidad de la fluorescencia en comparación al promedio obtenido para 6 controles normales obtenidos y procesados simultáneamente con la muestra del paciente. Esta última modalidad propuesta por King y colaboradores *(2000)* ha sido adoptada en este trabajo.

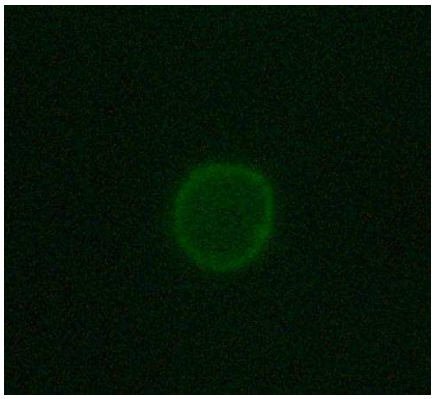


Figura III-6: Tinción con 5'eosina maleimida visualizada por microscopía de fluorescencia. El reactivo se une principalmente al residuo Lys430 de la proteína Banda 3 y a las proteínas RhAG, Rh y CD47 de la membrana eritrocitaria.

La intensidad de fluorescencia emitida por los eritrocitos se modifica con la cantidad de reactivo utilizada, el tiempo de incubación y el almacenamiento de la muestra. Debido a esto, se establecieron los valores de referencia para las condiciones metodológicas adoptadas (ver Materiales y Métodos). Se analizaron los datos de los primeros 48 pacientes estudiados mediante el empleo de curvas ROC obteniendo un valor de corte > 17% (disminución de la intensidad de fluorescencia media) comprendido dentro del rango informado en la literatura internacional (16 - 21%) (tabla III-4).

5'EMA-CF	*Análisis por curva ROC*
N° Controles Normales	201
N° de Pacientes	48
Valor de corte	17 %
Sensibilidad	69,8 %
Especificidad	96,5 %

Tabla III-4: Citometría de flujo con 5'eosina maleimida. Punto de corte obtenido por análisis mediante curva ROC.

Estandarización del análisis de fragilidad osmótica por citometría de flujo

A mediados del año 2009 Won y colaboradores publicaron esta nueva técnica diagnóstica que permite evaluar la fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo. Inmediatamente de conocida, se reprodujo la técnica y se evaluó si podía mejorarse utilizando los reactivos tradicionales para el estudio de fragilidad –solución Parpart– *(Parpart et al 1947)* en lugar de solución fisiológica. La diferencia entre ambas soluciones radica en que en la primera el NaCl se encuentra disuelto en un sistema *buffer* proporcionando un medio más estable. La fragilidad de los eritrocitos se incrementa marcadamente con la disminución del pH. El cambio de 0,1 unidades de pH es equivalente a alterar 0,1 g/L la concentración de la solución salina *(Roper y Layton 2011)*.

Considerando que en individuos normales la hemólisis inicial ocurre a una concentración de NaCl 0,46 ± 0,02%; la hemólisis total: 0,32 ± 0,02% y la fragilidad corpuscular media (FCM) se encuentra comprendida en el rango 0,400 – 0,445%, se procedió a realizar curvas de concentración de NaCl para encontrar la relación óptima para realizar la determinación por citometria de flujo.

Se empleó solución fisiológica estéril (Baxter) y solución Parpart 0,85% recientemente preparada. Luego de la adquisición inicial, utilizando sangre de un control normal, se agregaron diferentes volúmenes de agua a fin de variar la concentración final de NaCl en la cual se determina el porcentaje de células remanentes de acuerdo a la técnica descripta anteriormente (tabla III-5). De los resultados se desprende una mayor sensibilidad a la lisis utilizando solución fisiológica. El medio amortiguado de la solución Parpart protegería a los eritrocitos disminuyendo las diferencias en el porcentaje de células remanentes (figura III-7).

TUBO	Sl salina (mL)	Agua (mL)	[NaCl] final (g/dL)	Sl Fisiol % cél Res	Sl Parpart % cél Res
1	2,2	2,0	0,445	9,9	87,4
2	2,2	1,8	0,468	69,7	95,4
3	2,2	1,6	0,492	84,4	98,1
4	2,2	1,3	0,534	97,4	84,2
5	2,2	1,0	0,584	97,4	86,9

Tabla III-5: FOE-CF. Evaluación del porcentaje de células residuales para distintas concentraciones finales de NaCl obtenidas por dilución de solución fisiológica y solución Parpart utilizando sangre de un control normal.

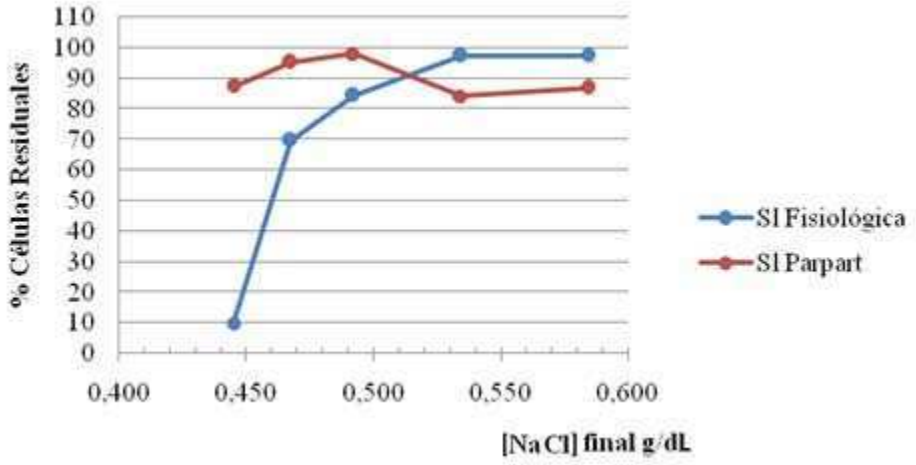


Figura III-7: FOE-CF. Evaluación del porcentaje de células residuales para distintas concentraciones finales de NaCl obtenidas por dilución de solución fisiológica y solución Parpart. En el medio amortiguado de la solución Parpart permanence un mayor porcentaje de eritrocitos viables.

Repitiendo el ensayo, utilizando muestras de un control normal y un paciente con diagnóstico de ESH se obtuvieron resultados similares (tabla III-6, figuras III-8 y III-9). Se concluye que el procedimiento más sensible corresponde al detallado en la técnica original utilizando solución fisiológica y una concentración final de 0,468% de NaCl ya que logra proporcionar máxima diferencia en el porcentaje de células residuales del control normal y el paciente.

Tubo	% NaCl	Sl Fisiol: % cél Res		Sl Parpart: % cél Res	
		C.normal	Pte ESH	C.normal	Pte ESH
1	0,445	12,1	21,9	91,1	27,8
2	0,468	69,2	18,8	100,0	39,1
3	0,492	82,1	34,9	97,4	56,6
4	0,534	89,2	64,5	87,4	65,9
5	0,584	94,4	87,4	86,2	88,1

Tabla III-6: FOE-CF. Evaluación del porcentaje de células residuales para distintas concentraciones finales de NaCl obtenidas por dilución de solución fisiológica y solución Parpart utilizando sangre de un control normal y un paciente con diagnóstico de ESH.

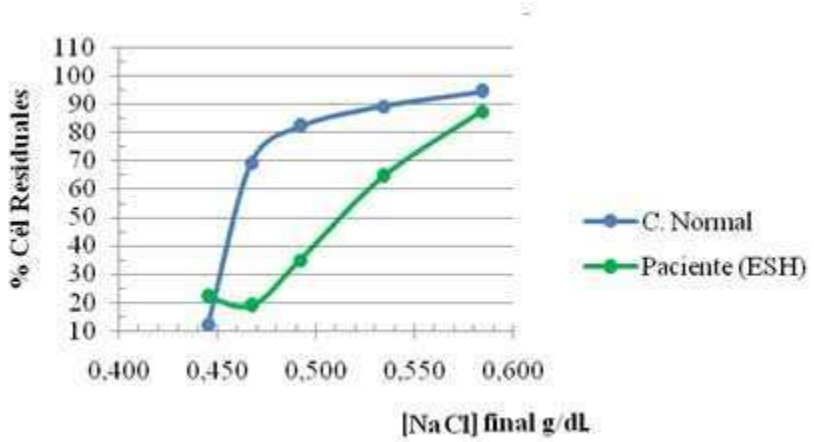


Figura III-8: FOE-CF. Evaluación del porcentaje de células residuales para distintas concentraciones finales de NaCl obtenidas por dilución de solución fisiológica. A una concentración final de NaCl de 0,468% se obtiene la máxima diferencia en el porcentaje de células residuales para el control normal y el paciente.

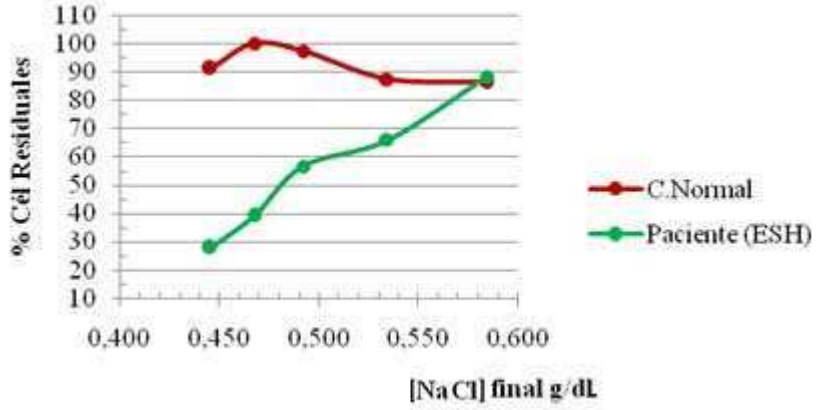


Figura III-9: FOE-CF. Evaluación del porcentaje de células residuales para distintas concentraciones finales de NaCl obtenidas por dilución de solución Parpart. En el medio amortiguado de la solución Parpart permanence un mayor porcentaje de eritrocitos viables, siendo más pronunciado el efecto en el control normal.

Con el propósito de establecer una interpretación de esta prueba con el método tradicional de evaluar la fragilidad osmótica eritrocitaria, se elaboró un ensayo envejeciendo artificialmente sangre y mezclándola en diferentes proporciones para obtener poblaciones eritroides en un rango de fragilidad osmótica. La mitad de la muestra se conservó a 0 °C de manera de preservar a los eritrocitos. La otra mitad se incubó a 37 °C en baño de agua durante 24 h. Este proceso ocasiona el envejecimiento de la población eritroide lo que incluye la pérdida parcial de la membrana eritrocitaria aumentando su fragilidad osmótica. Luego se obtuvieron suspensiones por mezcla de

ambas muestras en proporción 1:3; 1:1 y 3:1, evaluándose la fragilidad de las suspensiones puras y sus mezclas.

En la evaluación de la fragilidad osmótica por el método tradicional se observa el incremento de la población frágil a medida que la muestra posee mayor proporción de la sangre envejecida. La gráfica convencional –basada en el porcentaje de hemólisis– evidencia un perfil cada vez más irregular, mientras que la visualización de la mayor proporción de eritrocitos frágiles se favorece con la representación del incremento de hemólisis (tabla III-7 y figura III-10).

	% de Hemólisis				
% NaCl	37C-48hs	75% 37C	50% 37C	25% 37C	0C-48hs
1,20	0	0	0	0	0
0,85	3	7	5	4	1
0,75	12	21	17	10	1
0,65	41	55	36	20	2
0,60	59	64	42	24	3
0,55	72	72	48	27	5
0,50	78	77	51	31	8
0,45	84	79	53	41	24
0,40	90	82	89	85	66
0,35	93	91	99	98	91
0,30	97	100	99	99	99
0,20	100	100	99	99	99
0,10	100	100	100	100	100
0	100	100	100	100	100

	% de Incremento de Hemólisis				
% NaCl	37-48hs	75% 37C	50% 37C	25% 37C	0C-48hs
1,20	0	0	0	1	0
0,85	3	7	5	4	1
0,75	9	14	12	6	0
0,65	29	34	19	10	1
0,60	18	9	6	4	1
0,55	13	8	6	3	2
0,50	6	5	3	4	3
0,45	6	2	2	10	16
0,40	6	3	36	44	42
0,35	3	9	10	13	25
0,30	4	9	0	1	8
0,20	3	0	0	0	0
0,10	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0

Tabla III-7: Curvas FOE de muestras preparadas por mezclas de sangre conservadas a 0 y 37 °C en diferentes proporciones. La muestra conservada a 0 °C mimetiza eritrocitos normales y frescos. La muestra conservada a 37 °C contiene eritrocitos envejecidos artificialmente que mimetizan a los esferocitos.

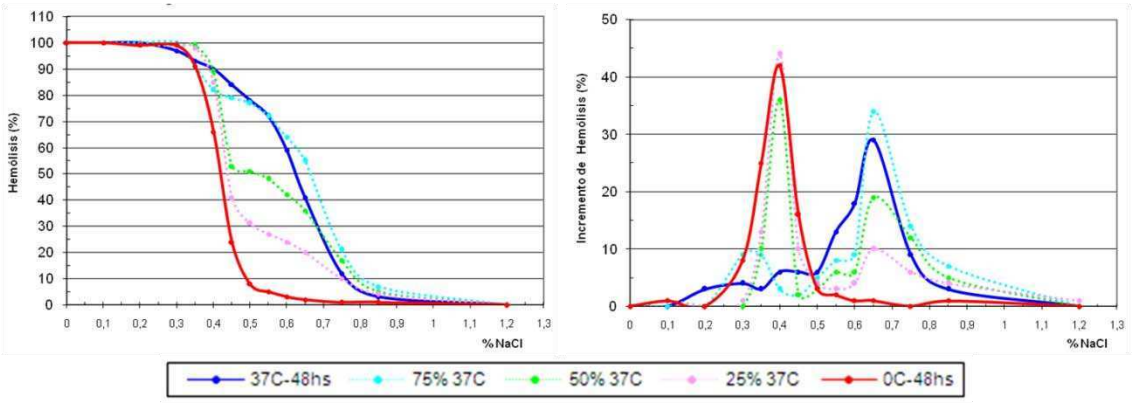


Figura III-10: Gráficos correspondientes a las curvas FOE. La muestra conservada a 0 °C mimetiza eritrocitos normales y frescos. La muestra conservada a 37 °C contiene eritrocitos envejecidos artificialmente que mimetizan a los esferocitos. Se observa el incremento de la población frágil a medida que la muestra posee mayor proporción de la sangre envejecida. La visualización se favorece con la representación del incremento de hemólisis.

Las mismas suspensiones celulares fueron analizadas simultáneamente mediante la técnica de fragilidad osmótica por citometría de flujo. El porcentaje de células residuales remanentes fue disminuyendo a medida que las suspensiones incrementaban la proporción de la población envejecida (figura III-11).

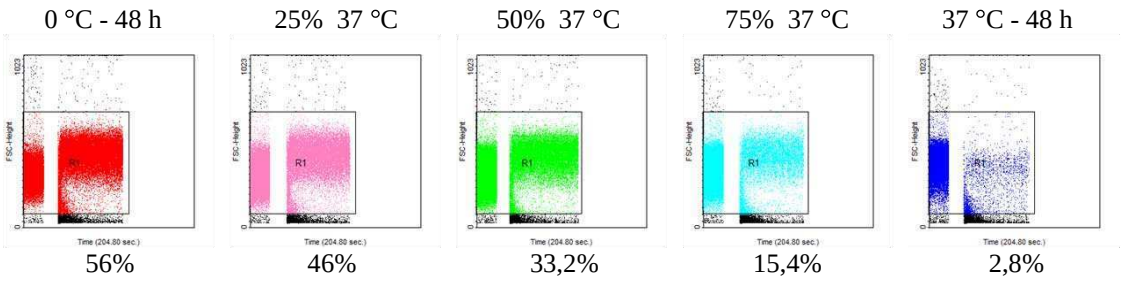
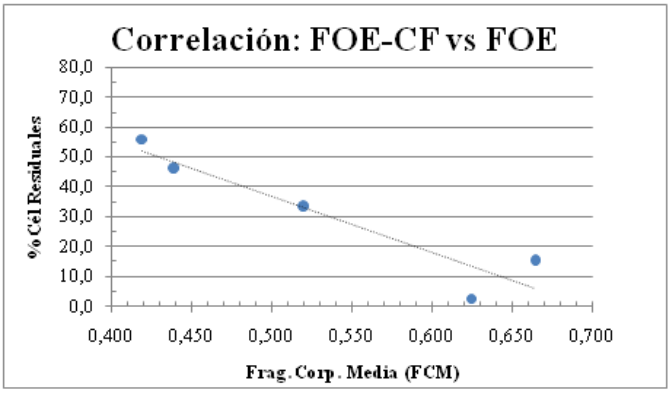


Figura III-11: Gráficos correspondientes a la determinación de FOE-CF de las muestras preparadas por mezcla de sangre conservada a 0 y 37 °C en diferentes proporciones. La muestra conservada a 0 °C mimetiza eritrocitos normales y frescos. La muestra conservada a 37 °C contiene eritrocitos envejecidos artificialmente que mimetizan a los esferocitos. Se representan los dot-plot FSC vs tiempo y el porcentaje de células residuales obtenido mediante el análisis de los resultados.

Después de analizar las mismas muestras mediante las dos técnicas, se realizó el análisis de correlación para los parámetros representativos de ambas técnicas: la fragilidad corpuscular media (FCM) para la técnica tradicional y el porcentaje de células residuales para la técnica basada en citometría de flujo. El valor de FCM aumenta a medida que la población es más frágil ya que representa la concentración de una solución de NaCl a la cual se produciría la hemólisis del 50% de la población eritroide. Este parámetro correlacionó en forma significativa con el porcentaje de células residuales evaluadas con la nueva metodología (coeficiente Rho de Spearman = -0,900; P = 0,037) (figura III-12).



Muestra	FOE FCM	FOE-CF % Cél Res
100% 0°C-48hs	0,419	56,0
25% 37°C + 75% 0°C	0,439	46,0
50% 37°C + 50% 0°C	0,520	33,2
75% 37°C + 25% 0°C	0,664	15,4
100% 37°C -48hs	0,624	2,8

Coeficiente Rho de Spearman = - 0,900

P = 0,037 (bilateral)

Figura III-12: Análisis de correlación para la fragilidad osmótica eritrocitaria evaluada mediante las curvas de fragilidad tradicional y la determinación mediante citometría de flujo. Las muestras fueron preparadas por mezcla de sangre conservada a 0 y 37 °C en diferentes proporciones. La muestra conservada a 0 °C mimetiza eritrocitos normales y frescos. La muestra conservada a 37 °C contiene eritrocitos envejecidos artificialmente que mimetizan a los esferocitos.

De acuerdo a los resultados expuestos puede inferirse que la determinación de FOE-CF permite una buena aproximación de la fragilidad osmótica eritrocitaria evaluada por la técnica convencional, siendo de suma importancia para el trabajo en recién nacidos en los cuales es imprescindible realizar el diagnóstico utilizando un mínimo de muestra.

Conclusión

Los ensayos descriptos en el presente capítulo permitieron un conocimiento más profundo de las técnicas habitualmente utilizadas y de las más recientes.

Así pudo establecerse la utilidad de graficar las curvas FOE mediante el incremento del porcentaje de hemólisis que permite una clara visualización de las poblaciones frágiles (figuras III-1 y III-10).

Se pudo visualizar, mediante microscopía electrónica, la falta de plasticidad de los esferocitos sumergidos en el medio hipertónico, fundamento de la prueba diagnóstica de criohemólisis hipertónica (figuras III-2 a III-5).

El análisis de las proteínas de membrana mediante SDS-PAGE, si bien es una técnica utilizada desde hace varias décadas, no es realizada en forma estandarizada. Los estudios realizados para evaluar la variabilidad intra e inter-ensayo (tablas III-2 y III-3) permitieron establecer las condiciones óptimas bajo las cuales serían establecidas las deficiencias proteicas.

Siendo la citometría de flujo con 5'EMA una técnica más reciente, tampoco se disponía de un manejo uniforme de los resultados. Se optó –afortunadamente– por el que hoy en día se ha impuesto internacionalmente. La conservación del reactivo fluorescente fue un aspecto crítico que requirió realizar la propia experiencia.

Los puntos de corte fueron establecidos mediante el análisis de curvas ROC para las pruebas de criohemólisis hipertónica y citometría de flujo con 5'EMA.

Respecto a la prueba diagnóstica más reciente –FOE-CF– el desafío consistió en intentar mejorarla introduciendo modificaciones en la concentración final de la solución hipotónica o en su composición. Pudo comprobarse que el diseño con la que fue presentada por sus autores era óptimo. Luego, mediante muestras generadas artificialmente se evaluó su relación con las curvas de fragilidad tradicional concluyendo que podría ser de utilidad cuando éstas no pudieran realizarse. La evaluación utilizando muestras reales y la determinación del punto de corte para el diagnóstico de ESH se realizó en una etapa posterior en la que esta prueba cobró fundamental importancia para el diagnóstico utilizando sangre capilar (ver capítulo IV).

CAPITULO IV: Diagnóstico con sangre capilar

La expresión clínica de la ESH es heterogénea, abarcando desde formas severas dependientes de transfusiones a formas silentes con una adecuada compensación de la hemólisis crónica. Algunos pacientes, incluso aquéllos que son clasificados como formas leves o moderadas de la enfermedad, pueden presentar un fenotipo severo al nacimiento. Debido a esto es conveniente poder diagnosticar este subtipo de anemia en neonatos.

El recién nacido y el lactante presentan una problemática especial. En ellos puede ser difícil, y aún imposible, tomar muestras con la cantidad de sangre necesaria para realizar las pruebas confirmatorias habituales, ya sea por las dificultades prácticas inherentes a la toma de la muestra o por la inconveniencia de extraer grandes volúmenes de sangre en niños pequeños. Además, si presentan hemólisis severa que requiera transfusiones o exsanguineotransfusiones, la realización de las pruebas confirmatorias debe ser postergada por 2 - 3 meses. En consecuencia, el diagnóstico etiológico de la anemia hemolítica puede retardarse semanas o meses. De hecho, sólo a un tercio de los niños afectados por esta patología se les realiza el diagnóstico durante el primer año de vida *(Iolascon et al 1997)*. Además no están bien definidos los criterios diagnósticos de ESH al nacimiento *(Delhommeau et al 2000)*.

Es importante destacar que muchos neonatos que requieren transfusiones en el primer año de vida, luego desarrollan una forma compensada de hemólisis crónica independizándose de las transfusiones *(Delhommeau et al 2000)*. Establecer el diagnóstico a temprana edad permitiría contemplar esta evolución natural.

Considerando que la obtención de muestras de sangre capilar es un procedimiento sencillo, y ante la ausencia de publicaciones previas al respecto, decidimos investigar su utilidad para realizar las pruebas de laboratorio confirmatorias de ESH en neonatos e infantes.

Las pruebas diagnósticas tradicionales –Autohemólisis y Fragilidad Osmótica Eritrocitaria– requieren un gran volumen de sangre que sólo puede obtenerse por punción venosa.

Las nuevas pruebas diagnósticas –citometría de flujo con 5'EMA, criohemólisis y FOE-CF– utilizan un volumen pequeño de sangre que puede obtenerse por punción capilar. Sin embargo, la pequeña muestra es aspirada de un tubo de hemograma obtenido por punción venosa.

Previamente al desarrollo del protocolo de diagnóstico para neonatos, se decidió evaluar los siguientes aspectos:

1. Investigar la existencia de diferencias entre las mediciones efectuadas en sangre venosa anticoagulada con EDTA y en sangre capilar heparinizada en la prueba 5'EMA-CF y CH.
2. Establecer la utilidad de la FOE-CF en el diagnóstico de ESH dado que la prueba era de muy reciente descripción. Determinar la correlación entre la nueva prueba diagnóstica y la tradicional curva de fragilidad osmótica.
3. Aplicar el desarrollo de las pruebas con sangre capilar al diagnóstico en infantes.

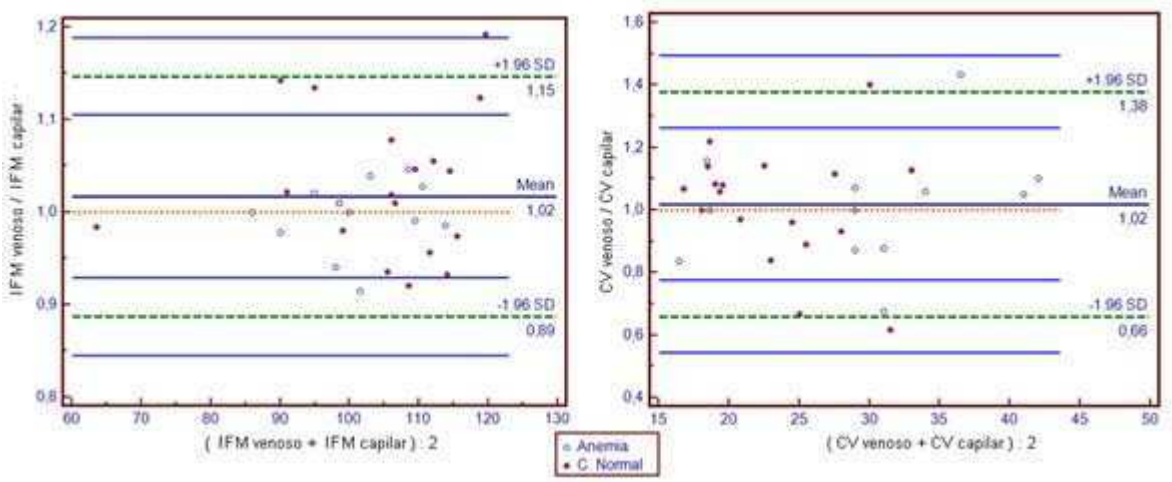
Para analizar si el anticoagulante y el tipo de muestra tenían efecto en los resultados de la prueba 5'EMA-CF, se evaluaron 31 pares de muestras (19 controles normales y 12 pacientes con anemia de distintas etiologías), extraídas por punción venosa (tubo con EDTA) y capilar (microhematocrito heparinizado), que se obtuvieron y procesaron simultáneamente. Los parámetros hematimétricos se presentan en la tabla IV-1. El análisis de los resultados utilizando la prueba t para datos apareados y el método gráfico de Bland Altman permitió establecer que no había diferencias significativas en los parámetros obtenidos utilizando sangre venosa o capilar (tabla IV-2, figura IV-1). Por lo tanto se concluye que la técnica puede realizarse indistintamente con ambos tipos de muestras.

	C. Normales (N=19)	Anemias (N=12)
Sexo	12 F ; 7 M	7 F ; 5 M
Rto Grojos x 10^{12} / L	4,39 ± 0,43	4,16 ± 0,93
Hb (g/dL)	13,3 ± 1,3	10,5 ± 1,8
Hto (%)	39,8 ± 3,2	32,5 ± 4,7
VCM (%)	91,1 ± 5,5	80,0 ± 11,3
HCM (pg)	30,4 ± 1,9	25,9 ± 4,3
CHCM (g/dL)	33,4 ± 1,0	32,1 ± 1,4
ADE (%)	14,0 ± 2,0	16,7 ± 3,0

Tabla IV-1: Parámetros hematimétricos obtenidos en las muestras venosas utilizadas para el estudio de equivalencia entre muestras venosas y capilares en la prueba 5'EMA-CF.

Muestra	IFM (media ± DE)			CV (media ± DE)		
	Total	Normales	Anemias	Total	Normales	Anemias
Venosa	104,0 ± 12,5	105,9 ± 14,2	101,0 ± 9,0	26,2 ± 7,9	23,9 ± 5,7	29,8 ± 9,7
Capilar	102,4 ± 11,6	103,1 ± 13,4	101,4 ± 8,3	26,1 ± 7,4	23,9 ± 6,2	29,6 ± 8,1
P valor	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla IV-2: Resultados obtenidos para la determinación de 5'EMA-CF en muestras venosas y capilares. No se encuentran diferencias significativas en la totalidad de las determinaciones ni en el análisis por subgrupos (controles normales y pacientes anémicos) IFM: intensidad de fluorescencia media. CV: coeficiente de variación de la intensidad de fluorescencia para 20.000 eventos. NS: no significativo (P > 0,05)



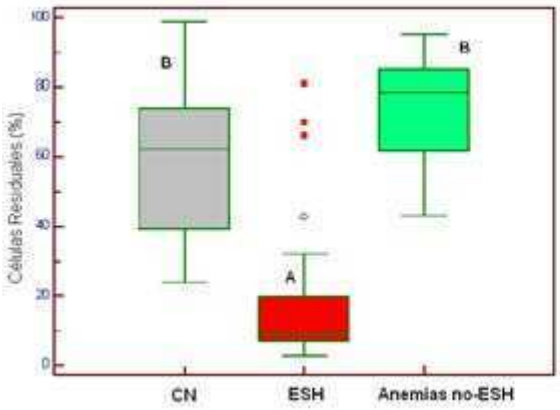
	IFM ven / IFM cap	CV ven / CV cap
Media	1,0167	1,0185
Desvío Estándar	0,06619	0,1831
IC 95% para la media	0,9924 – 1,0410	0,9513 – 1,0857
Hipótesis	1	1
Diferencia	0,0167	0,0185
Tamaño de la muestra	31	31
Estadístico t	1,405	0,563
Nivel de significación	0,1704	0,5779

Figura IV-1: Grafico y análisis de Bland y Altman para la determinación de 5'EMA-CF en muestras venosas y capilares. No se encuentran diferencias significativas para las determinaciones realizadas con sangre venosa o capilar. IFM: intensidad de fluorescencia media. CV: coeficiente de variación de la intensidad de fluorescencia para 20.000 eventos.

En 22 donantes se determinó la criohemólisis utilizando sangre capilar. Se obtuvo un valor promedio de 1,48 ± 0,34%, comprendido dentro del valor de referencia establecido utilizando sangre venosa. Se infiere que el cambio de muestra y del anticoagulante no modifica los valores de referencia establecidos anteriormente.

La prueba diagnóstica FOE-CF fue descripta por Won y Suh en 2009. Debido a que no se disponía de datos de otro grupo de investigadores que la hubiera adoptado, se decidió comprobar la utilidad de este ensayo para discriminar las ESH. Se evaluaron 75 muestras venosas u obtenidas por punción capilar de 38 controles normales y 37 pacientes con anemia (25 ESH, 12 no ESH). Se compararon los grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La determinación de la FOE se efectuó en forma tradicional y por CF en 36 muestras. Se analizó la correlación entre la FOE tradicional y la FOE-CF. Se estableció la sensibilidad y especificidad de la nueva prueba mediante curva ROC.

Se logró establecer la utilidad de esta nueva prueba diagnóstica ya que los pacientes con ESH mostraron un porcentaje significativamente menor de eritrocitos residuales que los controles normales y las anemias no-ESH (figura IV-2). La FOE tradicional evaluada mediante la fragilidad corpuscular media y el porcentaje de células residuales por FOE-CF mostraron una buena correlación (coeficiente Rho de Spearman -0,6861, P < 0,0001, figura IV-3). Por último, el análisis de curva ROC (AUC = 0,912) arrojó una sensibilidad del 80,0% y una especificidad del 100% para un valor de corte de 22,8% de células residuales (figura IV-4).



Grupo	% de Eritrocitos residuales (FOE-CT)				
	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Media ± DE
Normales	38	62,2	23,9	99,0	60,2 ± 21,3
ESH	25	9,2	2,8	81,0	18,8 ± 22,2
Anemias no-ESH	12	78,5	43,0	95,1	74,1 ± 15,3

Figura IV-2: Porcentaje de eritrocitos residuales evaluados por citometría de flujo de acuerdo a la técnica descripta por Won y Suh. Los resultados son analizados entre los subgrupos CN (controles normales), ESH (esferocitosis hereditaria) y Anemias no-ESH (anemias de diversas etiologías excluyendo la ESH). La prueba de Kruskal Wallis arroja resultados muy significativos (P < 0,0001). Grupos con letra en común no son significativamente diferentes.

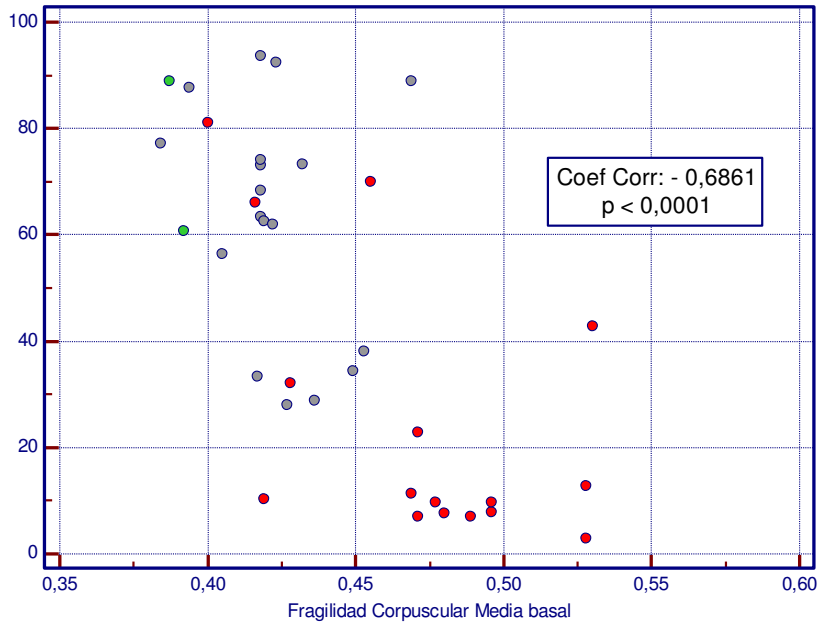


Figura IV-3: Análisis de la correlación entre el porcentaje de eritrocitos residuales evaluados por citometría de flujo de acuerdo a la técnica descripta por Won y Suh y la fragilidad corpuscular media de la curva basal FOE. Se observa una buena correlación, siendo muy significativa.

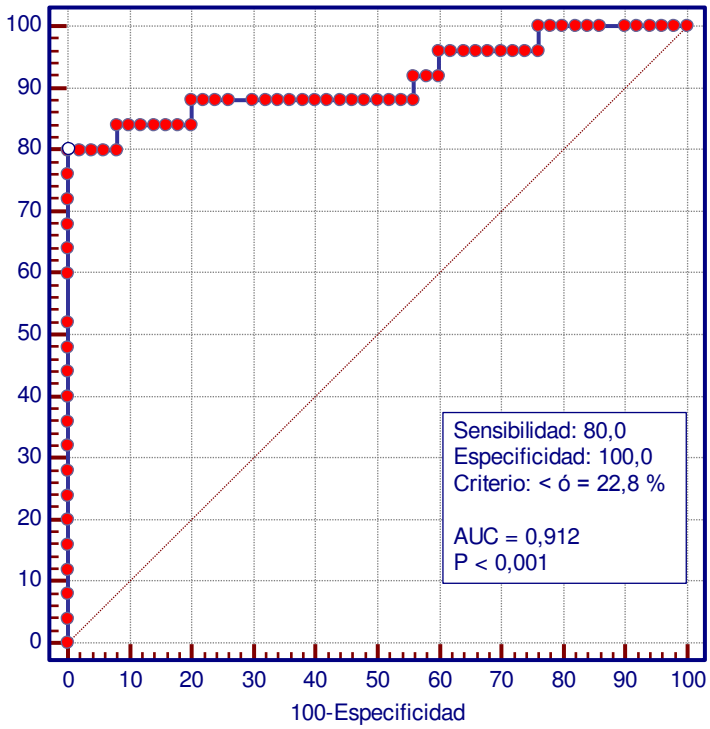


Figura IV-4: Análisis mediante curva ROC del porcentaje de eritrocitos residuales evaluados por citometría de flujo de acuerdo a la técnica descripta por Won y Suh.

Por lo tanto, habiendo establecido que podía utilizarse sangre capilar con igual eficacia que la sangre venosa y comprobando la adecuada sensibilidad y especificidad de la FOE-CF, se disponía ahora de tres eficientes pruebas diagnósticas susceptibles a ser realizadas con un mínimo volumen de sangre.

Protocolo para el diagnóstico precoz de ESH

Los criterios de inclusión para el protocolo de estudio fueron: a) presentar signos y síntomas de anemia hemolítica; o, b) tener un familiar directo (progenitor o hermano) con diagnóstico previo de ESH. Se definió anemia hemolítica como nivel de hemoglobina por debajo del límite inferior normal para la edad, asociado a recuento reticulocitario y nivel de bilirrubina por encima de los límites superiores normales para la edad. Las muestras de sangre se recolectaron por punción digital o de talón en tubos de microhematocrito heparinizados. Se tomaron 6 tubos por paciente para realizar todas las pruebas (300 µL). Se realizaron las siguientes pruebas: criohemólisis hipertónica (CH), citometría de flujo con 5'eosina maleimida (5'EMA-CF) y fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo (FOE-CF). Los valores de corte de referencia para el diagnóstico de ESH utilizados fueron los siguientes: CH > 2,8%; 5'EMA-CF: disminución de intensidad de fluorescencia media > 17%; y FOE-CF < 22,8% de células rojas residuales. Los extendidos de sangre periférica fueron examinados independientemente por dos expertos. Todas las pruebas fueron realizadas dentro de las 24 horas de obtenida la muestra. Los criterios utilizados para confirmar el diagnóstico de ESH fueron: a) visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica; y, b) resultado positivo en por lo menos dos de las pruebas de laboratorio.

Resultados

Se estudiaron 40 niños, de 2 días a 7 años de edad (mediana: 5 meses); 9 de ellos eran menores de 1 mes de vida (tabla IV-3). El 80% de los pacientes presentaban signos y síntomas de anemia hemolítica, los restantes fueron estudiados por poseer un familiar directo (progenitores o hermanos) con diagnóstico de ESH (figura IV-5). Se diagnosticó ESH en 24 casos: 23 poseían signos y síntomas de anemia hemolítica y 1 paciente sólo presentaba antecedentes familiares positivos (figura IV-6). La CH y la 5'EMA-CF se realizaron en todos los niños, y la FOE-CF en 36 de ellos. La CH fue positiva en 23 (96%) y la 5'EMA-CF en 22 (92%) pacientes con ESH, mientras que la FOE-CF fue positiva en 19 de 22 niños (86%) con ESH en quienes se realizó la prueba (figura IV-7). El único resultado falso positivo se observó en la CH de un neonato con enfermedad hemolítica

del recién nacido secundaria a incompatibilidad ABO. La mayoría de los pacientes con ESH tuvo resultados positivos para todas las pruebas realizadas. Sólo 6 de ellos presentaron resultado normal en una de las pruebas: 2 para 5'EMA-CF, 1 para CH y 3 para FOE-CF.

EDAD	MOTIVO DE ESTUDIO	5´EMA-CF % disminución	CH (%)	FOE-CF (% células residuales)	N° DE PRUEBAS POSITIVAS	DIAGNOSTICO DEFINITIVO
9 m	AHneo	9	*4,78*	*7,9*	2/3	ESH
4 m	AHneo + AF	*29*	*15,48*	NR	2/2	ESH
22 m	AHneo	*20*	*4,55*	*9,2*	3/3	ESH
21 m	AHneo + AF	*39*	*10,37*	*4,0*	3/3	ESH
1 m	AHneo	*19*	*8,45*	NR	2/2	ESH
3 m	AH	*29*	*11,25*	*7,5*	3/3	ESH
20 m	AH + AF	*49*	*9,38*	*4,2*	3/3	ESH
10 m	AHneo + AF	*48*	*21,35*	*5,4*	3/3	ESH
4 a	AH	0	2,28	62,9	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
1 m	AHneo	16	1,90	99,0	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
3 m	AH + AF	*47*	*18,50*	*5,8*	3/3	ESH
14 d	AHneo	0	2,80	67,8	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
3 a	AH + AF	*24*	1,96	*15,7*	2/3	ESH
2 m	AH + AF	*25*	*5,11*	*9,8*	3/3	ESH
4 m	AHneo	5	0,83	NR	0/2	Anemia hemolítica no esferocítica
18 m	AF	11	0,71	NR	0/2	Normal
1 m	AHneo	16	1,10	84,2	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
15 d	AHneo	1	*3,47*	43,0	1/3	Incompatibilidad ABO
6 a	AH	*38*	*17,36*	*7,1*	3/3	ESH
3 m	AF	15	0,89	32,8	0/3	Normal
6 m	AHneo	11	1,25	87,8	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
6 m	AHneo	11	1,61	94,9	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
2 d	AHneo	*25*	*4,15*	*20,3*	3/3	ESH
12 m	AF	*32*	*5,32*	*3,6*	3/3	ESH
3 m	AHneo	*28*	*4,31*	*8,6*	3/3	ESH
7 a	AH	*31*	*14,77*	*21,3*	3/3	ESH
3 a	AF	5	1,17	100,0	0/3	Normal
2 a	AH	*34*	*8,42*	*13,0*	3/3	ESH
2 a	AH	*37*	*5,16*	*18,7*	3/3	ESH
2 m	AHneo	*25*	*3,67*	56,9	2/3	ESH
4 a	AH	3	*18,52*	*21,3*	2/3	ESH
4 m	AHneo	1	1,28	95,7	0/3	Incompatibilidad ABO
8 m	AF	11	1,35	99,9	0/3	Normal
50 d	AF	7	2,00	80,5	0/3	Normal
8 d	AHneo	*34*	*10,26*	45,0	2/3	ESH
42 d	AHneo + AF	*23*	*3,28*	*22,7*	3/3	ESH
1 m	AHneo + AF	*38*	*4,17*	*17,6*	3/3	ESH
3 a	AF	7	1,38	100,0	0/3	Normal
21 d	AHneo + AF	*36*	*5,88*	71,2	2/3	ESH
23 m	AF	13	1,12	81,9	0/3	Normal

Tabla IV-3: Datos de los pacientes estudiados con sangre capilar. Los resultados positivos se indican en itálica.
Abreviaturas: AH, anemia hemolítica; AHneo, anemia hemolítica neonatal; AF, antecedentes familiares; 5´EMA-CF, citometría de flujo con 5'eosina maleimida; CH, criohemólisis hipertónica; FOE-CF, fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo; NR, no realizada; ESH, esferocitosis hereditaria.

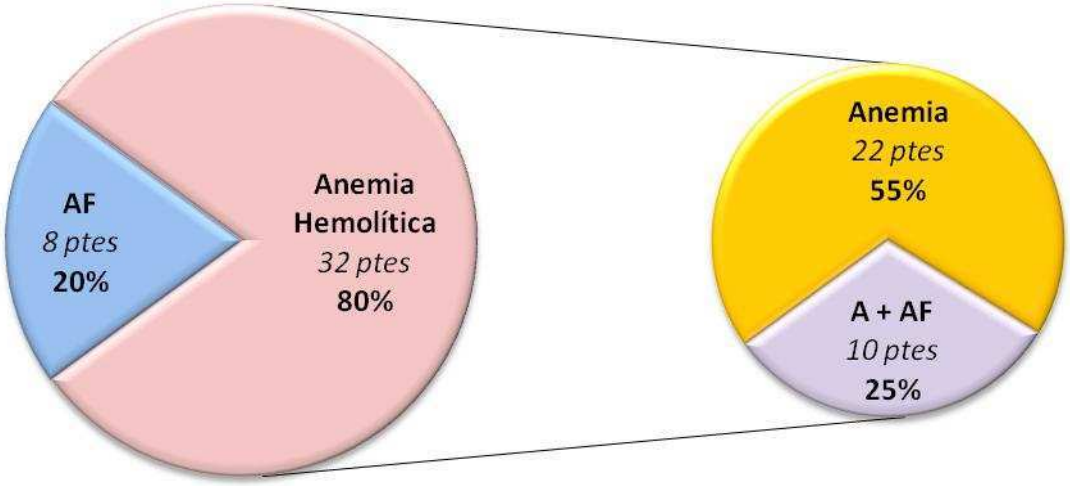


Figura IV-5: Distribución de los motivos del estudio. El estudio se realizó en pacientes con signos y síntomas de anemia hemolítica y/o por poseer un familiar del núcleo primario con diagnóstico de Esferocitosis Hereditaria. Abreviaturas: AF, antecedentes familiares. A + AF, anemia y antecedentes familiares.

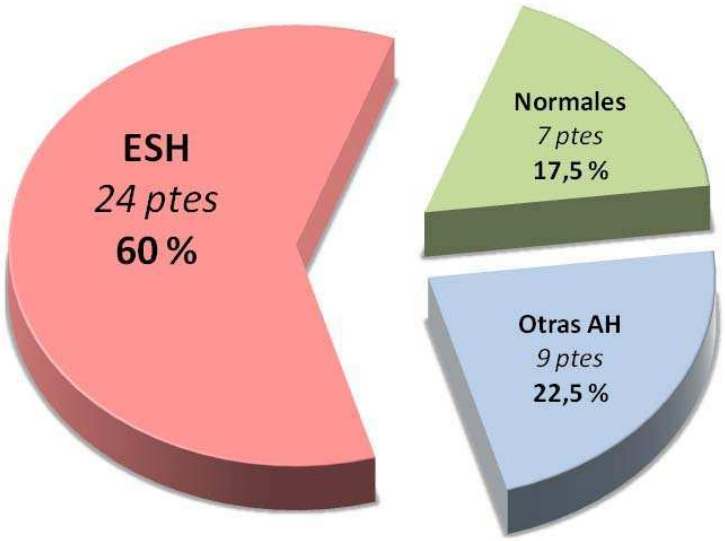


Figura IV-6: Distribución de los diagnósticos definitivos. Se diagnosticó ESH en un paciente sin anemia pero con antecedentes familiares positivos y en 23 de los 32 pacientes (72%) que presentaban signos y síntomas de anemia hemolítica.

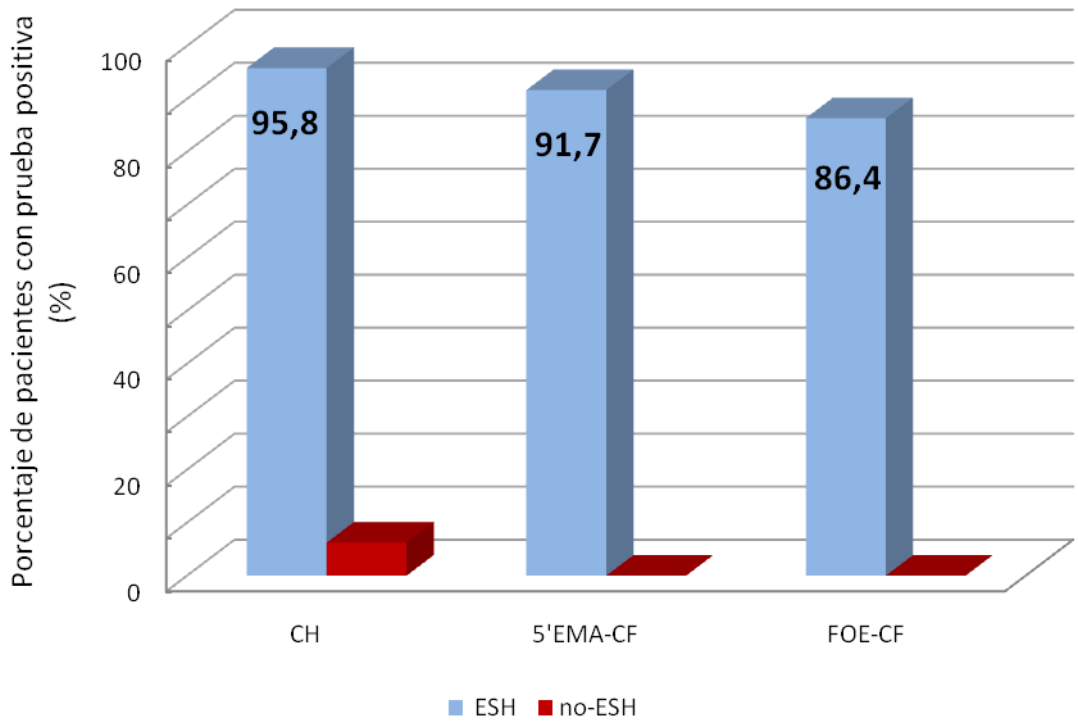


Figura IV-7: Porcentaje de resultados positivos para cada prueba en pacientes con y sin esferocitosis hereditaria. CH, criohemólisis; 5'EMA-CF, citometría de flujo con 5'eosina maleimida; FOE-CF, fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo.

Discusión

La ictericia neonatal es a menudo la primera manifestación de ESH, asociándose a anemia en el 50 - 80% de los casos *(Burman 1958, Schroter y Kashnitz 1983, Grace y Lux 2009)*. Aproximadamente el 50% de los pacientes con ESH presentan antecedente de ictericia neonatal *(Stamey y Diamond 1957, Burman 1958, Schroter y Kashnitz 1983, Pinto et al 1995)*. Se ha observado que el 1% de los neonatos ictéricos con requerimiento de luminoterapia padecen ESH *(Saada et al 2006)*, la que es actualmente reconocida como una causa importante de kernicterus *(Berardi et al 2006, Sgro et al 2010)*. Por lo tanto, al evaluar un neonato con anemia hemolítica la ESH es uno de los principales diagnósticos diferenciales a tener en consideración. A pesar de ello, se ha postulado recientemente que la ESH es una causa significativamente subdiagnosticada de hiperbilirrubinemia neonatal *(Christensen y Henry 2010)*.

Actualmente se dispone de varias pruebas confirmatorias para el diagnóstico de ESH. Sin embargo, ninguna de ellas puede detectar al 100% de los pacientes *(Haussoun y Palek 1996, Gallagher 2005, Iolascon y Avvisati 2008, King et al 2008, Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009, Bianchi et al*

2012). En consecuencia, el procedimiento habitual es realizar varias de ellas simultáneamente para poder confirmar el diagnóstico. Sin embargo, para realizar todas las pruebas se requiere una muestra de 8 - 10 mL de sangre. Bolton-Maggs y colaboradores recomiendan el uso de CH y 5'EMA-CF como las pruebas más útiles y más sencillas de realizar *(Bolton-Maggs et al 2004 y 2012)*. Coincidentemente, en nuestra población, la asociación de estas dos pruebas muestra la mayor exactitud para el diagnóstico de ESH (ver capítulo V).

Una vez establecido que no había diferencias en los resultados obtenidos utilizando sangre capilar o venosa y confirmada la utilidad de la prueba FOE-CF, se disponía de tres pruebas diagnósticas que requerían un mínimo volumen de sangre.

Los resultados muestran que el uso simultáneo de estas tres pruebas permite confirmar el diagnóstico de ESH en el 100% de los casos. La sensibilidad fue de 96% para CH, 92% para 5'EMA-CF y 86% para FOE-CF. Estos resultados son similares a los comunicados con el uso habitual de sangre venosa *(Won y Suh 2009, Warang et al 2011)*. El único resultado falso positivo se vió en un neonato con incompatibilidad ABO, observación que merece una futura investigación. La facilidad de toma de la muestra y el hecho de poder disponer rápidamente (dentro de las 24 horas de realizada la extracción) de los resultados confirmatorios del diagnóstico permiten un manejo más adecuado en los pacientes más pequeños. De hecho, hemos podido realizar diagnóstico de certeza de ESH en un niño de 2 y en otro de 8 días de vida. No se han publicado hasta la fecha otros estudios relativos al uso de sangre capilar para realizar estas pruebas.

En conclusión, la utilización de sangre capilar demostró ser útil para el diagnóstico de ESH. El uso de muy pequeños volúmenes de sangre permite realizar un diagnóstico etiológico más precoz en recién nacidos y lactantes pequeños.

CAPITULO V: Resultados de las pruebas diagnósticas (población total)

En la actualidad se dispone de varias pruebas confirmatorias para el diagnóstico de ESH. Desde el año 2007 evaluamos la utilidad de varias de ellas, tanto las clásicas (AH y FOE) como las más nuevas (CH y 5'EMA-CF). A partir de su publicación, en el año 2009, incorporamos como estudio de rutina la técnica de FOE-CF. Es sabido que ninguna de las pruebas puede detectar el 100% de los pacientes (*Hassoun et al 1996, Iolascon y Avvisati 2008, King et al 2008, Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009, Crisp et al 2011, Bianchi et al 2012*). Las guías de diagnóstico y tratamiento británicas establecen que no es necesario realizar estudios especiales de laboratorio cuando se dispone del diagnóstico certero en miembros del grupo familiar primario y presentando el paciente manifestaciones clínicas y resultados del laboratorio general inequívocos. Cuando se requiere asegurar el diagnóstico se realizan pruebas de laboratorio especializado, siendo las recomendadas la criohemólisis y la citometría de flujo con 5'EMA por ser más específicas y sensibles. Sólo excepcionalmente se requiere la determinación de la/s proteína/s deficiente/s mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con la finalidad de detectar portadores sanos o en aquellos casos en que las pruebas habituales arrojen resultados en valor límite (*Bolton-Maggs et al, 2004 y 2012*). Dichas pruebas de laboratorio especializado no habían sido desarrolladas hasta el presente en nuestro país.

Objetivos

Analizar los resultados de las pruebas diagnósticas en la totalidad de pacientes estudiados, estableciendo la utilidad de las mismas.

Evaluar si las pruebas de más reciente utilización presentan ventajas sobre las pruebas tradicionales.

Establecer la frecuencia de las distintas deficiencias de proteínas de membrana en nuestro país y compararlas con las comunicadas en otras poblaciones de características étnicas similares.

Analizar si hay relación entre el resultado de las pruebas de laboratorio y el tipo de deficiencia de membrana o la severidad de la enfermedad.

Autohemolisis (AH)

Esta prueba permite poner en evidencia la existencia de un proceso hemolítico, pero carece de especificidad ya que arrojará resultados positivos en todas las anemias hemolíticas. Se espera que el agregado de glucosa –fuente de energía– logre disminuir la hemólisis. En 19,6% de los pacientes

que presentaron autohemólisis aumentada no se observó corrección por el agregado de glucosa. Este porcentaje no difiere significativamente del grupo control, ya que en 16,9% tampoco hubo corrección. El porcentaje de corrección alcanzado en pacientes fue significativamente mayor que en el grupo control (tabla V-1). En el grupo de pacientes, los valores de autohemólisis que no presentaron corrección con glucosa fueron superiores a aquéllos que corrigieron con glucosa. La ausencia de corrección puede responder a la presencia de un gran número de eritrocitos condicionados (pre-líticos), situación que puede corroborarse con el frotis (figura V-1).

	Media	Desvío Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo	Mediana
Controles Normales					
Autohemólisis	0,66	0,40	0,10	2,58	0,59
AH con glucosa	0,46	0,26	0,05	1,36	0,41
% Corrección de AH	35,5	21,0	0,0	79,0	35,0
Pacientes ESH (población total)					
Autohemólisis (*)	6,76	6,29	0,65	32,68	4,80
AH con glucosa (*)	4,86	7,44	0,23	46,33	2,52
% Corrección de AH (*)	50,5	20,8	7,0	95,8	50,0
Pacientes ESH que no corrigen AH					
Autohemólisis	8,35	9,07	1,45	32,68	5,67
AH con glucosa	13,43	13,61	1,88	46,33	7,39
Pacientes ESH que corrigen AH					
Autohemólisis	6,42	5,69	0,65	25,10	4,36
AH con glucosa	2,91	2,79	0,23	14,26	2,21

Tabla V-1: Valores obtenidos para la autohemólisis espontánea y con agregado de glucosa en muestras de controles normales y pacientes ESH. (*) Los valores obtenidos en pacientes son significativamente diferentes de los correspondientes obtenidos en los controles normales (Mann-Whitney, $P < 0,0001$).

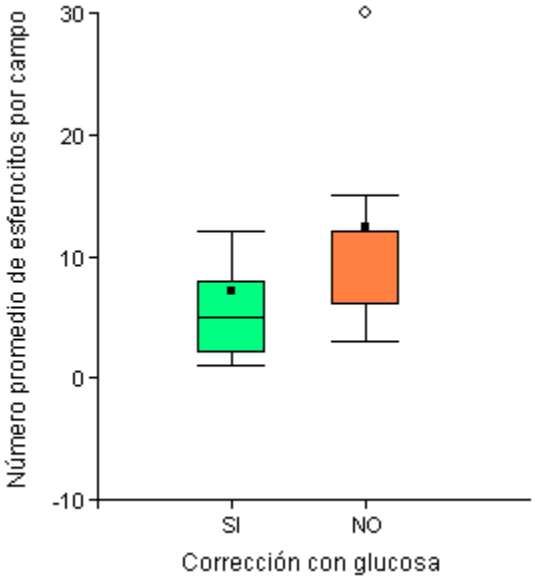


Figura V-1: Diagrama de cajas que representa el número promedio de esferocitos estimado en el frotis (campo 100x) de los pacientes ESH clasificados según la capacidad de corregir la prueba de autohemólisis con el agregado de glucosa. Los pacientes que no muestran corrección presentan un número mayor de esferocitos en el frotis (Mann- Whitney, $P < 0,05$).

Curvas de Fragilidad Osmótica Eritrocitaria (FOE)

La FOE –basal y diferida– constituye el método más antiguo para el diagnóstico. Descriptas por Chauffard a principios del siglo XX y luego clasificadas por Dacie en tipo I, II y III (ver Materiales y Métodos). Al igual que la AH, no es una prueba específica para la ESH. Debe verificarse previamente que la prueba de Coombs directa sea negativa descartando la presencia de una anemia hemolítica inmune.

En la figura V-2 se observa la amplia distribución de valores que adoptan las resistencias mínimas y máximas en la población de pacientes en comparación con los valores acotados que presentan los controles normales. Es llamativa la variabilidad que se observa en las resistencias máximas basales de los portadores sanos, probablemente éste sea el único reflejo de la fragilidad eritrocitaria. Sin embargo debe tenerse en cuenta que estos parámetros surgen de una estimación visual y por lo tanto es poco precisa. En la tabla V-2 se describen los rangos observados para cada grupo.

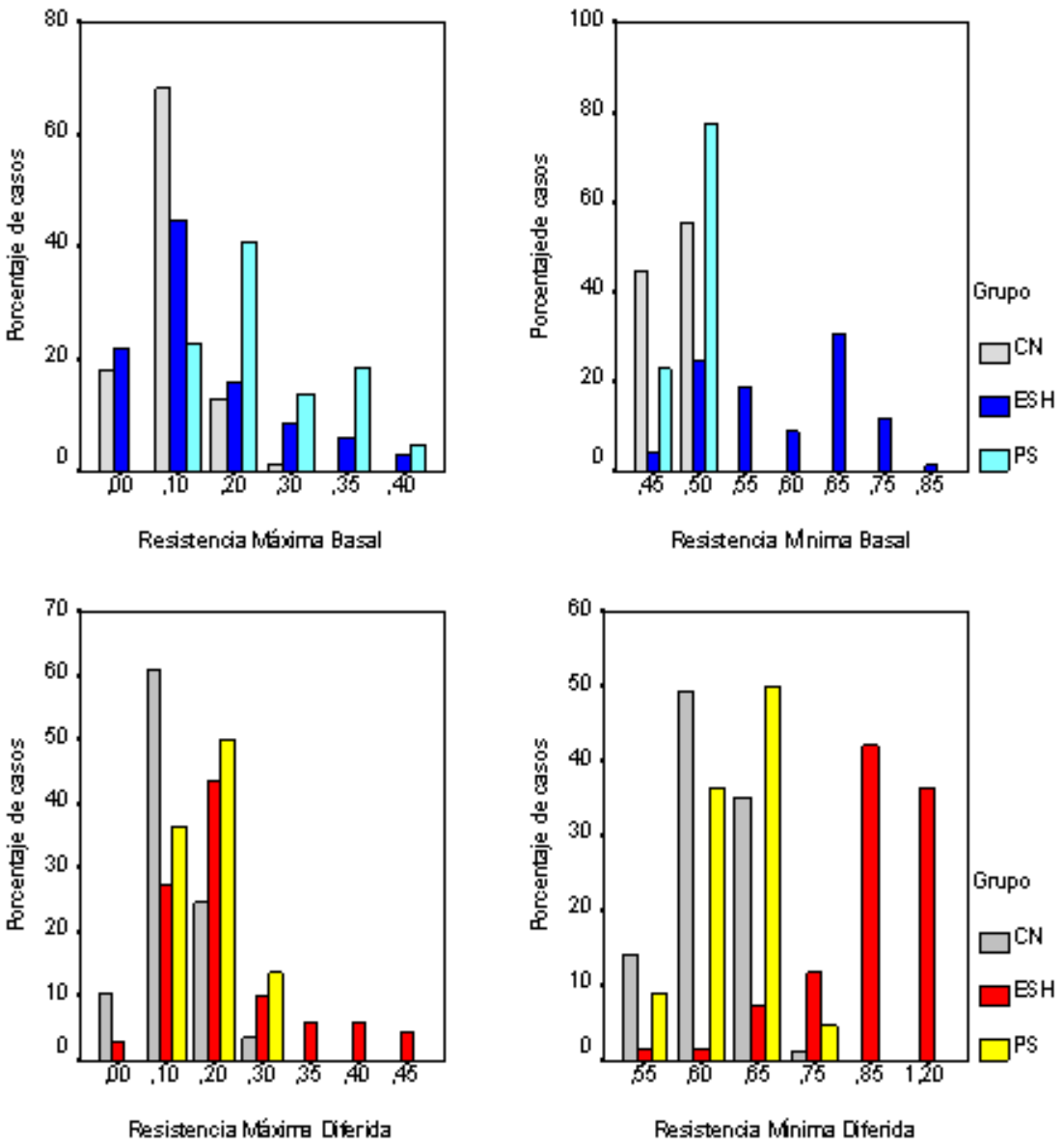


Figura V-2: Distribución de valores registrados para las resistencias mínimas y máximas en las curvas basales y diferidas de los controles normales, pacientes ESH y portadores sanos.

	CURVA BASAL		CURVA DIFERIDA	
	Resistencia Máxima	Resistencia Mínima	Resistencia Máxima	Resistencia Mínima
CN	0,00 – 0,20	0,45 – 0,50	0,00 – 0,30	0,55 – 0,75
ESH	0,00 – 0,40	0,45 – 0,85	0,00 – 0,45	0,55 – 1,20
PS	0,10 – 0,40	0,45 – 0,50	0,10 – 0,30	0,55 – 0,75

Tabla V-2: Valores registrados para las resistencias mínimas y máximas en las curvas basales y diferidas de los controles normales, pacientes ESH y portadores sanos. La frecuencia con que se registra cada valor se encuentra representada en la figura V-2.

El parámetro numérico que se utiliza para caracterizar a las curvas FOE es la fragilidad corpuscular media (FCM) obtenida por interpolación. Como ya se ha mencionado, representa la concentración de NaCl –expresada en g/100 mL de solución– a la cual se obtendría la hemólisis del 50% de la población eritrocitaria. Los valores obtenidos se describen en la tabla V-3. Debe tenerse en cuenta que la coexistencia de patologías puede modificar sensiblemente los valores. Así, un paciente con diagnóstico de ESH presenta un valor de FCM extremadamente bajo (0,292% NaCl) por hepatopatía secundaria al virus de Hepatitis C (contraído por el alto régimen transfusional) en cuyo frotis podían observarse numerosos dianocitos y ocasionales esferocitos. La coexistencia de anemias hereditarias puede generar el mismo efecto, como se observa en un PS de esferocitosis que además posee diagnóstico de β-talasemia menor (0,367% NaCl). El aumento de la resistencia en todos los casos se pone de manifiesto al realizar la curva diferida.

	CURVA BASAL				CURVA DIFERIDA			
	FCM ($\bar{X} \pm$ DE)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Mediana	FCM ($\bar{X} \pm$ DE)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Mediana
CN	0,427 ± 0,023	0,370	0,480	0,421	0,527 ± 0,028	0,466	0,597	0,528
ESH**	0,490 ± 0,042	0,400	0,654	0,480	0,648 ± 0,119	0,292	0,911	0,635
PS	0,439 ± 0,017	0,405	0,468	0,436	0,527 ± 0,045	0,367	0,580	0,534

Tabla V-3: Parámetros descriptivos de la FCM obtenidos en los controles normales, pacientes ESH y portadores sanos.
** Los valores correspondientes a los pacientes difieren muy significativamente de los correspondientes a los controles normales y portadores sanos (Kruskal-Wallis, P < 0,0001)

El incremento de la FCM obtenida por incubación es pequeño y homogéneo para los CN ($\bar{x} \pm$ DE = 0,100 ± 0,020; Mediana = 0,100), siendo mayor para la mayoría de los pacientes ($\bar{x} \pm$ DE = 0,170 ± 0,090; Mediana = 0,150) (figura V-3).

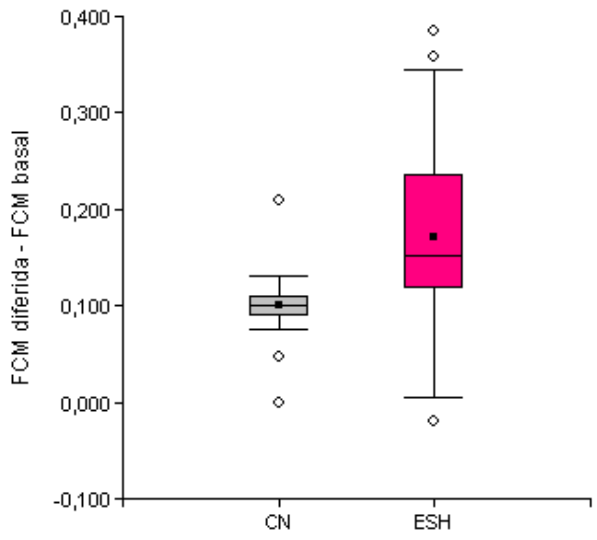
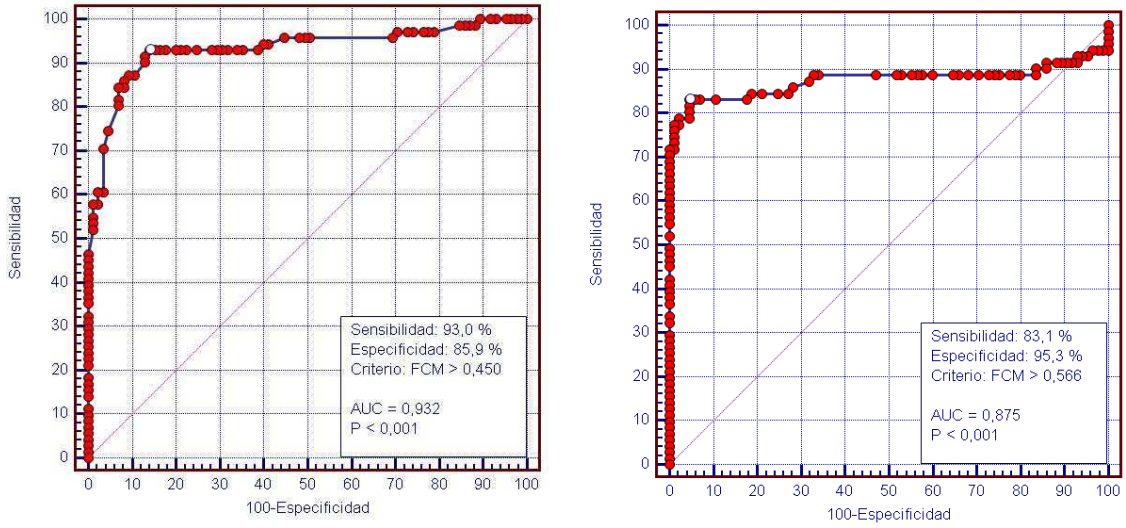


Figura V-3: Diferencia entre la fragilidad corpuscular media de las curvas diferida y basal realizadas con muestras de controles normales y pacientes. (Mann-Withney, P = 0,0004)

Mediante el análisis por curvas ROC (figura V-4) se puede observar que la incubación de la muestra permite un incremento en la especificidad diagnóstica a expensas de la sensibilidad. Los cocientes de probabilidad permiten establecer que la curva diferida posee mayor capacidad para diagnosticar la presencia de la enfermedad.



	FCM basal	FCM diferida
Area bajo la curva (AUC)	0,932	0,875
Error Estandar del área	0,023	0,036
Punto de Corte	> 0,450	> 0,566
Sensibilidad	93,0 %	83,1 %
Especificidad	85,9 %	95,3 %
Cociente de Probabilidad Positivo (CP+)	6,58	17,66
Cociente de Probabilidad Negativo (CP-)	0,082	0,180
Nivel de significación	< 0,001	< 0,001

Figura V-4: Análisis mediante curvas ROC del parámetro FCM basal (arriba a la izquierda) y FCM diferida (a la derecha). Las areas bajo la curva no son significativamente diferentes (P = 0,1821).

La FCM es un parámetro útil pero no siempre representativo de la fragilidad eritrocitaria. Para obtener la máxima información que provee esta prueba diagnóstica, es necesario visualizar los gráficos para definir la población eritrocitaria como frágil y a su vez poder clasificarlas en los subtipos I, II y III. Las curvas basales clasificadas como frágiles son tipo I y tipo II, mientras que las diferidas presentan en su mayoría la distribución tipo III (figura V-5). La importancia de realizar ambas curvas –basal y diferida– radica en que sólo un pequeño porcentaje de las curvas basales normales permanecen normales post-incubación siendo por lo tanto esta prueba negativa para poder establecer el diagnóstico (figura V-6). En la mayoría de los casos en que la curva basal resultó normal y la diferida resistente, habiendo resultado negativas las demás pruebas para el diagnóstico de ESH, se arribó al diagnóstico de hemoglobinopatías (talasemias, rasgo drepanocítico o hemoglobinas inestables) prosiguiendo con estudios no contemplados en la presente tesis. Sin embargo, como ya se ha mencionado, algunos pacientes presentaron la curva diferida resistente debido a la coexistencia de ESH y talasemia o hepatopatía. Estos casos pudieron diagnosticarse por positividad de CH y 5'EMA-CF o estudio de membrana.

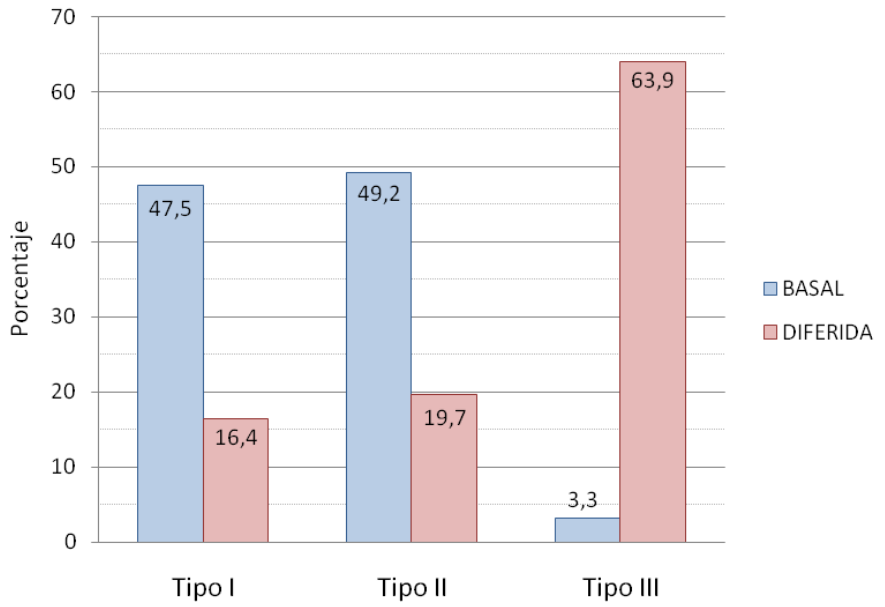


Figura V-5: Distribución de las curvas FOE frágiles clasificadas según su gráfica. Tipo I: población eritrocitaria homogéneamente frágil. Tipo II: presencia de una subpoblación frágil. Tipo III: coexistencia de subpoblaciones eritrocitarias con diferente grado de fragilidad.

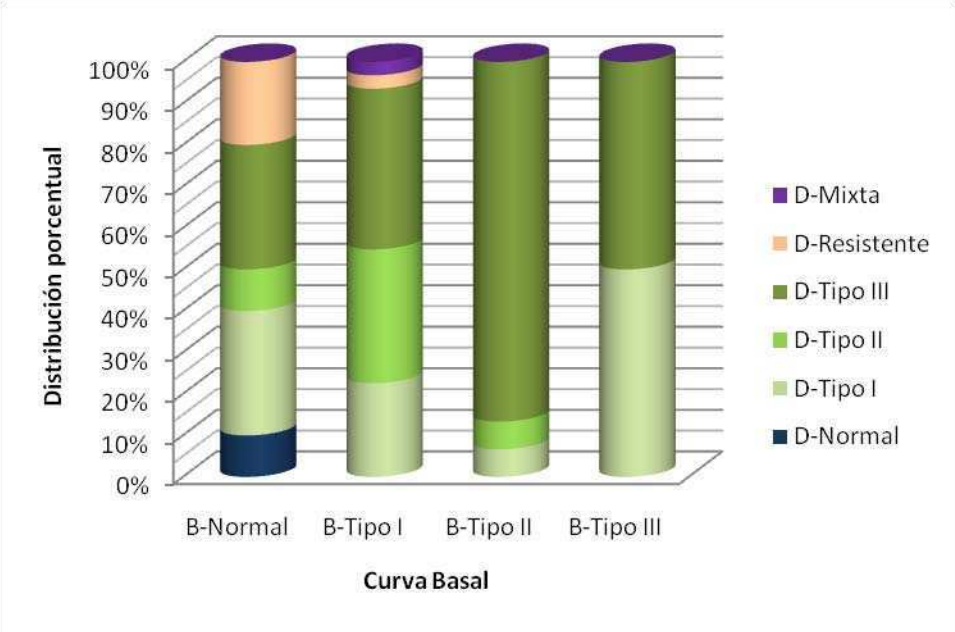
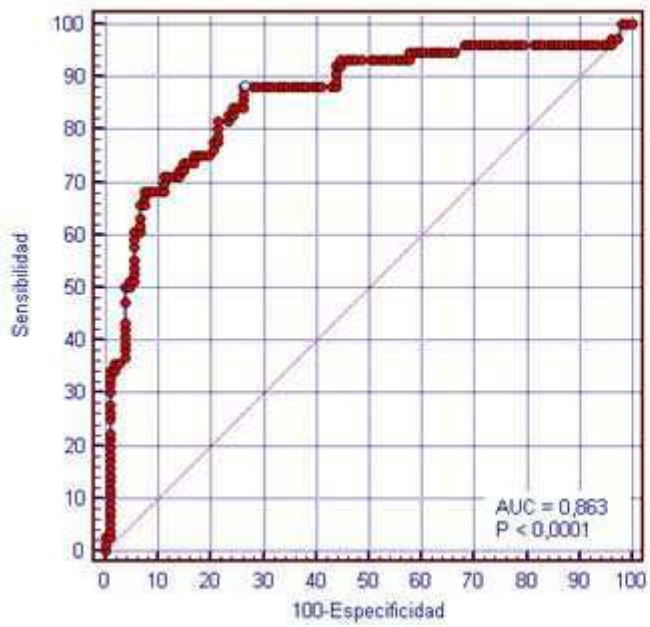


Figura V-6: Distribución de las curvas FOE clasificadas según su gráfica. El gráfico muestra el subtipo de curvas diferidas obtenidas en los pacientes ESH a partir de las basales clasificadas según su gráfica. Las curvas diferidas resistentes sugieren la coexistencia de patologías.

Fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo (FOE-CF)

Esta prueba permite evaluar la fragilidad con escaso volumen de sangre, resultando de gran utilidad para el diagnóstico neonatal (ver capítulo IV). Comenzó a realizarse en las muestras obtenidas a partir de 2009, año en que fue descripto el ensayo (*Won y Shu 2009*). La incorporación de la misma para el diagnóstico no parece estar extendida aún, ya que sólo tres grupos han publicado sus resultados (*Won y Shu 2009, Warang et al 2011, Crisp et al 2012 y 2014, Shim y Won 2013*).

El análisis por curva ROC efectuado con 76 pacientes diagnosticados como ESH y 107 controles normales genera un punto de corte superior al que establecimos previamente para el análisis neonatal (52,5% vs 22,8% de células residuales). La incorporación de nuevos pacientes trae aparejado el corrimiento del punto de corte. Esta situación también la reflejan otros investigadores que han propuesto la modificación de 24% a 61,9% de células residuales (*Shim y Won 2013*). Sin embargo, considerando la utilidad de la prueba con criterio diagnóstico –no de *screening*– aconsejamos mantener un valor de corte bajo (< 22,8%) evitando así los falsos positivos y reforzando la especificidad (figura V-7).



Punto de Corte	≤ 22,8 %	≤ 52,5 %
Sensibilidad	68,4	88,2
Especificidad	92,5	73,8
CP+	9,15	3,37
CP-	0,34	0,16

Figura V-7: Curva ROC del porcentaje de células residuales (FOE-CF). Al utilizar un punto de corte más bajo se incrementa la utilidad de la prueba ya que se genera un cociente de probabilidad positivo (CP+) mucho más elevado, manteniéndose bajo el cociente de probabilidad negativo (CP-).

Criohemólisis hipertónica (CH)

La CH constituye la primera prueba específica para el diagnóstico de ESH. Es recomendada como primera línea para el diagnóstico conjuntamente con 5'EMA (*Bolton-Maggs et al, 2004 y 2011).* Analizando la totalidad de la población con diagnóstico ESH puede establecerse como valor de corte para CH 2,63%, ligeramente inferior al establecido y validado en las primeras etapas de este estudio (ver capítulo III). Esta prueba ha mostrado ser la más sensible y específica de las presentadas en este estudio (figura V-8) y con gran poder diagnóstico ya que el cociente de probabilidad positivo es elevado (CP+ =15,9), manteniéndose muy bajo el cociente de probabilidad negativo (CP- = 0,07).

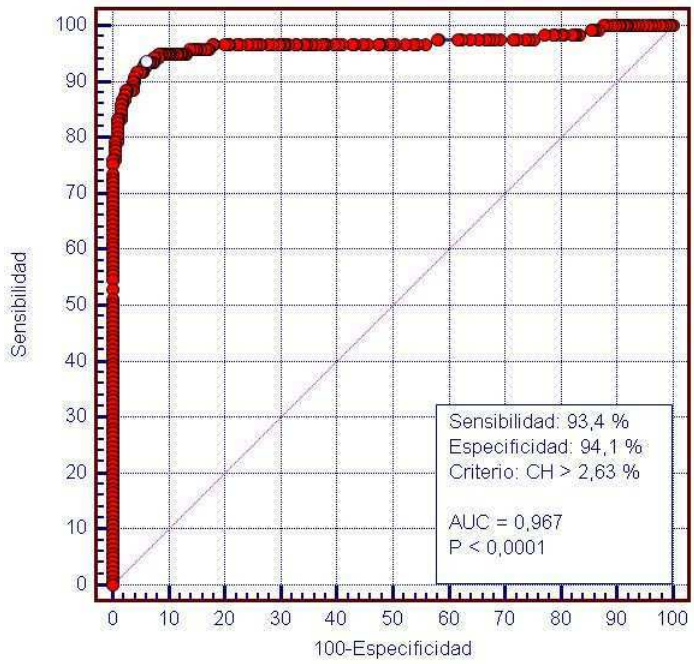


Figura V-8: Curva ROC para la Criohemólisis Hipertónica (CH). La prueba presenta un alto grado de sensibilidad y especificidad, con elevado poder diagnóstico. Para valores de CH iguales o superiores a 4,6% se alcanza 100% de especificidad.

Los resultados de la prueba de CH no dependen de la relación superficie/volumen sino de la integridad de las proteínas de membrana. Este concepto es reforzado por la ausencia de correlación entre la CH y las pruebas de fragilidad osmótica (figura V-9).

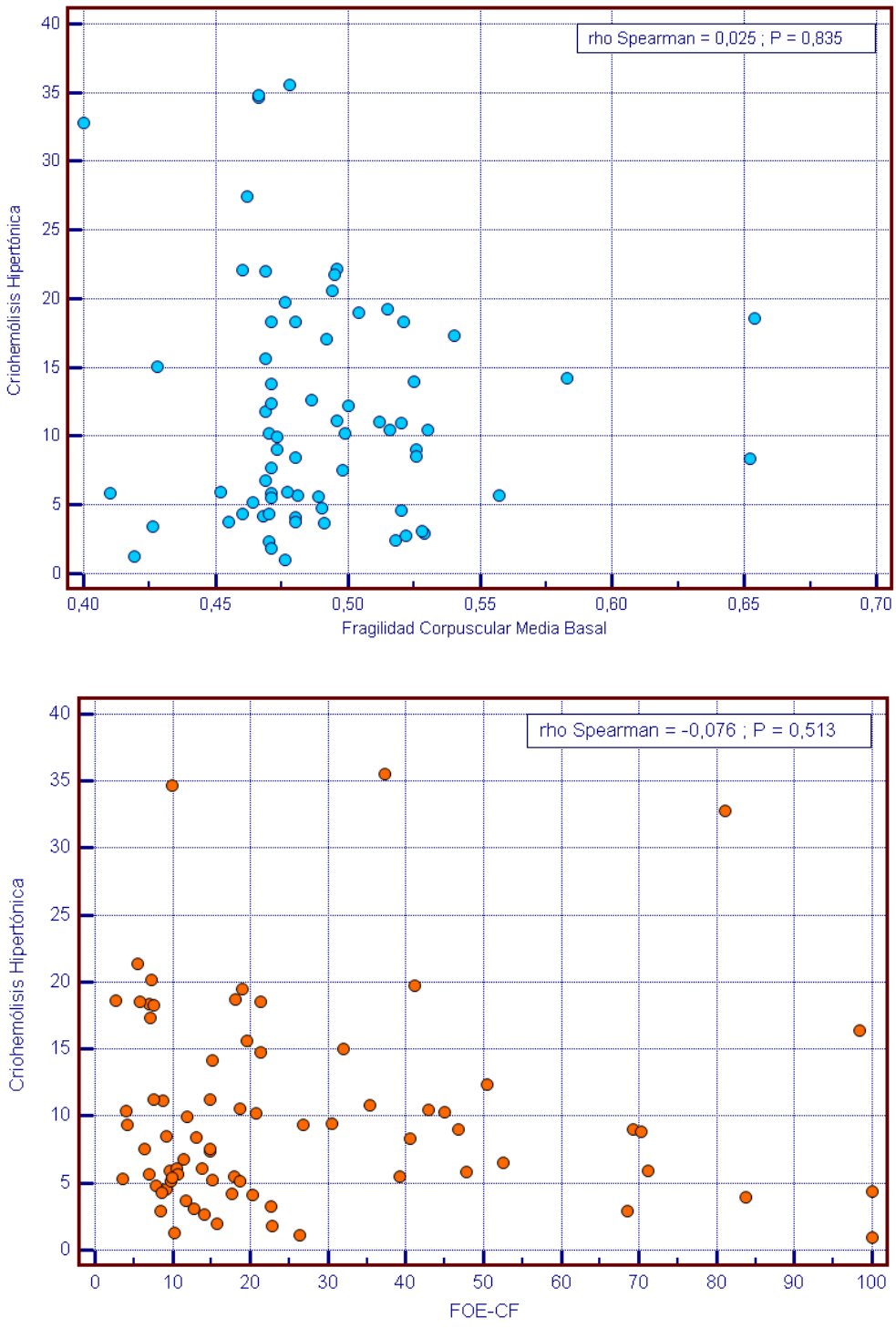


Figura V-9: Análisis de correlación para la Criohemólisis Hipertónica (CH) y la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE). Arriba: CH y la fragilidad corpuscular media basal (FOE tradicional). Abajo: CH y el porcentaje de células residuales (FOE-CF). En ambos casos se verifica ausencia de correlación (|Rho de Spearman| < 0,1; P > 0,05).

Citometría de Flujo con 5'eosina maleimida (5'EMA - CF)

De las pruebas diagnósticas más recientes, ésta ha sido la más difundida debido a su simplicidad y a la rápida obtención de los resultados. La única desventaja es que requiere disponer de 6 controles normales simultáneos limitando la implementación a centros que dispongan diariamente de donantes o bien establecer alguna estrategia programada con anticipación.

El reactivo se une principalmente a Banda 3, pero un 20% de la fluorescencia emitida se asocia a la unión con grupos sulfhidrilos de las proteínas Rh. Las alteraciones de las proteínas de membrana en la ESH es heterogénea y por lo tanto la disminución en la intensidad de fluorescencia no puede ser explicada sólo en base a la disminución de Banda 3. Ha sido demostrado que el contenido de proteínas Rh se encuentra disminuído en un 25-30% en la esferocitosis (*King et al 2004*). El complejo Rh se asocia a Banda 3 y a través de la ankirina se une al citoesqueleto, de manera que los defectos de interacción vertical repercuten también en el anclaje del complejo Rh disminuyendo su expresión (*Van Kim et al 2006*). La densidad antigénica varía para los diferentes fenotipos Rh. También es heterogéneo el mecanismo mediante el cual un individuo es Rh negativo pero en la mayoría de los sujetos de origen caucásico, el haplotipo Rh negativo surge por la ausencia del gen RHD con la presencia del gen RHCE *(Westhoff 2007)*. De esta manera, podría verse afectada la cantidad de residuos capaces de unir el reactivo fluorescente. Por este motivo se analizó la expresión de fluorescencia en los controles normales en los que fue registrado el grupo sanguíneo (figura V-10). La ausencia de diferencias significativas habilita a utilizar controles normales de cualquier grupo y factor sin perjuicio de sesgar la determinación diagnóstica.

Para un manejo adecuado de los resultados se evalúa la variación de la intensidad de fluorescencia de los pacientes respecto a la obtenida en promedio con seis controles normales (ver capítulo III). De la misma manera, se calculó la variación obtenida para cada control normal respecto del promedio en el día de procesamiento. El análisis de los resultados muestra que para los controles normales dicha variación no difiere significativamente de cero ($\bar{x}$ ± SEM: -0,098 ± 0,344; Mediana 0,369). Las variaciones de la intensidad de fluorescencia para los pacientes son significativamente diferentes de cero ($\bar{x}$ ± SEM: -26,262 ± 0,997; Mediana -25,882). Además, ambos grupos –controles normales vs pacientes– difieren significativamente entre sí (figura V-11).

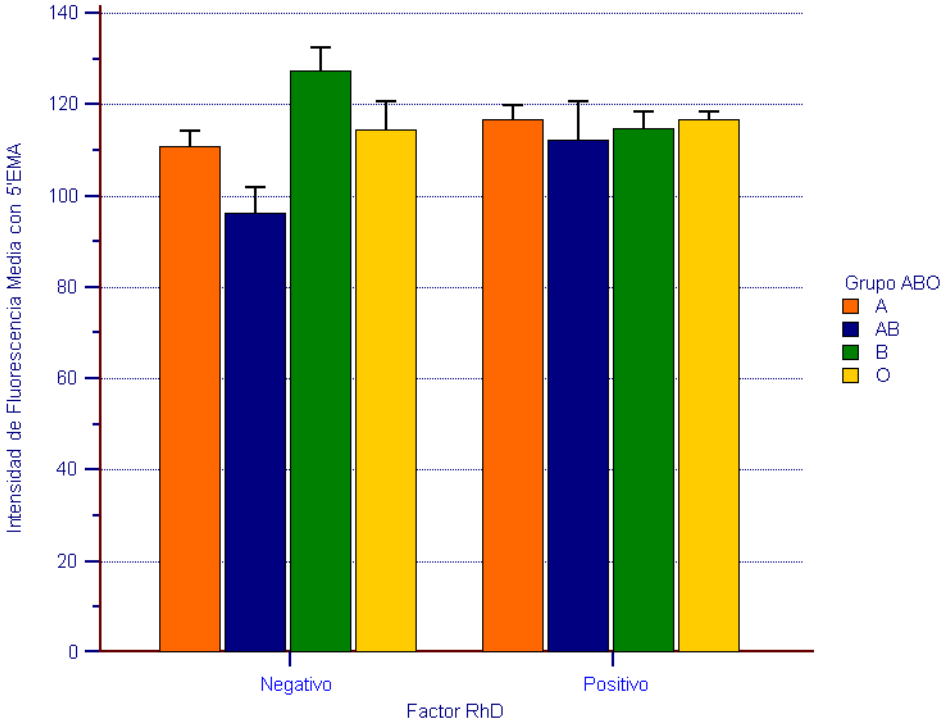


Figura V-10: Intensidad de fluorescencia media (geométrica) obtenida con 5'EMA en controles normales clasificada por grupo y factor (Media ± SEM). Las diferencias observadas no son significativas (P > 0,05).

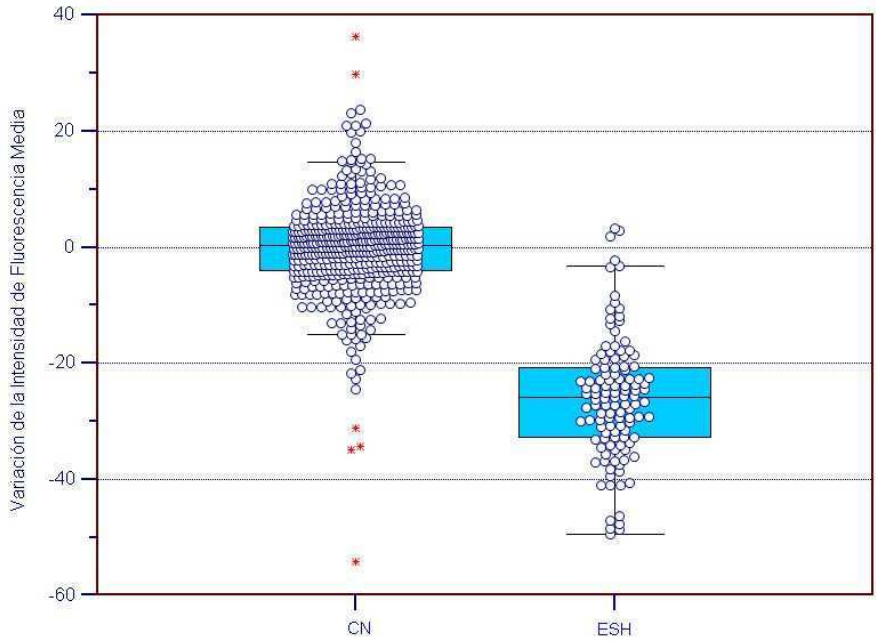


Figura V-11: Variación de la intensidad de fluorescencia media (geométrica) obtenida con 5'EMA en controles normales y pacientes respecto del promedio obtenido en los 6 controles normales en el día de procesamiento de las muestras. Ambos grupos son significativamente diferentes (Mann Whitney, P < 0,0001).

Los pacientes presentan un VCM significativamente menor que los controles normales (ver capitulo II), de manera que corresponde analizar si la variación de la fluorescencia podría estar relacionada con la variación del volumen eritrocitario. El análisis de correlación, si bien es significativo, resulta pobre (Rho de Spearman < 0,2) o regular (Rho de Spearman < 0,4) en los CN y en los pacientes respectivamente (figura V-12).

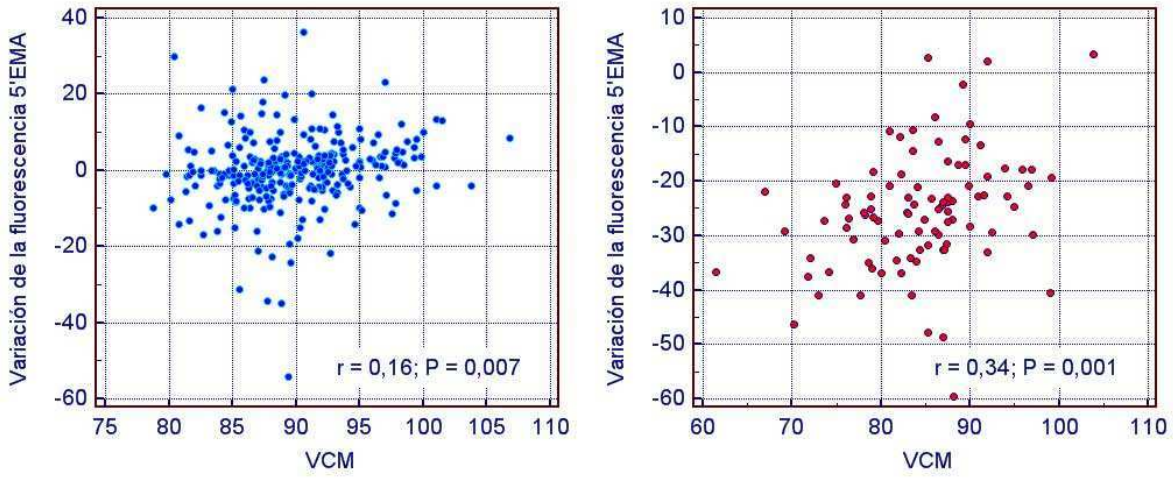


Figura V-12: Análisis de correlación entre la variación de la intensidad de fluorescencia media con 5'EMA y el volumen corpuscular medio. El gráfico de la izquierda corresponde a los controles normales, el de la derecha a los pacientes.

Conjuntamente con la intensidad de fluorescencia, se evaluaron los coeficientes de variación (CV) que se relacionan con la amplitud de la curva obtenida en los histogramas. En los controles normales este parámetro no se correlaciona con el ADE (es decir con la variabilidad del tamaño eritrocitario) ni con los niveles de hemoglobina (figura V-13). El descenso de hemoglobina y el aumento del ADE que caracterizan a los pacientes más severos, muestran una correlación significativa pero no fuerte (Rho de Spearman ≤ 0,5) con el CV (figura V-14). Sin embargo el aumento del CV ha sido el único parámetro en las pruebas diagnósticas que permitió diferenciar los subgrupos de severidad (ver más adelante). Notese que las variaciones de CV se distribuyen en torno a cero para los controles (figura V-13) mientras que para los pacientes los valores son mayoritariamente positivos (figura V-14)

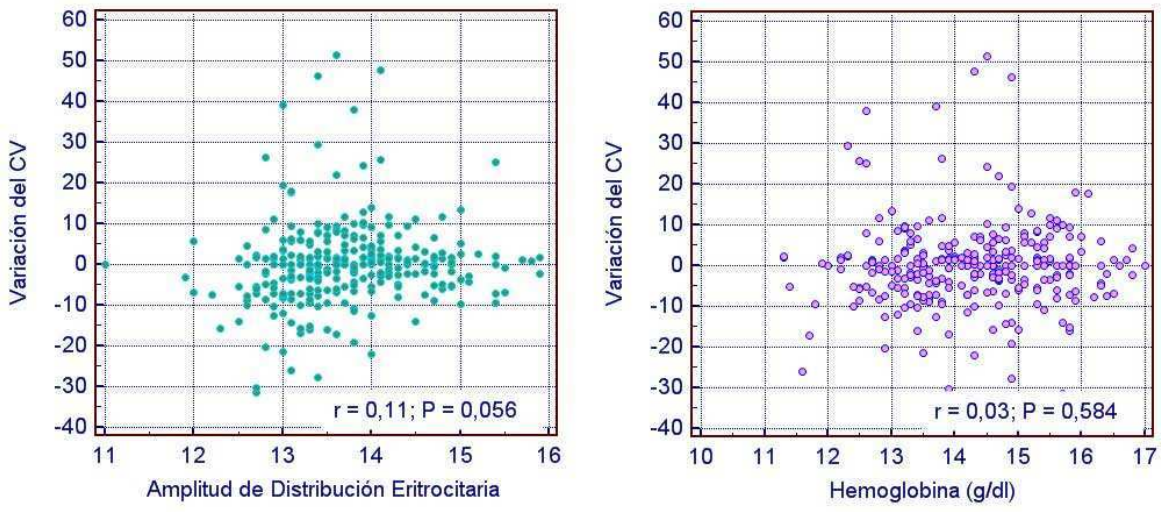


Figura V-13: Análisis de correlación entre la variación del coeficiente de variación del histograma de fluorescencia 5'EMA con la amplitud de distribución eritrocitaria (a la izquierda) y con los niveles de hemoglobina (a la derecha) para los controles normales.

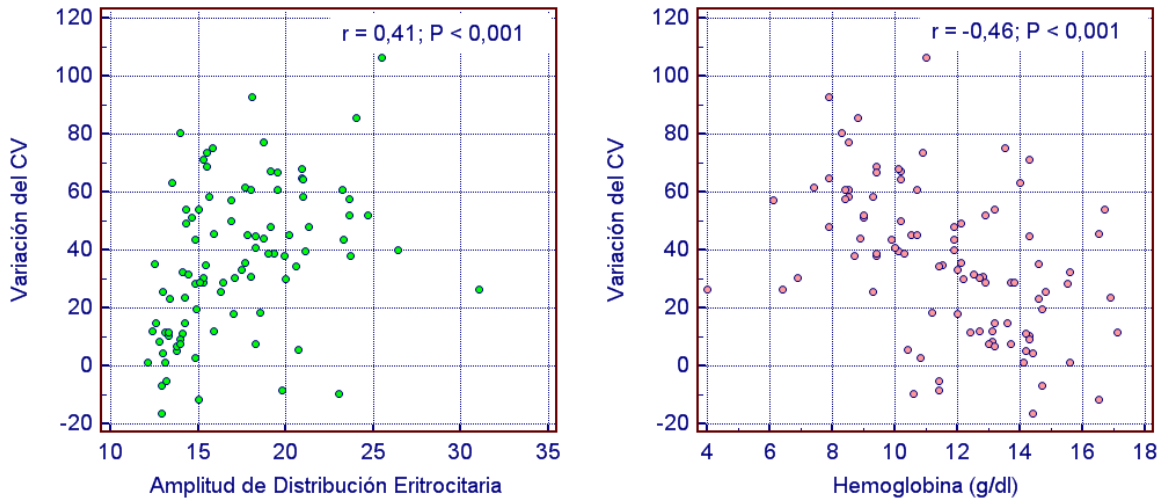


Figura V-14: Análisis de correlación entre la variación del coeficiente de variación del histograma de fluorescencia 5'EMA con la amplitud de distribución eritrocitaria (a la izquierda) y con los niveles de hemoglobina (a la derecha) para los pacientes con diagnóstico de esferocitosis hereditaria.

El análisis mediante curvas ROC realizado con la totalidad de los datos establece para el valor de corte utilizado (disminución de la intensidad de fluorescencia media superior a 17%) una sensibilidad de 85,1% con una especificidad del 97,7%, CP+ 37,0 y CP- 0,15 (figura V-15).

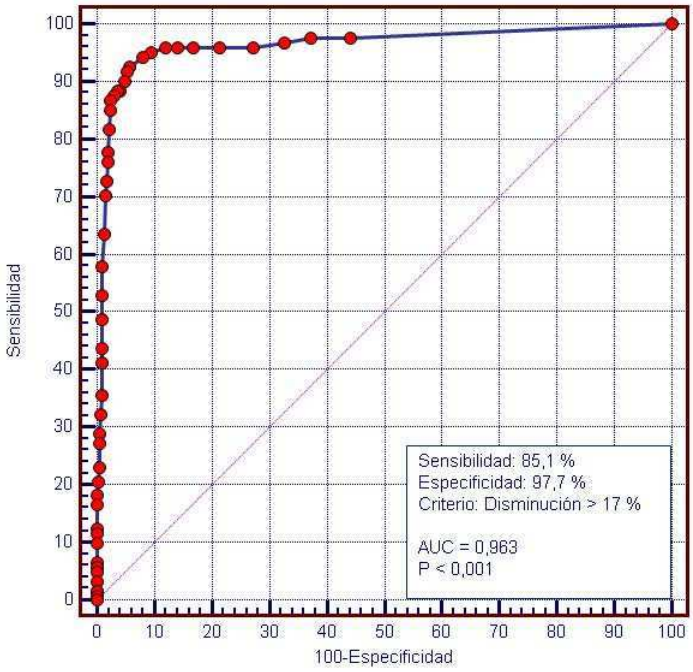


Figura V-15: Análisis mediante curva ROC de la disminución de la intensidad de fluorescencia media (geométrica) obtenida con 5'EMA en controles normales y pacientes respecto del promedio obtenido en los 6 controles normales en el día de procesamiento de las muestras. Las variaciones positivas (aumento de fluorescencia) se contabilizan como disminución igual a cero y las variaciones negativas (disminución de fluorescencia) se contabilizan en valor absoluto.

Proteínas de membrana eritrocitaria

El análisis de las proteínas de la membrana constituye el patrón de oro (prueba diagnóstica *"gold standard"*) que permite certificar la disminución de una o más de las proteínas integrales o del citoesqueleto del eritrocito. Es una técnica laboriosa que arrojó resultados positivos en poco más del 70% de los pacientes, porcentaje coincidente con el informado por la mayoría de los autores (*Miraglia del Giudice et al 1994, Lee et al 2000, Yawata et al 2000, Sánchez-López et al 2003, Perrotta et al 2008*). La mayor utilidad residió en identificar portadores sanos en el estudio familiar (ver en capítulo I, figura I-3).

La SDS-PAGE fue realizada en 151 individuos, correspondiendo a 96 pacientes y/o familiares en estudio y a 55 controles normales. Los resultados del estudio de membrana fueron analizados incluyendo los portadores sanos identificados. Predominó la deficiencia aislada de proteínas. Las deficiencias más frecuentemente encontradas corresponden a ankirina y espectrina (figura V-16). La espectrina fue la deficiencia más común en las formas dominantes y la ankirina en las no dominantes. La deficiencia de proteína 4.2 se observó preferentemente en las formas combinadas. En miembros pertenecientes a siete familias diferentes se estableció deficiencia de proteína 4.1 aislada o combinada con deficiencia de espectrina o proteína 4.2 (figura V-17).

Ni el nivel de disminución ni el tipo de proteína deficiente mostraron asociación con el resultado de las otras pruebas diagnósticas realizadas.

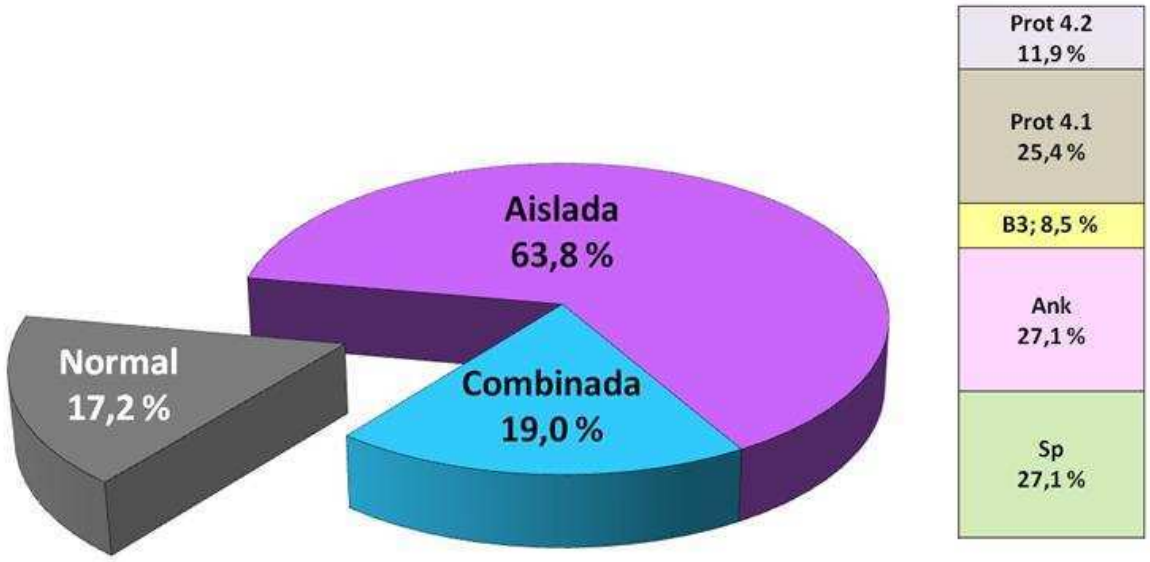


Figura V-16: Tipo de alteraciones y prevalencia (en porcentaje del total de casos) de las proteínas de membrana detectadas en los pacientes con esferocitosis hereditaria y portadores sanos.

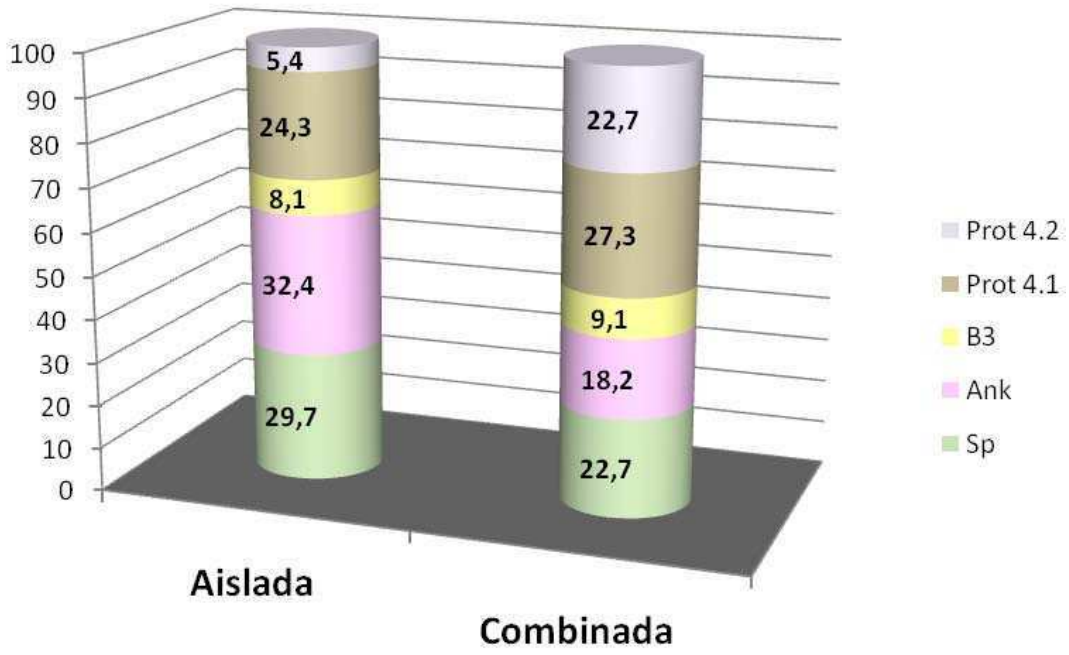


Figura V-17: Prevalencia de las proteínas de membrana deficientes (aisladas o combinadas) detectadas en pacientes con esferocitosis hereditaria y portadores sanos.

Resultados de las pruebas y severidad de la enfermedad

El rango de resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas es amplio y la variabilidad podría responder a la gravedad de la anemia. Por este motivo se evaluaron los resultados de las pruebas diagnósticas en función de la severidad de la enfermedad (tabla V-4 y figura V-18). Las tres nuevas pruebas (FOE-CF, CH y 5'EMA-CF) no muestran resultados significativamente diferentes. Las pruebas tradicionales (AH, FOE basal y diferida) sólo logran diferenciar significativamente algunos subgrupos (tabla V-4). Nótese que en los pacientes que requirieron esplenectomía persisten resultados alterados en todas las pruebas diagnósticas a pesar de que el procedimiento corrige la anemia.

Prueba Diagnóstica	Severidad	Media	Desvío Estandar	Mediana	P valor K-W	Grupos diferenciables
Autohemólisis (% hemólisis)	Leve	5,15	5,86	3,50	0,0169	A
	Moderada	10,23	7,28	7,60		AB
	Severa	7,27	7,06	5,70		AB
	Esplenectomizados	7,07	4,62	7,10		B
FOE-CF (% células residuales)	Leve	33,42	29,99	20,70	0,3133	
	Moderada	26,71	24,13	18,15		
	Severa	23,95	26,42	9,80		
	Esplenectomizados	18,02	11,65	12,70		
FOE-basal (Fragilidad Corpuscular Media)	Leve	0,48	0,04	0,47	0,0057	A
	Moderada	0,49	0,03	0,48		A
	Severa	0,51	0,06	0,50		AB
	Esplenectomizados	0,51	0,03	0,52		B
FOE-diferida (Fragilidad Corpuscular Media)	Leve	0,61	0,12	0,61	0,0002	A
	Moderada	0,65	0,09	0,64		A
	Severa	0,62	0,04	0,62		A
	Esplenectomizados	0,78	0,08	0,79		B
Criohemólisis (% hemólisis)	Leve	12,86	9,10	11,00	0,0856	
	Moderada	9,98	6,84	8,45		
	Severa	8,81	5,13	7,95		
	Esplenectomizados	7,44	4,98	5,90		
5'EMA-CF (% de disminución de la intensidad de fluorescencia)	Leve	25,37	10,09	26,00	0,8473	
	Moderada	27,53	10,88	26,50		
	Severa	26,17	12,87	25,00		
	Esplenectomizados	29,41	15,86	27,00		

Tabla V-4. Resultados de las pruebas diagnósticas clasificados por su severidad al momento del estudio de acuerdo a los criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al 2008)*. Para cada prueba diagnóstica se realiza la prueba de Kruskal-Wallis. Grupos con letra en común no son significativamente diferentes.

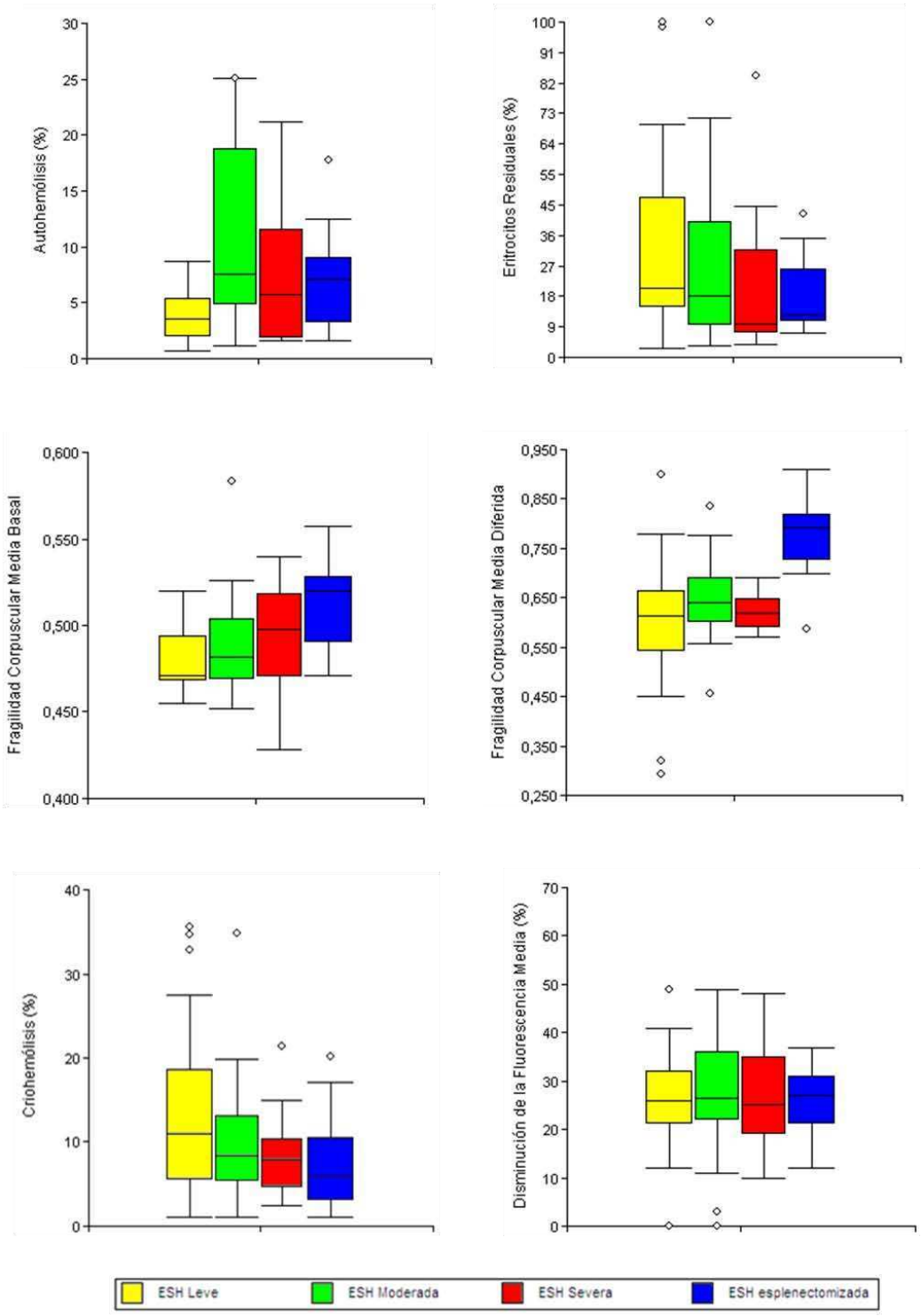


Figura V-18. Gráficos box-plot que muestran la distribución de los resultados de las pruebas diagnósticas presentados por los pacientes al momento del estudio. Los pacientes no esplenectomizados son clasificados en función del nivel de hemoglobina de acuerdo a los criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al, 2008)*.

En la prueba diagnóstica 5'EMA-CF –además de evaluar la disminución de la intensidad de fluorescencia media– se evaluó el coeficiente de variación (CV). Este parámetro no es de utilidad diagnóstica en cuanto a caracterizar la patología. En todos los cuadros anémicos que hemos evaluado, independientemente de su etiología, el coeficiente resulta incrementado respecto de los controles normales. En los pacientes esplenectomizados se corrige la anemia y la variación del CV disminuye (figura V-19).

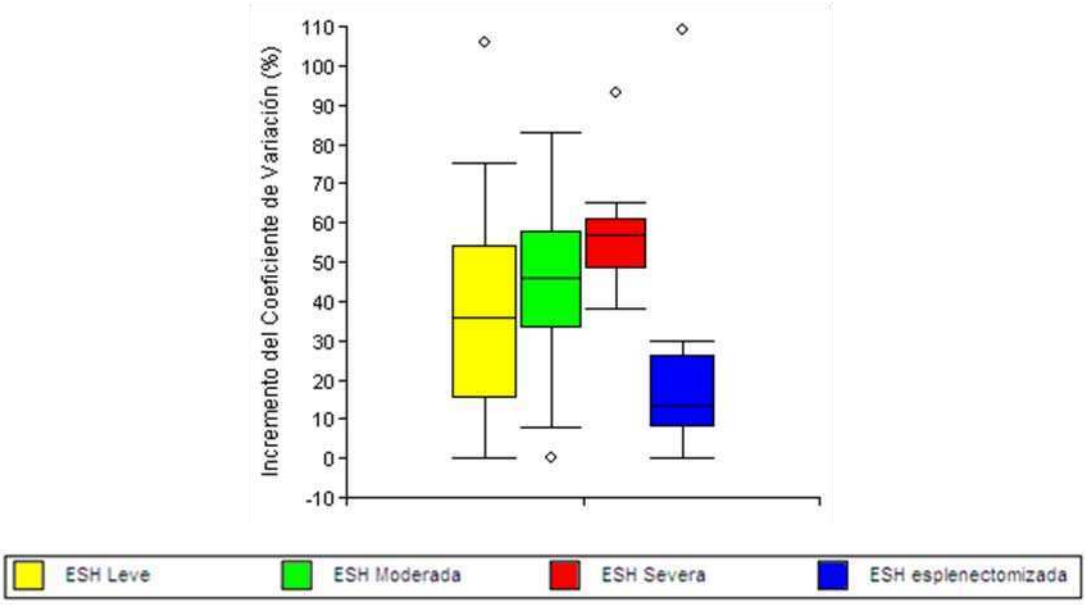


Figura V-19. Box-plot de la distribución de los coeficientes de variación (CV) de los histogramas correspondientes a la evaluación de la intensidad de fluorescencia con 5'eosina maleimida. Los pacientes no esplenectomizados son clasificados en función del nivel de hemoglobina según los criterios de Mariani y colaboradores *(Mariani et al, 2008)*. Los grupos difieren significativamente entre sí (Kruskal Wallis; $P < 0,05$)

Se calcularon los cocientes entre el contenido de las proteínas de la membrana y del citoesqueleto (B3/Sp; B3/Ank; B3/Prot 4.1; B3/Prot 4.2; Sp/Ank; Sp/Prot 4.1; Sp/Prot 4.2; Ank/Prot 4.1; Ank/Prot4.2 y Prot4.1/Prot4.2). Las alteraciones en dichos cocientes no permitieron discriminar los grupo de severidad (Mann Whitney, $P > 0,05$). Los cocientes Sp/Prot 4.2 y Prot4.1/Prot4.2 fueron los únicos que correlacionaron débilmente pero en forma significativa con el ADE (coeficiente Rho de Spearman: 0,3; $P< 0,03$) y el índice CHCM/ADE (coeficiente Rho de Spearman: -0,27; $P< 0,05$). No hubo correlación significativa con otros parámetros hematimétricos.

Sensibilidad y especificidad

Con el objetivo de comparar la eficacia de las pruebas diagnósticas realizadas, se evaluó la positividad de las mismas. Debido a que la totalidad de las pruebas no fueron realizadas en algunos pacientes (se incluyen las determinaciones realizadas con sangre capilar) los resultados se informan como porcentaje del total de pacientes en los cuales fue realizada la prueba (figura V-20).

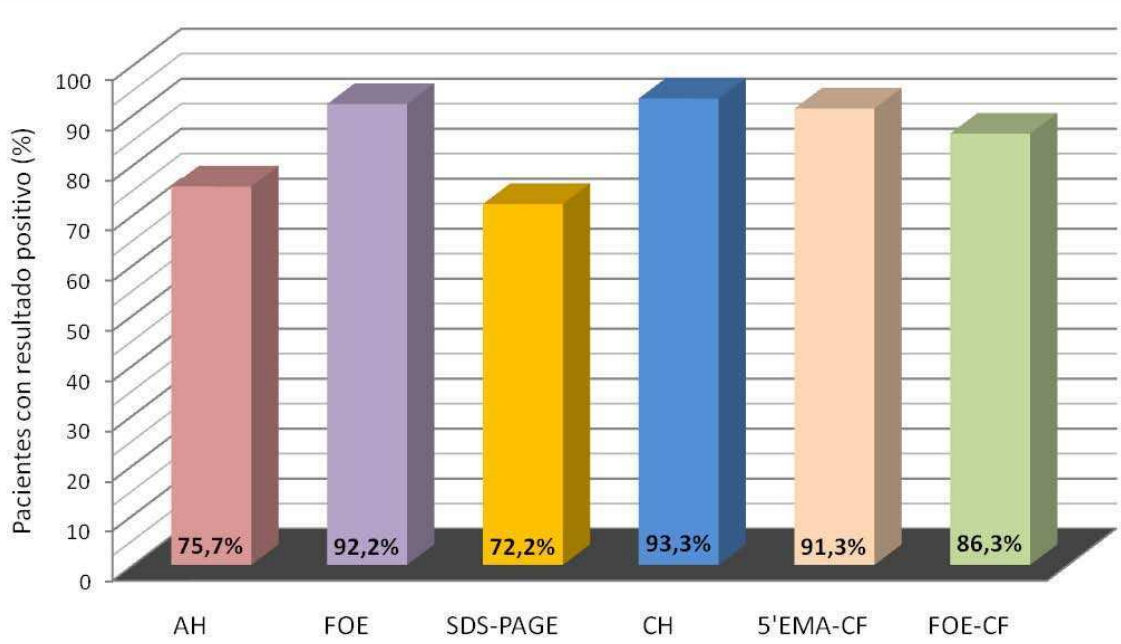


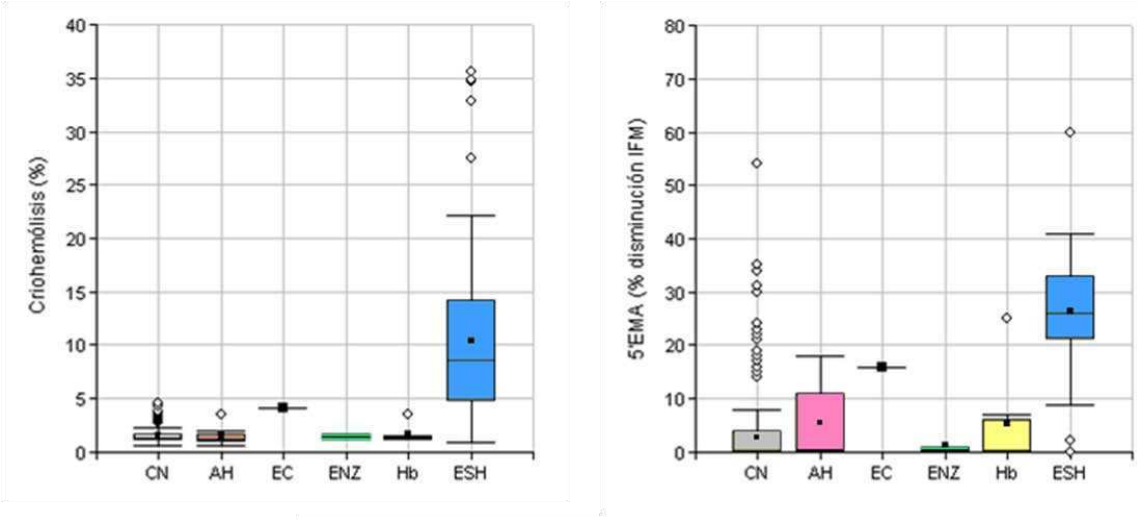
Figura V-20. Porcentajes de positividad de las distintas pruebas en pacientes con esferocitosis hereditaria. AH: autohemólisis a las 48 h; FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria; SDS-PAGE: electroforesis de proteínas de membrana; CH: criohemólisis hipertónica; 5'EMA-CF: citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; FOE-CF: fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo.

Las pruebas diagnósticas que tuvieron mayor sensibilidad fueron CH, FOE y 5'EMA-CF. La FOE tuvo una positividad del 92%, superior a la informada por otros autores (*Korones y Pearson 1989*, *Dacie et al 1991*). Esto es debido a que para considerar positiva la prueba se ha evaluado no sólo la fragilidad corpuscular media sino también su gráfica.

En 118 pacientes (97,5%) se efectuaron 3 o más pruebas diagnósticas. En 19 pacientes (15,7%) se observó que presentaban sólo 2 pruebas positivas. Al evaluar los resultados obtenidos en los pacientes en quienes se habían realizado las tres nuevas técnicas (CH, 5'EMA-CF y FOE-CF), se observó que todos habían tenido al menos una prueba positiva, y que el 95,9% presentaron dos de estas pruebas positivas, permitiendo establecer el diagnóstico.

Resultado de las pruebas en otras anemias hemolíticas

La sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas establecidas mediante curvas ROC sólo tienen en cuenta los resultados obtenidos en pacientes con la patología en estudio (ESH) y los obtenidos en controles normales. Sin embargo, es de gran interés observar los resultados de las pruebas en otras patologías que se presentan como diagnósticos diferenciales (figura V-21). Como se mencionó en el capítulo I (ver figura I-4) en varios pacientes con fenotipo hemolítico se desestimó el diagnóstico de ESH y con estudios complementarios fueron diagnosticados como hemoglobinopatías, enzimopatías, eliptocitosis congénita y anemias hemolíticas no esferocíticas, no pudiendo arribar un diagnóstico específico aún. El grupo de hemoglobinopatías incluye pacientes con Hb S (heterocigotas, heterocigota compuesto con beta talasemia y homocigota), con beta talasemia menor y con hemoglobinas inestables. Las enzimopatías corresponden a dos deficiencias de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y dos deficientes en piruvato kinasa. Los pacientes con anemias hemolíticas no clasificables incluyen a los pacientes que presentaron anemia hemolítica neonatal. En ellos el estudio fue realizado durante el cuadro hemolítico y el seguimiento clínico determinó la transitoriedad del mismo. La eliptocitosis congénita (1 caso) presentó resultados de las nuevas pruebas en el límite de los valores para ESH, sin embargo el diagnóstico se adjudicó debido a que en el frotis se observaban eliptocitos pero no esferocitos. En ninguno de los otros diagnósticos se observó la simultaneidad de dos de las nuevas pruebas positivas.



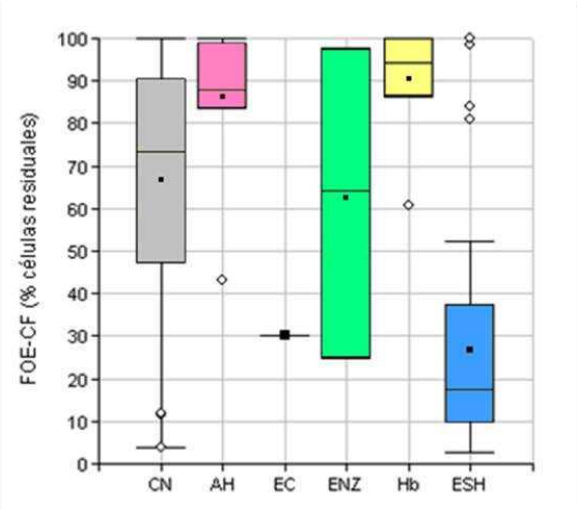


Figura V-21. Gráficos box-plot de los resultados obtenidos en las nuevas pruebas diagnósticas para los pacientes agrupados de acuerdo al diagnóstico final. CN: controles normales, AH: anemias hemolíticas no esferocíticas (no clasificables), EC: eliptocitosis congénita, ENZ: enzimopatías; Hb: hemoglobinopatías, ESH: esferocitosis hereditaria.

Discusión

La ESH ocurre en todos los grupos étnicos y raciales, pero es particularmente frecuente en la población de Europa del norte, con una prevalencia reconocida de 1 en 5.000 personas (*Morton et al 1962*). Sin embargo, dada la frecuencia de formas muy leves de enfermedad que sólo se pueden detectar a través de pruebas de laboratorio muy sensibles, se estima que esta prevalencia probablemente sea 4 a 5 veces mayor (*Godal y Heist 1981*, *Eber et al 1992*). En nuestra población, al igual que lo generalmente aceptado (*Grace y Lux 2009*), la mayoría de los casos se diagnosticaron en la infancia. Sin embargo, debe llamar la atención que en algunos pacientes el diagnóstico recién se haya realizado en las décadas sexta o séptima de la vida. Esta observación puede estar indicando subestimación o desconocimiento de los síntomas de la enfermedad, así como falta de acceso a las pruebas de laboratorio especificas.

La curva de FOE es aún considerada como el "patrón oro" por algunos autores (*Iolascon y Avvisati 2008, Perrotta et al 2008, Grace y Lux 2009*) a pesar de no ser útil para diferenciar ESH de otras patologías con esferocitos circulantes, como anemia hemolítica autoinmune (AHAI), incompatibilidad ABO o eliptocitosis esferocitica (*Perrotta et al 2008, Bolton-Maggs et al 2004, King et al 2000*). En nuestro estudio, esta determinación ha mostrado un alto grado de positividad (92%) siempre y cuando se evalúe la gráfica completa y no sólo la fragilidad corpuscular media. La coexistencia de talasemia o hepatopatías que generan curvas resistentes

y la posibilidad de desarrollar una prueba de Coombs directa positiva en pacientes transfundidos determinan la necesidad de disponer de pruebas específicas para el diagnóstico de ESH. La CH y la citometría de flujo con 5'EMA han mostrado ser altamente específicas y sensibles. Ambas arrojan resultados normales en la esferocitosis secundaria a AHAI. Si bien hay opiniones controvertidas respecto de la utilidad de la CH (*Romero et al 1997, Streichman y Gescheidt 1998, Iglauer et al 1999, Bolton-Maggs et al 2004, Iolascon y Avvissati 2008, Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009*), en nuestro estudio fue la prueba con mayor índice de positividad (93%) con una especificidad del 94%.

Uno de nuestros objetivos al comenzar a evaluar nuevas técnicas diagnósticas era establecer si algunas de ellas, asociadas o no a las tradicionales, podían simplificar la metodología de estudio alcanzando a la vez mayor sensibilidad y especificidad. En un estudio anterior habíamos comunicado que alguna de las dos pruebas nuevas (CH y 5'EMA-CF) era positiva en el 93,5% de los pacientes con ESH (*Crisp et al 2011*). Esta observación se corresponde con la opinión de Bolton-Maggs y colaboradores, que recomiendan a ambas como las pruebas diagnósticas más útiles (*Bolton-Maggs et al 2004*). Con la incorporación de la FOE-CF a esta asociación se logró que en el 100% de los casos al menos una prueba fuera positiva. Se observó además que con esta triple asociación se pudieron cumplimentar los criterios diagnósticos que propusimos para ESH –2 pruebas positivas– en el 95,9% de estos pacientes. Estas tres pruebas son de realización sencilla y además permiten alcanzar resultados en el mismo día de la extracción. Pueden realizarse tanto con sangre venosa como capilar (*Crisp et al 2012, 2010a, 2010b, 2013*) por lo que requieren un volumen de muestra muy pequeño, facilitando un diagnóstico precoz en neonatos y lactantes pequeños. En nuestro país no se han comunicado hasta la fecha otras experiencias con el uso de estas tres pruebas. A la luz de estos resultados, consideramos que con la realización rutinaria en forma simultánea de CH, 5'EMA-CF y FOE-CF se puede llegar al diagnóstico de ESH, sin necesidad de realizar las tradicionales pruebas de FOE y AH. Solo en el 4% de los casos se requerirá de la realización de pruebas adicionales para arribar al diagnóstico. En aquellos casos en que hubo coexistencia de patologías (ESH y talasemia o hepatopatías) la CH arrojó resultado positivo y el estudio de membranas permitió asegurar el diagnóstico.

La SDS-PAGE es una técnica laboriosa que permitió demostrar cuál era la proteína de membrana deficiente en poco más del 70% de nuestros pacientes, porcentaje coincidente con el informado por la mayoría de los autores (*Lee et al 2000, Yawata et al 2000, Miraglia del Giudice et al 2001, Sánchez-López et al 2003*). Su presunta utilidad como marcador de severidad según cuál sea la

deficiencia encontrada, no pudo ser confirmada en nuestro estudio, y es actualmente motivo de controversia (*Agre et al 1986, Jarolim et al 1996, Nakanishi et al 2001, Mariani et al 2008*). Además se postula que el desbalance en el contenido de proteínas de membrana y el citoesqueleto refleja la severidad de la anemia (*Rocha et al 2005*), pero no hemos podido confirmarlo en este estudio como tampoco lo han confirmado otros investigadores (*Mariani et al 2008*). Por lo tanto, coincidimos con la mayoría de los autores en que no debe utilizarse como prueba de rutina para el diagnóstico de ESH (*Bolton-Maggs et al 2004, Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009*). En este estudio se pudieron establecer, por primera vez, las deficiencias de las proteínas de membrana que caracterizan a los pacientes con ESH en nuestro país. Las deficiencias más frecuentemente encontradas corresponden a espectrina y ankirina (*Crisp et al 2011*) y son coincidente con lo informado en otras poblaciones hispanoamericanas (*Saad et al 1994, Ricard et al 2000, Sánchez-López et al 2003*). Sin embargo, difieren de aquéllos que reportan la deficiencia de Banda 3 como la más prevalente (*Cynober et al 1996, Yawata et al 2000, Rocha et al 2005, Mariani et al 2008*). Es inusual la alta prevalencia de deficiencia de proteína 4.1 encontrada en nuestra población. Este hallazgo es controvertido ya que la deficiencia de esta proteína se asocia generalmente con la Eliptocitosis Congénita. Cabe mencionar que los frotis de los pacientes presentaban esferocitos, no observándose eliptocitos en ninguno de los casos. Además –a excepción de los portadores sanos– presentaban más de dos pruebas positivas para el diagnóstico de ESH. La proteína 4.1 está involucrada en la estructura del citoesqueleto y también en la unión de éste a la membrana pudiendo entonces estar involucrada en la fisiopatología de la Eliptocitosis Congénita y la Esferocitosis Hereditaria. La inusual prevalencia de deficiencia de proteína 4.1 en nuestros pacientes y la de proteína 4.2 en las poblaciones coreana y japonesa (*Yawata 1994, Lee et al 2000*) podrían responder a factores étnicos.

CAPITULO VI: La fiebre en las ESH

El diagnóstico de ESH se establece generalmente en la infancia o en adultos jóvenes, pero excepcionalmente puede diagnosticarse entre la séptima y novena década. La enfermedad puede ser asintomática y diagnosticarse incidentalmente ante episodios hemolíticos inducidos por fiebre, ejercicios físicos fuertes o embarazo *(Kreuger y Burgart 1966, Taylor 1973, Moore et al 1976, Do 1984)*. Los niños con ESH, especialmente los menores a 6 años de edad, presentan frecuentes crisis hemolíticas asociadas a infecciones virales *(Taylor 1973, Tissieres et al 2000, Grace y Lux 2009, Ballin et al 2011).*

El 67% de los pacientes en seguimiento –a los cuales se le ha realizado el diagnóstico bajo la presente tesis– presentan descensos significativos del hematocrito durante el desarrollo de procesos febriles (ver Anexo). La práctica clínica habitual sugiere que el estado febril representa una situación de riesgo para los pacientes y afecta la sobrevida eritrocitaria.

La apoptosis es un mecanismo de autodestrucción controlada que permite la eliminación celular mediante el sistema macrofágico. Los progenitores eritropoyéticos son suceptibles a la apoptosis dado que poseen núcleo. Los eritrocitos maduros, carentes de organelas y núcleo pueden desarrollar una muerte programada denominada eriptosis *(Lang et al 2005)*. La apoptosis y la eriptosis presentan algunas características en común, por ejemplo la contracción celular y la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática *(Daugas et al 2001, Bosman et al 2005, Lang et al 2005)*. El proceso de destrucción prematura de los eritrocitos puede ser acelerado por diferentes factores, como por ejemplo estrés oxidativo, shock osmótico, depleción energética celular o la presencia de metales tóxicos –entre otros factores– *(Bratosin et al 2001, Lang et al 2004, Vota et al 2012)*.

Hipótesis

En base a estas observaciones se postuló evaluar si el agravamiento de la anemia por los procesos febriles podría ser debido, al menos en parte, a un efecto directo de la temperatura sobre los esferocitos.

Con este objetivo se expusieron eritrocitos de pacientes con ESH y de controles sanos durante 24 h a 36,5 °C y 38,5 °C simulando la temperatura corporal y el estado febril respectivamente. Se determinó el desarrollo de eriptosis y los posibles mecanismos involucrados.

Eriptosis

Luego de la incubación de los eritrocitos a las temperaturas que mimetizaban la fisiológica (36,5 °C) y la de procesos febriles (38,5 °C), las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para detectar signos de eriptosis. Una alteración característica de la eriptosis es el encogimiento celular. Se definió como células eriptóticas a aquéllas que presentaban muy bajo tamaño (evaluado en el detector FSC). En la figura VI-1 se muestran los gráficos de un experimento tipo. El análisis de los datos obtenidos en 9 controles normales y 9 pacientes permite establecer que en los controles normales no se observan cambios significativos por incremento de la temperatura. Los pacientes presentan mayor porcentaje de células eriptóticas que los controles a ambas temperaturas y el porcentaje de células eriptóticas aumenta significativamente con el incremento de la temperatura (figura VI-2).

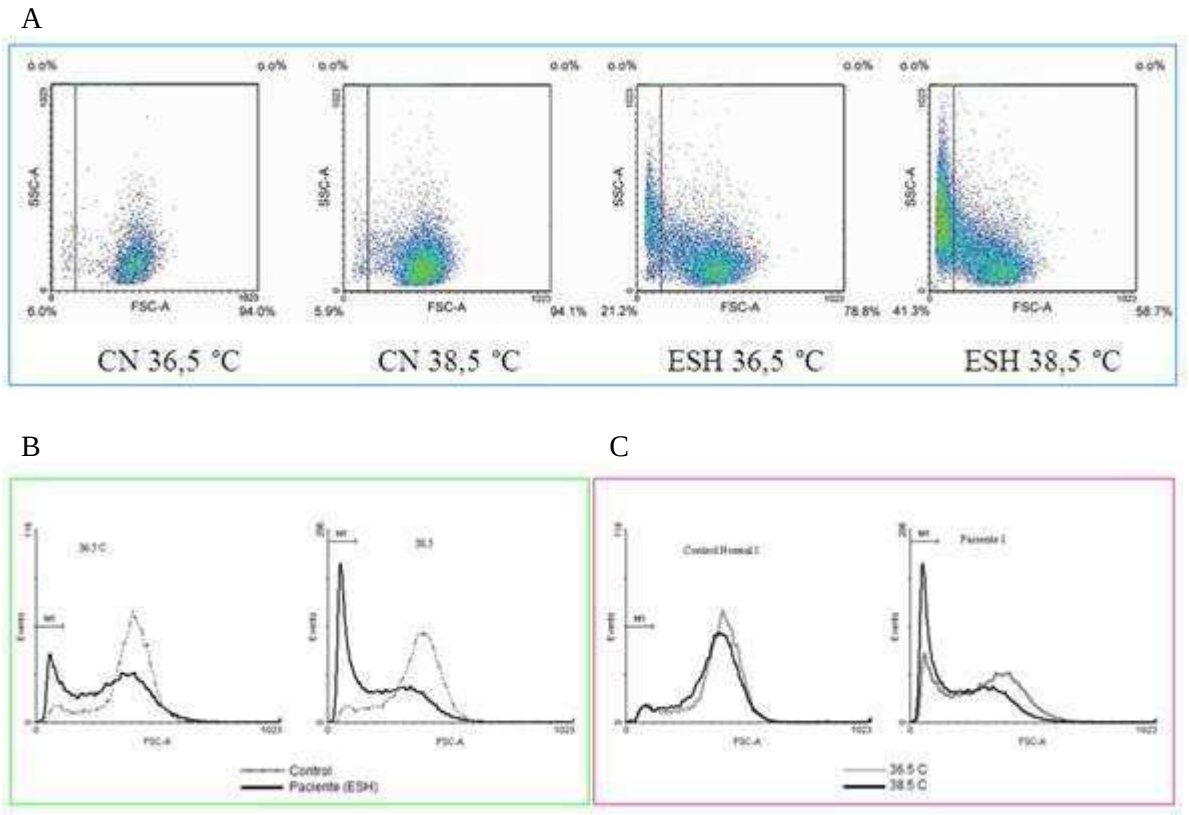
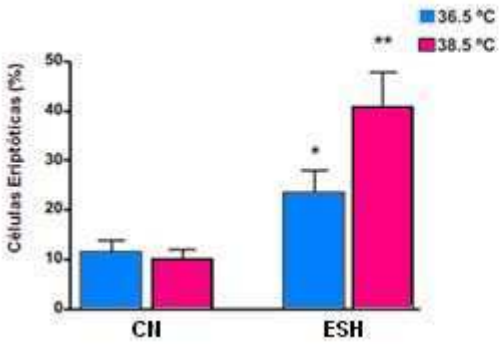


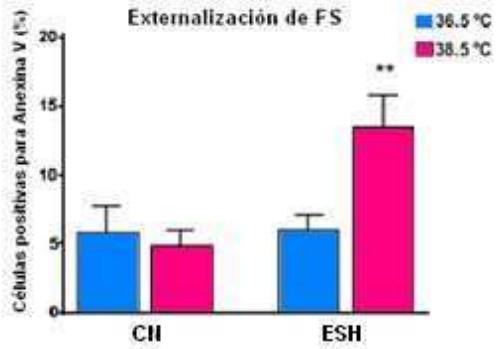
Figura VI-1: Evaluación de eriptosis mediante el encogimiento celular. Las muestras fueron evaluadas luego de ser incubadas durante 24 h a las temperaturas indicadas. A) dot-plot SSC vs FSC de un control normal y un paciente a las diferentes temperaturas de incubación. B) Histogramas superpuestos del control normal y el paciente para cada temperatura. C) Histogramas superpuestos para CN y paciente para evaluar el efecto de la temperatura. La zona M1 define las células eriptóticas.



% de células eriptóticas			
Temp °C	Controles Normales	Pacientes	Sig CN vs ESH
36,5	11,5 ± 2,2	23,3 ± 4,4	P <0,05
38,5	10,0 ± 1,8	40,4 ± 7,0	P <0,01
Sig ΔTemp	NS	P< 0,01	N=9

Figura VI-2: Porcentaje de células eriptóticas (Media ± SEM) evaluadas en 9 controles normales y 9 pacientes con diagnóstico de ESH. El análisis estadístico para evaluar el efecto de la temperatura en cada grupo se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. El análisis entre los grupos (CN vs ESH) para cada temperatura se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

La exposición de fosfatidilserina (FS) es considerada una característica específica de la eriptosis. Su evaluación por citometría de flujo a través de la unión a Anexina V permitió corroborar los resultados anteriores. Consistentemente, el incremento de temperatura produjo un aumento significativo en el porcentaje de eritrocitos con exposición de FS en las muestras de los pacientes pero no en la de los individuos normales (figura VI-3). Se observa un incremento muy significativo en la exposición de FS por el incremento de la temperatura en los pacientes (ESH 36,5 °C vs ESH 38,5 °C). Este efecto no se visualiza en los controles normales (CN 36,5 °C vs CN 38,5 °C). La exposición de FS en los pacientes es significativamente mayor que la de los controles normales cuando la temperatura es elevada (ESH 38,5 °C vs CN 38,5 °C). A la temperatura corporal los grupos no muestran diferencias significativas en cuanto al nivel de exposición de FS (ESH 36,5 °C vs CN 36,5 °C).



Exposición de FS (% de células)			
Temp °C	Controles Normales	Pacientes	Sig CN vs ESH
36,5	5,9 ± 2,3	6,0 ± 1,0	NS
38,5	4,9 ± 1,2	13,5 ± 2,2	P <0,05
Sig ΔTemp	NS	P< 0,01	N=9

Figura VI-3: Porcentaje de células eriptóticas (Media ± SEM) evaluadas mediante la exposición de fosfatidilserina. El análisis estadístico para evaluar el efecto de la temperatura en cada grupo se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. El análisis entre los grupos (CN vs ESH) para cada temperatura se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

Mecanismos de eriptosis

La eriptosis caracterizada por la exposición de PS puede ser producida, entre otros casos, por compuestos oxidantes generados durante procesos de estrés oxidativo o mediante el influjo de calcio en los eritrocitos *(Lang et al 2005, Vota et al 2013)*.

Estrés oxidativo

El mecanismo de estrés oxidativo se evaluó mediante la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el contenido eritrocitario de glutatión reducido (GSH). El mayor nivel de ROS y bajo contenido de GSH sugiere un mayor nivel de estrés oxidativo en los eritrocitos de los pacientes respecto de los controles normales. Sin embargo, no muestran diferencias significativas en condiciones basales. Tampoco se observan variaciones significativas intra e inter grupos por efecto de la temperatura (figura VI-4).

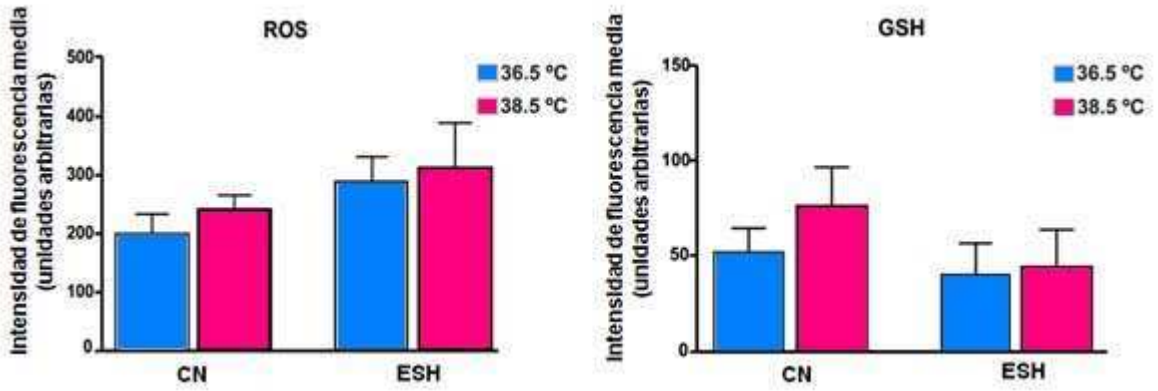


Figura VI-4: Evaluación del nivel de estrés oxidativo de los eritrocitos de controles normales (CN) y pacientes (ESH). Los niveles de ROS y GSH fueron determinados por citometría de flujo. No se detectan diferencias significativas entre grupos en condiciones basales ni inter grupo por efecto de la temperatura (N=6, p>0,05). Los valores se expresan como (Media ± SEM). El análisis estadístico para evaluar el efecto de la temperatura en cada grupo se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. El análisis entre los grupos (CN vs ESH) para cada temperatura se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

Influjo de calcio

El encogimiento celular y la subsecuente exposición de FS en la membrana eritrocitaria pueden ser desencadenados por el incremento de calcio intracelular. Se evaluó el contenido de calcio en pacientes y controles normales a ambas temperaturas de incubación. Se comprobó que el incremento de la temperatura en los eritrocitos de los pacientes produce un aumento significativo del calcio intracelular pero no se modifica sustancialmente en los normales (figura VI-5).

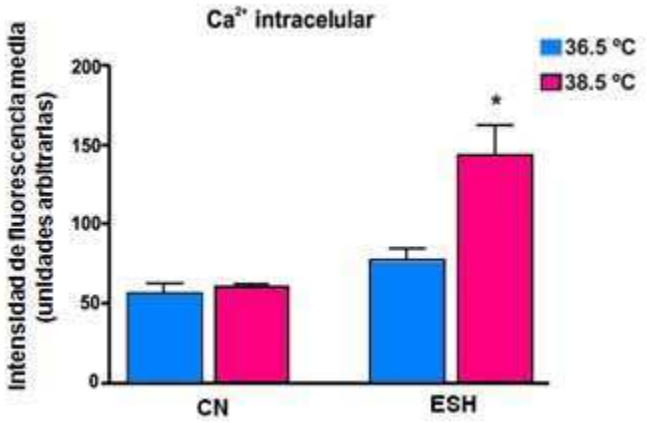


Figura VI-5: Evaluación del calcio intracelular de los eritrocitos de controles normales (CN) y pacientes (ESH). Para las mediciones se utilizó citometría de flujo con Fluo-4AM. Se observan diferencias significativas por el incremento de temperatura en los eritrocitos de los pacientes respecto de los controles normales y de los eritrocitos de pacientes expuestos a temperatura corporal ($P < 0,05$, N=9). Los valores se expresan como (Media ± SEM). El análisis estadístico para evaluar el efecto de la temperatura en cada grupo se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. El análisis entre los grupos (CN vs ESH) para cada temperatura se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

De acuerdo a estos resultados, la eriptosis generada por hipertermia pareciera estar más vinculada al incremento en el calcio intracelular (figura VI-5) que a los efectos del estrés oxidativo (figura VI-4). Si el gran influjo de calcio generado durante la hipertermia fuera causante de la eriptosis, el proceso debiera prevenirse incubando las células en un medio libre de calcio. Para comprobarlo se realizó el ensayo en otro grupo de pacientes y controles. Se observó que el secuestro de calcio en el medio extracelular disminuye significativamente la eriptosis en los eritrocitos de los pacientes generada por el incremento de la temperatura (figura VI-6).

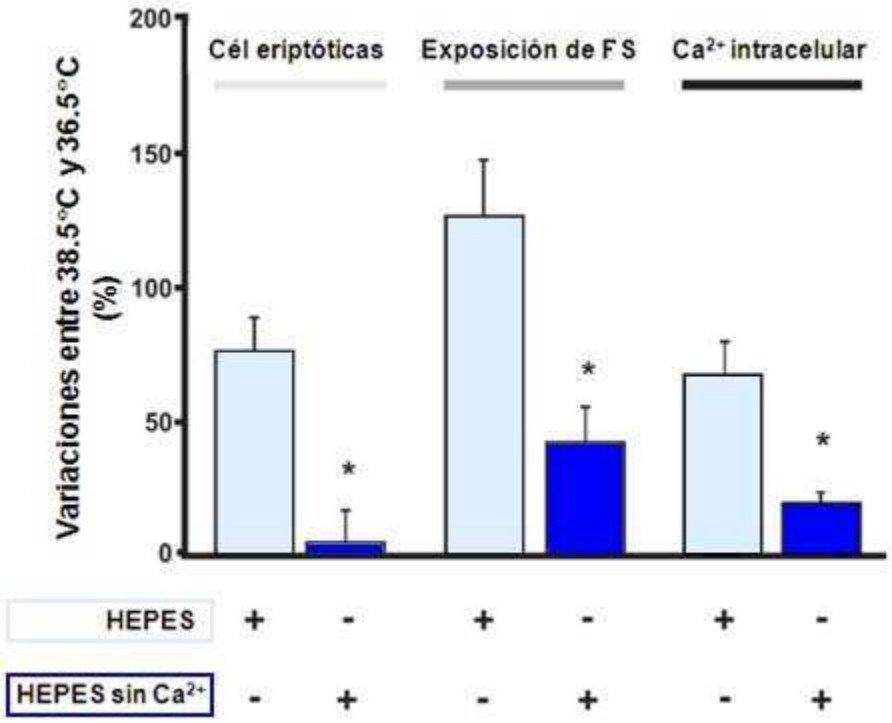


Figura VI-6: Rol del calcio en los eritrocitos de pacientes ESH por el efecto de la temperatura. Los eritrocitos fueron expuestos a ambas temperaturas suspendidos en el medio de incubación con disponibilidad de calcio extracelular (*buffer* Hepes con calcio) o sin calcio extracelular disponible (*buffer* Hepes sin calcio y con EGTA). Se evaluó el porcentaje de células eriptóticas, la exposición de FS y el contenido de calcio intracelular. El menor influjo de calcio al medio intracelular redujo significativamente la generación de células eriptóticas y la exposición de fosfatidilserina en los pacientes ($P<0,05$; N=6). El porcentaje de variación se calcula como %Var = [(Medida 38,5 – Medida 36,5) / Medida 36,5] x 100. Los resultados se expresan como (Media ± SEM).

Discusión

Los pacientes con diagnóstico de ESH presentan frecuentemente un agravamiento de su anemia durante los procesos febriles. Ha sido establecida la influencia de las citoquinas en el desarrollo de la anemia asociada a los procesos inflamatorios secundarios a procesos infecciosos *(Poveda Gómez et al 2001)*. En los pacientes ESH el incremento de la hemólisis se observa dentro de las 48 horas de iniciada la fiebre. Por este motivo, si bien las citoquinas pueden desempeñar algún rol es poco probable que constituyan el mecanismo principal del agravamiento de la anemia durante el episodio febril. En base a este razonamiento se decidió estudiar si el incremento de la temperatura podía tener un efecto directo sobre los esferocitos. El estudio se realizó a dos temperaturas: una que mimetizó la temperatura corporal (36,5 °C) y la otra que representó el estado febril (38,5 °C).

En este estudio no se observó translocación de FS en los eritrocitos de los pacientes incubados a temperatura fisiológica. Este resultado es coincidente con lo hallado por Boas y colaboradores quienes sugieren que la exposición de FS no constituye la causa de la remoción de los eritrocitos en las anemias hemolíticas, con la posible excepción de aquellas debidas a la presencia de hemoglobinas inestables o Hb S *(Boas et al 1998)*. Sin embargo, el presente estudio muestra que la incubación *in vitro* a 38,5 °C de los eritrocitos de pacientes induce un significativo incremento de la eriptosis, caracterizada por el encogimiento celular y la exposición de FS. Este resultado sugiere que la hipertermia produce un daño celular directo y que los esferocitos de la ESH son más sensibles al incremento de temperatura, mientras que este incremento de la temperatura no tuvo consecuencias significativas en los controles normales. Este resultado no concuerda con el publicado en un estudio reciente *(Föller et al 2012)* que describe que los eritrocitos normales muestran un significativo encogimiento celular –evaluado mediante citometría de flujo por disminución del FSC– cuando son expuestos a alta temperatura. Sin embargo en dicho trabajo las diferencias significativas se alcanzan empleando un incremento térmico extremo (37 °C vs 41 °C).

Algunos procesos fisiológicos, como la síntesis de prostaglandinas, el envejecimiento celular y la fagocitosis, están asociados con mecanismos oxidativos *(Burak Cimen 2008)*. El estado oxidativo en el eritrocito está determinado por el balance entre los agentes oxidantes, como ROS y los compuestos antioxidantes como GSH. En varias anemias hemolíticas congénitas y adquiridas ha sido demostrado un alto nivel de estrés oxidativo *(Amer et al 2004, Rachmilewitz et al 2005, Amer et al 2006, Fibach y Rachmilewitz 2008)*. Es más, la administración de sustancias antioxidantes contribuye a disminuir la hemólisis *in vitro* e *in vivo* en pacientes con ESH *(Ghoti et al 2011)*. En situaciones patológicas, como en los procesos inflamatorios, se observa una producción exacerbada de ROS *(Chan et al 1999)*. Por este motivo se investigó si un mecanismo involucrado en las crisis hemolíticas secundarias a procesos febriles podría ser el daño oxidativo. Los cambios en el contenido de ROS y GSH fueron pequeños y no hubo significación estadística.

Es sabido que la sobrecarga de calcio intracelular genera alteraciones en el eritrocito *(Bratosin et al 2001, Lang et al 2004, Bosman et al 2005, Vota et al 2013)*. Como ya fue mencionado, Föller y colaboradores encontraron que los eritrocitos normales sometidos a un cambio de temperatura extremo (37 °C vs 41 °C) desarrollaban eriptosis y este proceso era acompañado por un aumento del calcio intracelular que resulta significativo a partir de la exposición de los eritrocitos a 39 °C. Coherentemente, los resultados expuestos en el presente trabajo no detectan incrementos significativos en el contenido de calcio intracelular para los eritrocitos normales ya que se los expuso a una temperatura máxima de 38,5 °C. Sin embargo el influjo de calcio resultó ser

significativo en los pacientes. El contenido intracelular de calcio en eritrocitos de pacientes y controles normales no mostró diferencias significativas en condiciones similares a las fisiológicas (36,5 °C).

Con el objetivo de confirmar que el influjo de calcio influye en el proceso eriptótico observado por la hipertermia, se expusieron los eritrocitos normales y patológicos a ambas temperaturas, corporal fisiológica y la del estado febril, en un medio en el cual pudieran incorporar calcio y en otro privado de calcio extracelular. Se observó que el desarrollo de células eriptóticas y la exposición de FS en los eritrocitos de los pacientes sometidos a hipertermia eran significativamente menores cuando no se disponía de calcio extracelular. Esto sugiere que la eriptosis generada por la hipertermia es un proceso que requiere la entrada de calcio a las células.

Para explicar el efecto de la temperatura sobre los eritrocitos normales, Föller y colaboradores propusieron que el mecanismo implicado se caracteriza por la estimulación del canal de Gardos produciendo pérdida de K^+ y agua y generando en consecuencia la contracción de las células. En modelos animales de ESH se ha comprobado una mayor sensibilidad a la activación del canal Gardos mediada por calcio *(Franceschi et al 2005)*, de manera que el incremento de calcio intracelular mediado por el aumento de la temperatura podría explicar el desarrollo de las crisis hemolíticas observadas en los pacientes.

Otros mecanismos pueden ser responsables de la translocación de FS inducida por la sobrecarga de calcio celular. Se sabe que, en condiciones fisiológicas, la calpaína es activada por Ca^{2+} en los eritrocitos humanos *(Michetti et al 1997)*. Se ha demostrado que en la eriptosis se produce la fosforilación y desfosforilación de proteínas con externalización de FS. Vota y colaboradores estudiaron los mecanismos involucrados en el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes de forma comparativa con la generada por la entrada masiva de calcio a la célula. Observaron que la activación de fosfatasas tendría un rol más relevante en el modelo de entrada masiva de calcio a la célula. En particular, el hallazgo de gran actividad de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) sugirió la participación de la calpaína, proteasa dependiente de calcio, en el mecanismo de eriptosis *(Vota et al 2013)*.

La exposición de FS en la superficie celular puede constituir la señal para el secuestro de los glóbulos rojos circulantes por los macrófagos. Es de esperar que el desarrollo de eriptosis *in vivo*, inducida por la temperatura, provoque una perturbación en el delicado equilibrio entre la producción y la destrucción de eritrocitos. Los eritrocitos pueden entonces convertirse en células anormales, más propensas a ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial. Esto conduciría a la

destrucción prematura de eritrocitos, reduciendo así la supervivencia de los mismos y, por consiguiente, causando anemia.

En conclusión, sobre la base de los presentes resultados, se propone que la hipertermia durante los procesos febriles puede tener un efecto directo sobre los esferocitos, induciendo eriptosis mediada por la entrada de calcio, lo que contribuye al empeoramiento de la anemia en los pacientes ESH o al desarrollo de la misma en individuos no diagnosticados.

CAPITULO VII: Expresión de Acuaporina-1

La AQP-1 es una proteína que se expresa en las membranas celulares. Descripta por Preston y Agre en 1991, es la más ubicua de las acuaporinas *(Preston y Agre 1991)*. Su función principal es constituir un canal de agua (figura VII-1).

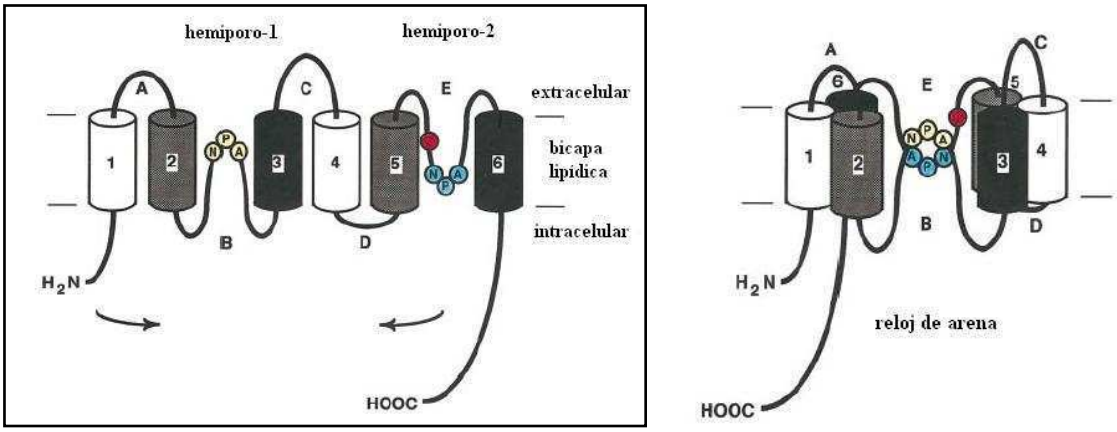


Figura VII-1: Estructura de la AQP-1. Se compone de dos dominios en imagen especular. Seis segmentos de estructura α-hélice (1-6) atraviesan la membrana estando unidos por cinco lazos (A-E). El lazo B (intracelular) y el lazo E (extracelular) se pliegan hacia la membrana para formar el canal. Ambos lazos son portadores del triplete asparragina-prolina-alanina (NPA) característico de todas las acuaporinas. La zona de contacto de los tripletes NPA constituye el sitio más estrecho del poro. La estructura se ensancha hacia ambos lados de la membrana por lo que se la denomina "reloj de arena" por su semejanza con éste. En rojo se destaca el residuo Cys-189 sensible a la inhibición por mercurio. Aunque cada acuaporina forma por sí sola un canal, en la membrana celular se ensambla en grupos de cuatro. El arreglo tetramérico confiere mayor estabilidad de las proteínas en el entorno lipídico. Adaptado de *Agre et al 1998.*

Mediante el pasaje de agua a través de la membrana celular, las acuaporinas permiten un rápido cambio del volumen celular como respuesta a la modificación de la tonicidad del medio externo.

En el eritrocito humano se han descripto dos acuaporinas AQP-1 *(Preston y Agre 1991, Preston et al 1992)* y AQP-3 *(Roudier et al 1998 y 2002)*. Esta última es una acuagliceroproteina que no sólo es permeable al agua sino que también facilita el flujo de glicerol y de urea, sin embargo su importancia en el transporte acuoso e incluso su presencia en el eritrocito es controvertida *(Yang et al 2001)*.

Durante la eritropoyesis la membrana eritrocitaria es extensamente remodelada. Se han descripto dos niveles importantes que regulan la expresión de las proteínas de la membrana: uno durante el

proceso de enucleación del eritroblasto acidófilo y posteriormente, durante la remodelación de la membrana del reticulocito que conduce a la obtención del eritrocito maduro.

Durante la enucleación del eritroblasto las proteínas de la membrana plasmática y del citoesqueleto se reorganizan dinámicamente mientras el núcleo, rodeado de membrana plasmática, se separa generando un nuevo reticulocito. La partición de las proteínas de membrana entre el núcleo extruido y/o el reticulocito naciente no es equitativa *(Koury et al 1989, Bell et al 2013)* y uno de los mecanismos que regula la partición es el grado de conectividad de las proteínas al citoesqueleto *(Salomao et al 2010)*. Esto sugiere que en la ESH no sólo la pérdida continua de la membrana del eritrocito maduro justificaría el hallazgo de la deficiencia de más de una proteína de membrana sino que deficiencias múltiples podrían estar establecidas desde la concepción del reticulocito.

Blanc y colaboradores *(2009)* han demostrado que en reticulocitos jóvenes obtenidos de ratones, la AQP-1 se encuentra expresada en la membrana plasmática y en el compartimiento endosomal, mientras que en el eritrocito maduro (que carece de compartimientos intracelulares) queda expresada sólo en la membrana plasmática. Los estudios *in vitro* mostraron que en condiciones hipertónicas se bloquea la liberación de AQP-1 en los exosomas del reticulocito, incrementándose su expresión en la membrana eritrocitaria. Postulan que mecanismos de ubiquitinación o fosforilación determinarían la incorporación del pool de AQP-1 en la membrana o su liberación al plasma por vía exosomal (figura VII-2). Los mecanismos mencionados y la modificación de la expresión de AQP-1 mediante ubiquitinación fueron demostrados en trabajos previos de otros autores *(Hershko et al 1979, Leitch et al 2001)*. El estudio de Blanc y colaboradores demuestra que la tonicidad del medio influye en la remodelación de la membrana del reticulocito determinando la expresión de AQP-1 en la membrana eritrocitaria. La remodelación de la membrana producida durante la maduración del reticulocito es de fundamental importancia ya que conduce a la modificación de sus propiedades reológicas y morfológicas *(Liu et al 2010)*.

En base a lo expuesto podemos establecer que:

a) Alteraciones en el anclaje de proteínas de la membrana pueden generar deficiencias de proteínas en el eritrocito maduro.
b) La AQP-1 está involucrada en los rápidos cambios del volumen celular ya que su rol principal es constituir un canal de agua.
c) Durante la maduración del reticulocito, se modifica el nivel de expresión de AQP-1 de acuerdo a la osmolaridad externa.

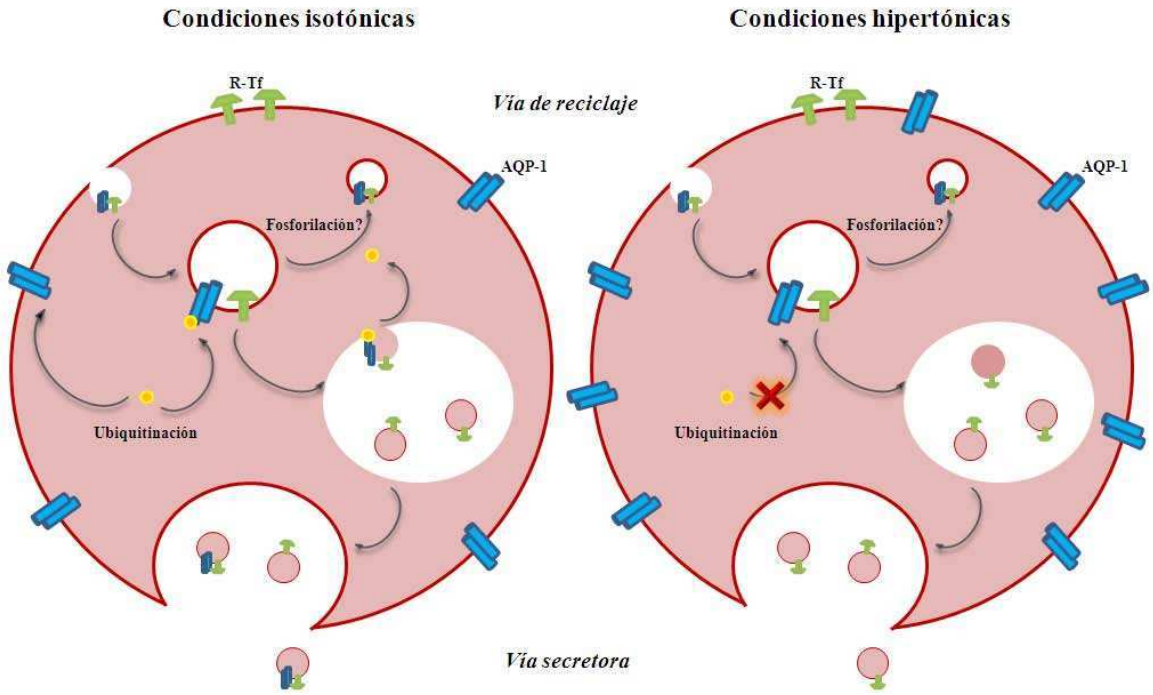


Figura VII-2: Modelo propuesto por Blanc y colaboradores para la regulación de la expresión de AQP-1 durante la maduración de los reticulocitos. En condiciones fisiológicas (medio isotónico) los niveles de AQP-1 son regulados a través de la vía exosomal. En condiciones de estrés osmótico la secreción de AQP-1 está inhibida probablemente por regulación de su ubiquitinación o de su fosforilación. Debido a ello se redirecciona de la vía secretora a la via de reciclaje aumentando la expresión de AQP-1 en la membrana, ayudando así a la célula a contrarrestar el choque osmótico. Por el contrario, el tráfico del receptor de transferrina (R-Tf) no se ve afectado por la perturbación osmótica y continúa siendo distribuido y secretado por la vía exosomal. Adaptado de *Blanc et al 2009*.

El esferocito presenta un comportamiento osmótico diferente del eritrocito normal. Las pruebas diagnósticas de Fragilidad Osmótica y Criohemólisis ponen de manifiesto esas diferencias. En ambas pruebas, el pasaje de agua a través de la membrana –en uno u otro sentido– constituye el mecanismo prevalente. Es posible entonces que el eritrocito normal y el esferocito muestren un nivel de expresión diferente de AQP-1, teniendo en cuenta que éste último presenta disminución de alguna de las proteínas de membrana, pudiendo influir en el anclaje de otras.

Participación de AQP-1 en las pruebas de FOE y CH

Los resultados de las pruebas diagnósticas que involucran el pasaje de agua a través de la membrana eritrocitaria debieran verse afectadas si se realizan en presencia de inhibidores de AQP-1. Además, si el nivel de su expresión fuera diferente en controles normales y pacientes se puede esperar un efecto desigual. Ha sido profundamente estudiado el efecto inhibidor que ejercen determinadas moléculas y iones sobre el transporte de agua mediada por AQP-1 *(Yang et al 2006)*.

Para evaluar la presencia de AQP-1 y su posible influencia en la etiología de la enfermedad, se realizaron las curvas FOE y la criohemólisis (CH) en presencia de inhibidores de AQP-1: Hg^{2+} y Cu^{2+}. Las concentraciones utilizadas en los ensayos son las descriptas para inhibir la AQP-1 de acuerdo a lo establecido en la literatura: una concentración mayor a 50 μM de Hg^{2+} podría interferir en los canales iónicos y una concentración menor a 10 μM no logra inhibir la AQP-1 aunque genera características asociadas a eriptosis *(Eisele et al 2006)*.

Curvas de Fragilidad Osmótica Eritrocitaria

Muestras de sangre heparinizada fueron incubadas durante 3,5 h con distintas concentraciones finales de $HgCl_2$. Finalizado el tiempo de incubación se efectuaron las curvas FOE en la forma tradicional. El proceso de lisis en medios hipotónicos no se ve alterado por la inhibición de la AQP en todo el rango de concentración de inhibidores utilizada (figura VII-3). La observación de los frotis efectuados luego de finalizada la preincubación con $HgCl_2$ no mostraron alteraciones en la morfología eritrocitaria. Tampoco arrojó diferencias el análisis por citometria de flujo en cuanto a tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de los eritrocitos suspendidos (figura VII-4). La cinética del proceso evaluada entre 0 a 15 min muestra el mismo porcentaje de lisis en presencia y ausencia de inhibidores (figura VII-5).

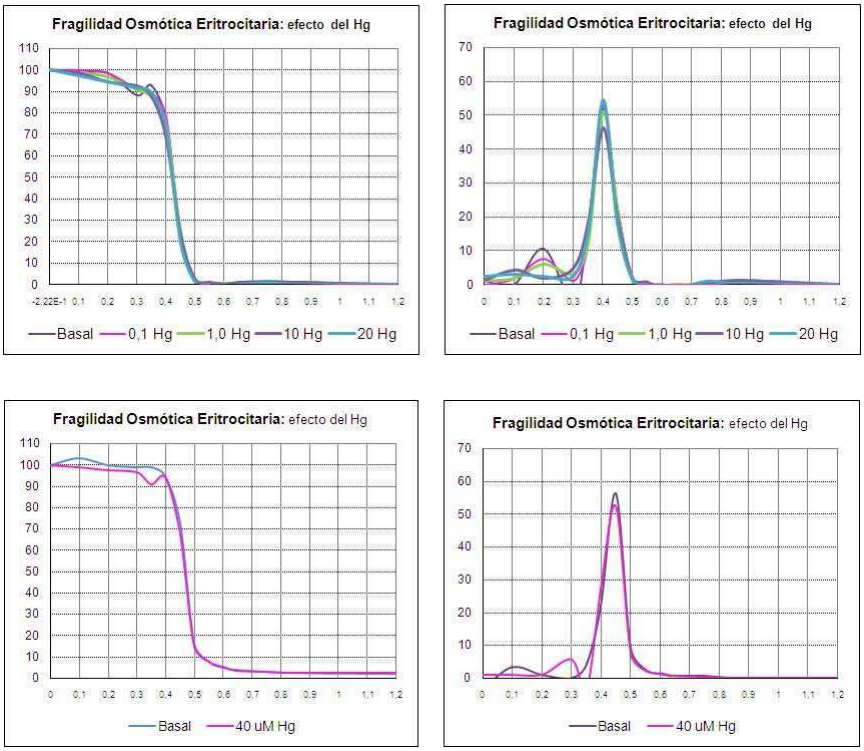


Figura VII-3: Curvas de fragilidad osmótica eritrocitaria realizadas con muestra de sangre heparinizadas preincubadas con $HgCl_2$ en diferentes concentraciones finales. No se observan efectos inhibitorios de la hemólisis.

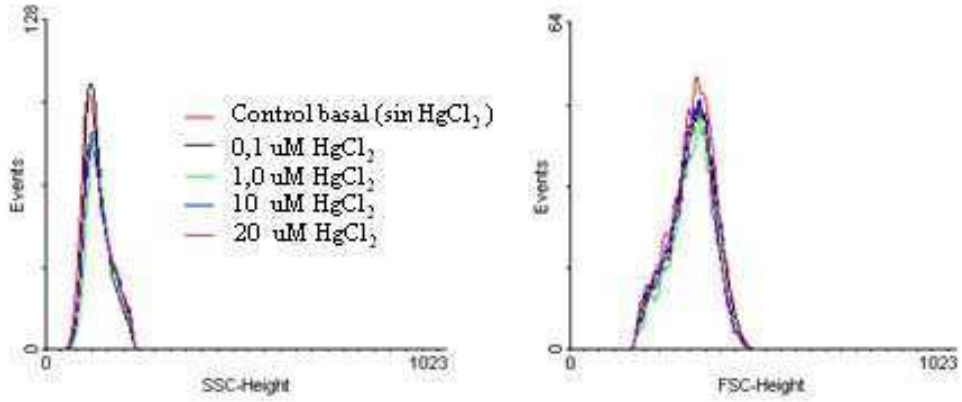


Figura VII-4: Complejidad y tamaño de los eritrocitos preincubados con $HgCl_2$ en diferentes concentraciones finales. No se observan efectos en los parámetros evaluados.

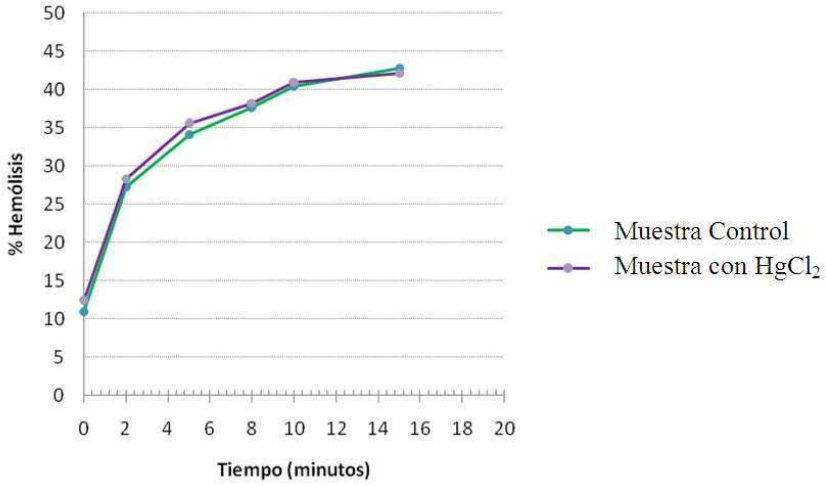


Figura VII-5: Cinética del proceso hemolítico. Eritrocitos controles y preincubados con $HgCl_2$ fueron suspendidos en una solución 0,40% de NaCl (tubo 8 de las curvas FOE) determinándose el porcentaje de hemólisis inicial y a los 2, 5, 8, 10 y 15 min. No se observa diferencia en la cinética de la hemólisis con la presencia del inhibidor de AQP-1.

La prueba FOE se desarrolla a temperatura ambiente de manera que el ingreso de agua al eritrocito podría realizarse por difusión través de la capa lipídica, enmascarando el pasaje de agua por AQP-1. Para evaluar este efecto se realizó el procedimiento a 0 °C. Nuevamente no se encontraron diferencias cuando el inhibidor se hallaba presente y el transporte difusional estaría minimizado por efectos de la baja temperatura (figura VII-6).

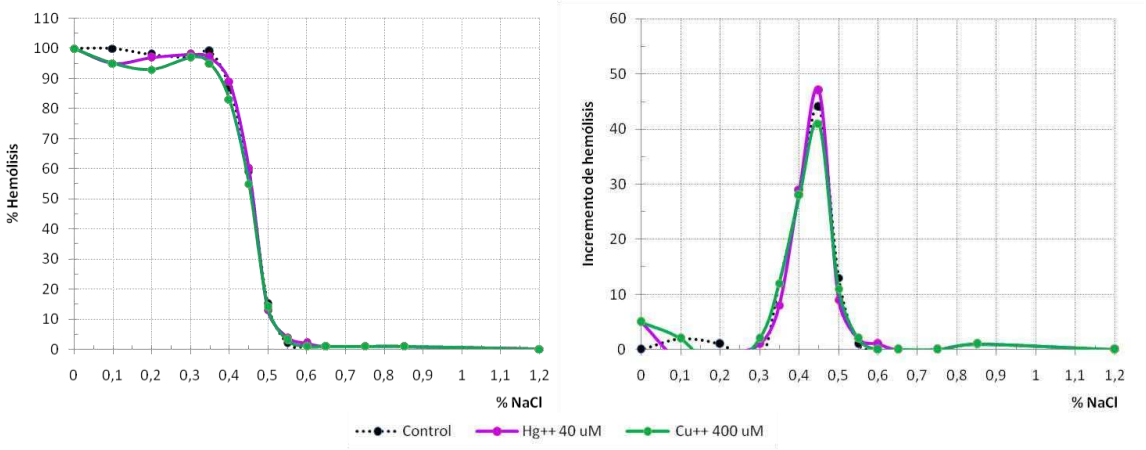


Figura VII-6: Curvas FOE. La muestra fue preincubada a temperatura ambiente con los inhibidores de AQP-1. La curvas FOE fueron realizadas manteniendo las soluciones salinas a 0 °C para minimizar el transporte de agua por difusión. No se observa efecto por la presencia de los inhibidores.

Podemos concluir que el proceso de lisis en medios hipotónicos no se ve alterado por la inhibición de la AQP-1 en todo el rango de concentración de inhibidores utilizada. Tampoco se ve alterada la cinética del proceso evaluada entre 0 a 15 min por presencia de inhibidores. Realizando el proceso a bajas temperaturas para evitar la difusión de agua a través de la capa lipídica nuevamente no se encontraron diferencias cuando el inhibidor se hallaba presente. Mathai y colaboradores demostraron que otros mecanismos, adicionales a la AQP-1 y la difusión, intervienen en la introducción de agua en los eritrocitos y sugieren al transportador de glucosa glut-1 como responsable *(Mathai et al 1996)*.

Los ensayos efectuados en medios hipotónicos no permitieron inferir una expresión diferente de AQP-1 en el esferocito debido a que el ingreso de agua se realizaría por varias vías simultáneas.

Criohemólisis

En los ensayos de criohemólisis, las células se suspenden en un medio hipertónico de manera que se produce deshidratación del eritrocito.

Los ensayos en muestras de controles normales y pacientes con ESH se llevaron a cabo utilizando una concentración final de $HgCl_2$ 40 μM. Esta concentración mostró un máximo efecto en la curva dosis-respuesta (figura VII-7)

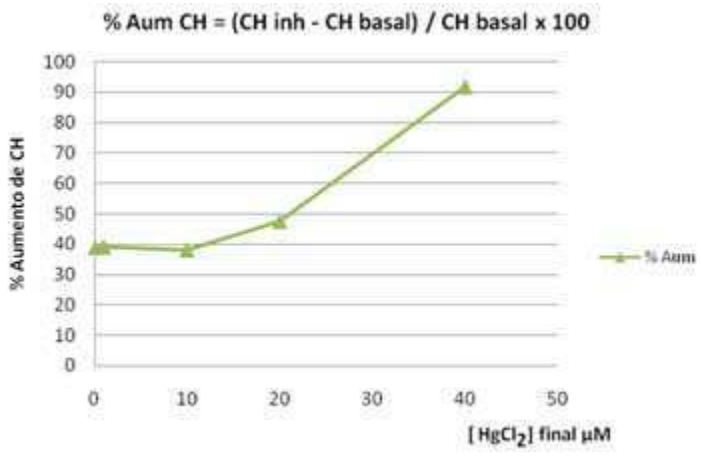


Figura VII-7: efecto de la presencia de inhibidor de AQP-1 en la criohemólisis de eritrocitos normales. Concentraciones mayores a 50 μM podrían alterar el transporte de cationes.

Las muestras expuestas a los inhibidores de AQP-1 mostraron mayor criohemólisis, siendo este efecto más pronunciado en los controles normales que en los pacientes (figura VII-8).

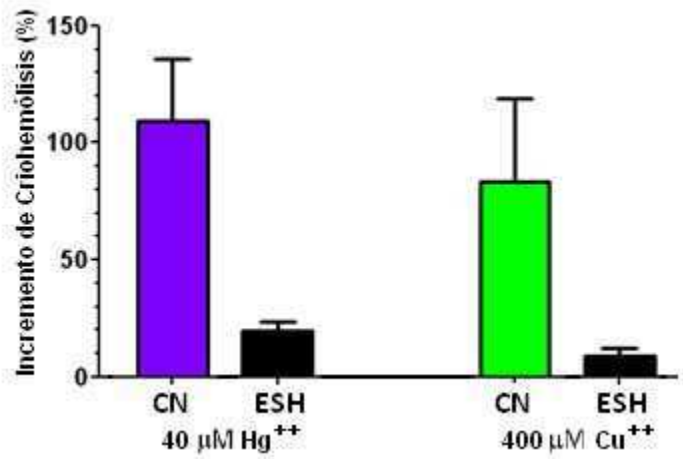


Figura VII-8: efecto de la presencia de inhibidor de AQP-1 en la criohemólisis de eritrocitos normales y pacientes con ESH. El incremento de la criohemólisis en los controles es significativamente mayor que en los pacientes (CN=8, ESH=9, $P < 0,05$).

El eritrocito normal es sumamente plástico y la deshidratación paulatina en un medio hipertónico es acompañada por los cambios en su forma y volumen. Con el bloqueo de los canales AQP-1 se impide la salida de agua, lo que generaría en el eritrocito una depleción más profunda del K^+ intracelular y consecuentemente un incremento significativo de la lisis. En el ensayo de criohemólisis el defecto en las proteínas de membrana genera la falta de plasticidad de los eritrocitos de los pacientes y es responsable de la gran lisis que sufren en el medio hipertónico. El menor efecto registrado con la inhibición de la AQP-1 en los pacientes puede deberse a que el proceso de deshidratación no constituye el mecanismo principal de la criohemólisis. Sin embargo, no puede descartarse la hipótesis de una expresión menor de AQP-1 en el esferocito la cual sería responsable de registrar un menor efecto con su inhibición.

Expresión de AQP -1

Inicialmente se planteó la hipótesis de que los esferocitos podrían presentar en su membrana un contenido diferente de AQP-1. Los ensayos de inhibición en medios hipotónicos no permitieron corroborarlo. Sin embargo, la inhibición en medios hipertónicos podría ser consistente con una disminución de la expresión de los canales de agua en el esferocito respecto de los eritrocitos normales.

Se determinó la expresión de AQP-1 en 6 controles normales (CN), 10 pacientes con ESH (2 leves, 3 moderadas, 2 severas, 3 esplenectomizados), 1 con anemia hemolítica autoinmune (AHAI) y 3 portadores sanos (PS). Las ESH y los PS presentaban deficiencias aisladas y/o combinadas de ankirina, espectrina, proteína 4.1 y proteína 4.2 (tabla VII-1). En el frotis de la AHAI se observó marcada presencia de esferocitos, sin embargo la formación de los mismos responden a una etiología diferente de la ESH. Este control se incorpora con la finalidad de corroborar que los hallazgos se relacionan a la patología en estudio.

Severidad	Proteína deficiente	Edad	Pruebas alteradas
PS	4.1	14 a	Ninguna
PS	4.1; 4.2	48 a	Ninguna
PS	4.1; Sp	35 a	Ninguna
Leve	4.2	32 a	CF
Leve	NR	26 a	CF-CH-AH-FOE
Moderada	NR	18 a	CF-CH-AH-FOE
Moderada	NR	3 m	CF-CH
Moderada	NR	18 m	CF-CH
Severa	NR	8 m	CF
Severa	NR	5 m	CF-CH-AH-FOE
EPT	Ank	11 a	CF-CH-AH-FOE
EPT	4.1; 4.2	37 a	CF-CH-AH-FOE
EPT	Sp; 4.1	37 a	CF-CH-AH-FOE

Tabla VII-1: descripción de los pacientes evaluados para la expresión de AQP1. PS: portador sano; EPT: esplenectomizado; Sp: espectrina; Ank: ankirina; NR: no realizado; CF: citometría de flujo con 5'EMA; CH: criohemólisis; AH: autohemólisis; FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria.

La expresión de AQP-1 resultó disminuída en todos los pacientes con ESH respecto de un control normal procesado simultáneamente. Cabe destacar que no se encontró disminución de la expresión de AQP-1 en el paciente con anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que presentaba visibles esferocitos en el frotis, el nivel de expresión no difiere del control normal (figuras VII-9 y VII-10).

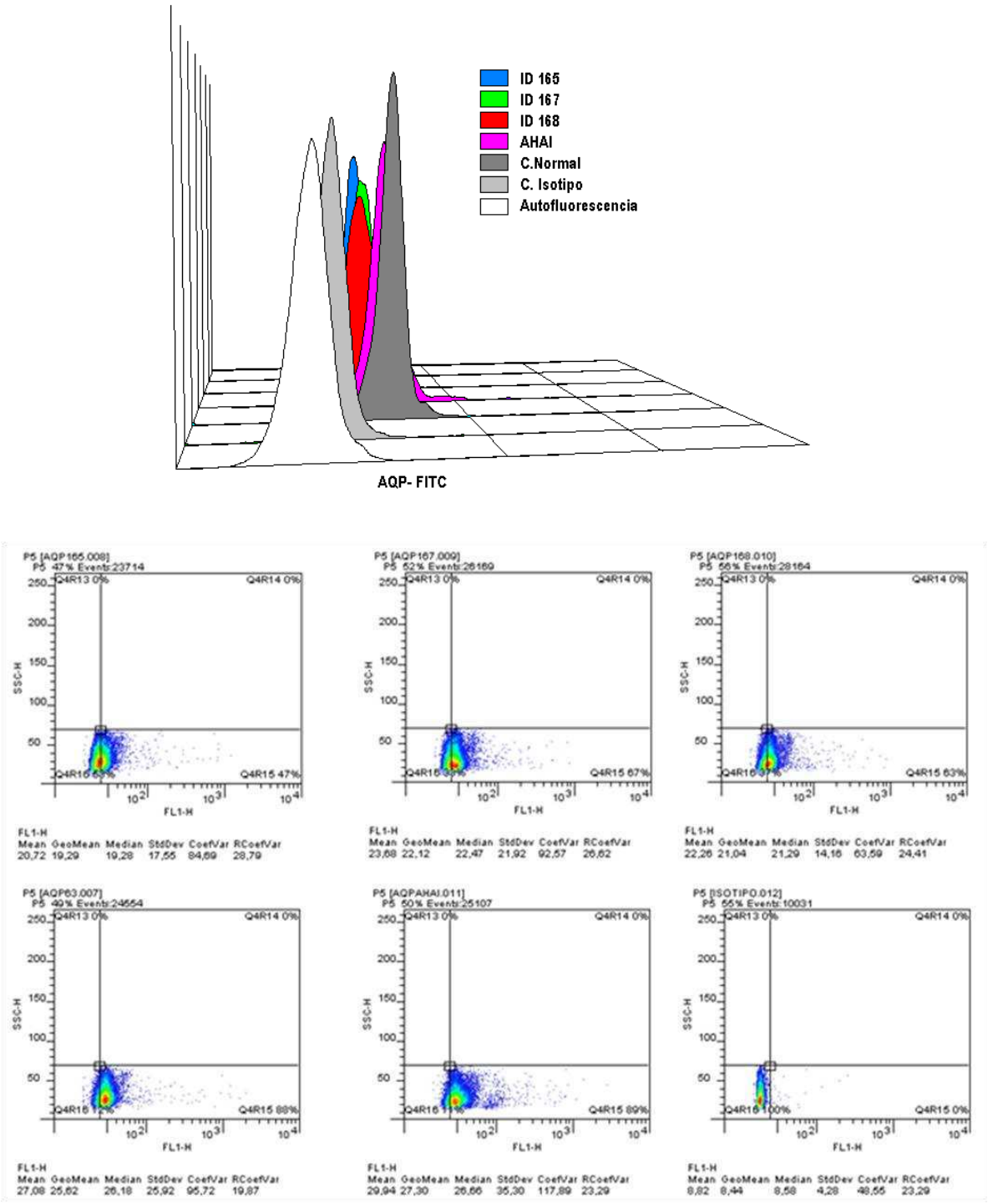


Figura VII-9: Expresión de AQP-1 evaluada mediante citometría de flujo con permeabilización y doble marcación (ver Materiales y Métodos). Arriba: Histogramas superpuestos y dots plots correspondientes a uno de los ensayos tipo. Pacientes ESH (ID 165, 167 y 168). Paciente con anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Dots plots: arriba, de izquierda a derecha, pacientes ESH 165, 167 y 168. Abajo, de izquierda a derecha: control normal, paciente AHAI y control de isotipo. La expresión de AQP-1, evaluada mediante la mediana de intensidad de fluorescencia o por el porcentaje de eritrocitos con expresión positiva, resultó disminuida en todos los pacientes con ESH respecto de un control normal procesado simultáneamente. Los gráficos corresponden a un ensayo tipo.

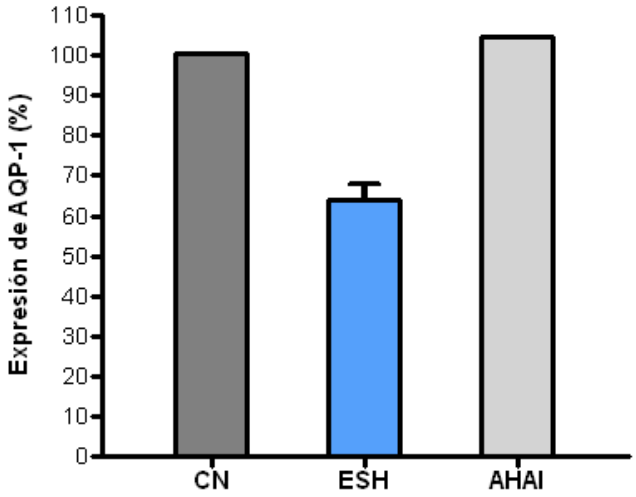


Figura VII-10: Expresión de AQP-1. Porcentaje de expresión de AQP-1 en los pacientes ESH (N=13) respecto de los controles normales procesados simultáneamente (N=5). La expresión de AQP-1 se expresa con la mediana de la intensidad de fluorescencia: (Med F*corregida del paciente/ Med F*corregida del control) x 100. La expresión de AQP-1 en los pacientes ESH difiere significativamente de la de los CN y del paciente con AHAI (Kruskal-Wallis, P = 0,0011).

Una pregunta esencial es si la disminución de la intensidad de fluorescencia que se observa en los pacientes responde a una menor densidad de moléculas de AQP-1 o si es el resultado de una medición efectuada en una célula más pequeña. Los pacientes ESH no esplenectomizados presentan un VCM significativamente menor al de los controles normales (en Capítulo II, tabla II-2). La diferencia de tamaños logra apreciarse por citometría de flujo en algunos pacientes (figura VII-11).

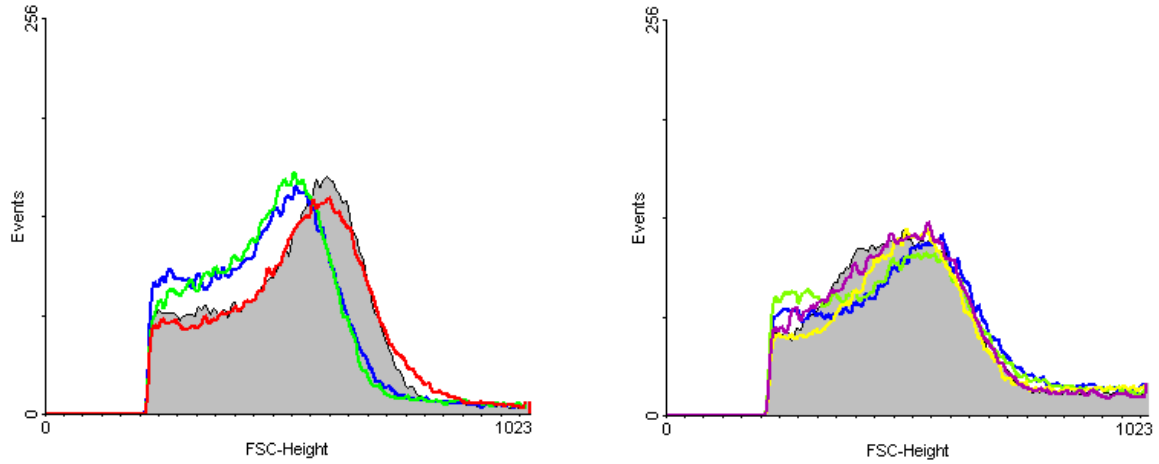
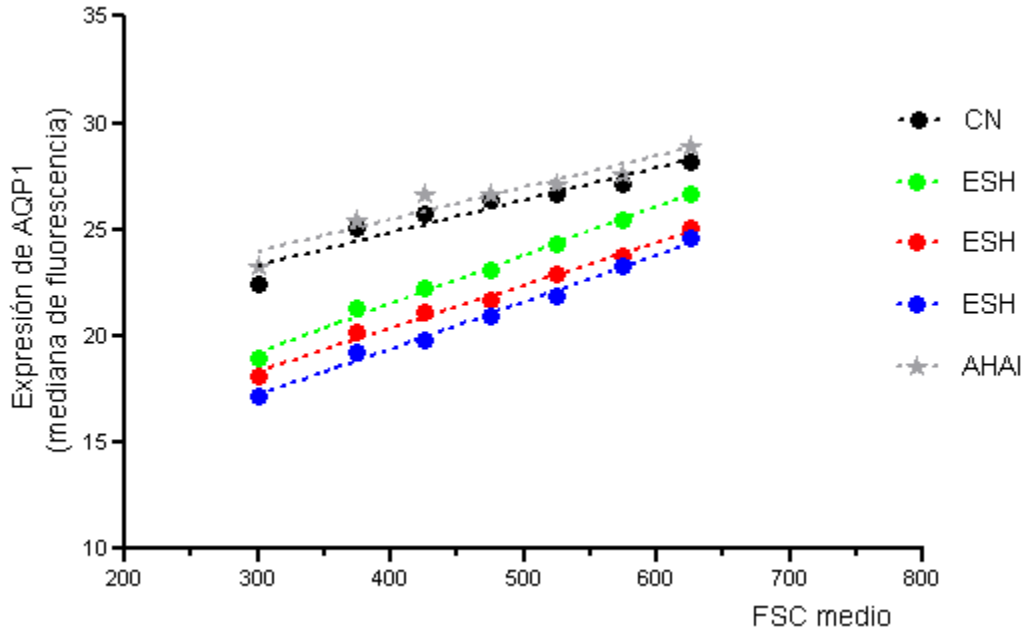


Figura VII-11: Distribución del tamaño celular evaluado por citometría de flujo. Histogramas superpuestos para el detector FSC en los ensayos de expresión de AQP-1. Los histogramas sombreados (gris) corresponden a controles normales procesados en forma simultánea con los pacientes, los histogramas en color corresponden a pacientes ESH. A la derecha: dos pacientes presentan una marcada disminución del tamaño de los eritrocitos (en azul y verde), los restantantes pacientes no muestran diferencia respecto de su correspondiente control normal.

Al analizar la expresión de AQP-1 en las poblaciones eritrocitarias de igual tamaño, se observa que la expresión de la proteína en todos los pacientes siempre es inferior a la del control normal. La pérdida progresiva de la proteína es mayor para los pacientes ESH que para el control normal. En el paciente con AHAI y visibles esferocitos en su frotis se observa un comportamiento similar al del control normal (figura VII-12).



	ESH	ESH	ESH	CN	AHAI
Pendiente	0,02290	0,02016	0,02197	0,01530	0,01489
Ordenada al origen	12,36	12,30	10,63	18,72	19,52
Bondad de ajuste (r^2)	0,9937	0,9907	0,9906	0,9180	0,9183
Diferencia entre pendientes	NS			NS	
	Las pendientes difieren significativamente P = 0,0008				

Figura VII-12: Expresión de AQP-1 en función del tamaño celular. Los eritrocitos se clasificaron en subpoblaciones de igual tamaño mediante la definición de pequeñas regiones (50 a 100 unidades arbitrarias) en el histograma FSC. Para cada una de estas subpoblaciones se registró la expresión de AQP-1 mediante la mediana de fluorescencia.

Analizando de igual manera el contenido de la Banda 3, evaluada con 5'eosina maleimida, se observa un comportamiento análogo en cuanto a la mayor pérdida de la proteína en los pacientes ESH (figura VII-13).

En base a lo expuesto, se puede concluir que la menor expresión de AQP-1 no está vinculada a un menor tamaño del eritrocito. El comportamiento similar de los eritrocitos de la AHAI y del control normal, que difiere del hallado en las ESH, refuerza la hipótesis de que la expresión de las proteínas depende del anclaje eficiente de las mismas a la membrana eritrocitaria.

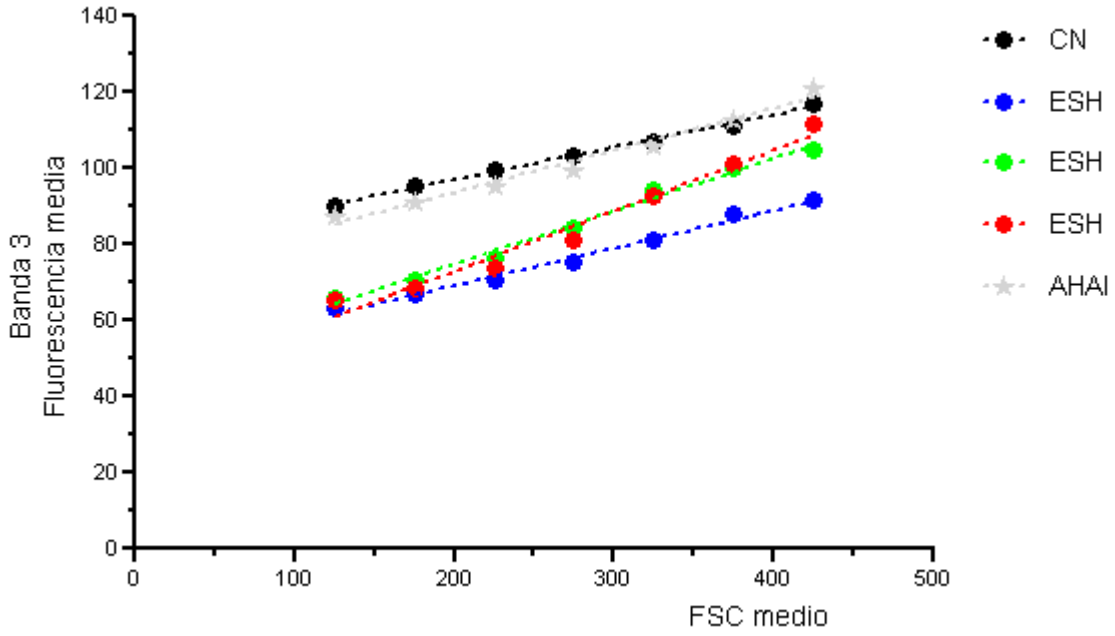


Figura VII-13: Evaluación del contenido de Banda 3 en función del tamaño celular. Los eritrocitos se clasificaron en subpoblaciones de igual tamaño mediante la definición de pequeñas regiones (50 unidades arbitrarias) en el histograma FSC. Para cada una de estas subpoblaciones se registró la intensidad de fluorescencia media de la 5'EMA.

En algunas muestras de pacientes se estimó el número de moléculas de AQP-1 por eritrocito para lo cual debió cambiarse el anticuerpo conjugado, ya que sólo se dispone comercialmente del calibrador con ficoeritrina (PE). Este fluorocromo no es el más conveniente cuando la marcación es intracelular ya que presenta un mayor impedimento estérico. A pesar de ello el porcentaje de expresión de AQP-1 es similar al obtenido con FITC. Se logró confirmar una menor expresión de AQP-1 en los eritrocitos de los pacientes respecto del control normal (figura VII-14).

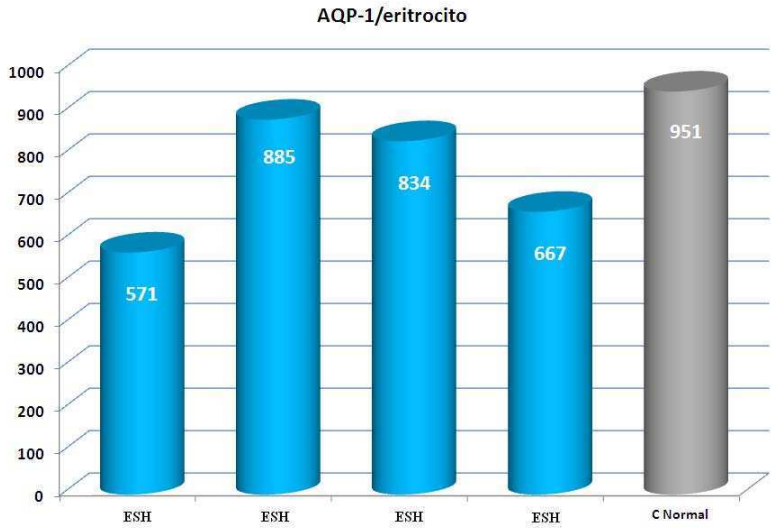


Figura VII-14: Determinación cuantitativa de AQP-1 por citometría de flujo en cuatro pacientes con ESH y un control normal. La cuantificación se realizó mediante permeabilización y doble marcación. La curva de calibración fue realizada con QuantiBrite^{TM}-PE.

En ensayos en los cuales se realizó con la misma muestra la determinación de la expresión de AQP-1 y la criohemólisis basal y con inhibidor, se observaron valores mayores de criohemólisis para las muestras que expresaban menor cantidad de AQP-1. Coherentemente, la presencia de iones Hg^{2+} afectaba en mayor medida a las muestras con mayores niveles de AQP-1 (n=4) (figura VII-15). Para la totalidad de la población estudiada se encontró correlación significativa (ρ = - 0,65, P < 0,05) entre el % de expresión de AQP-1 y % de CH (ensayos no simultáneos) (figura VII-16).

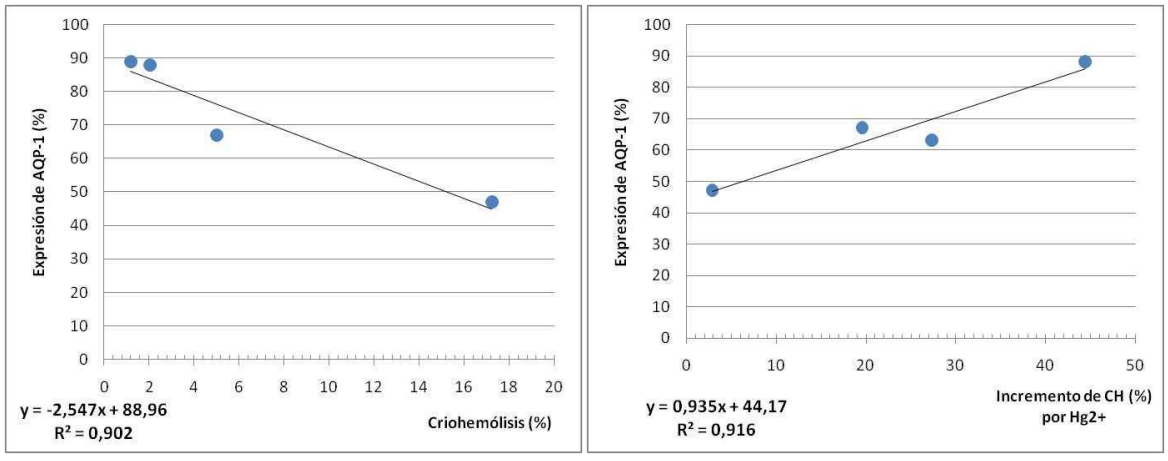


Figura VII-15: Relación entre los niveles de expresión de AQP-1 determinados por citometría de flujo con: a) valor de la Criohemólisis b) incremento de la CH por la presencia de iones mercurio.

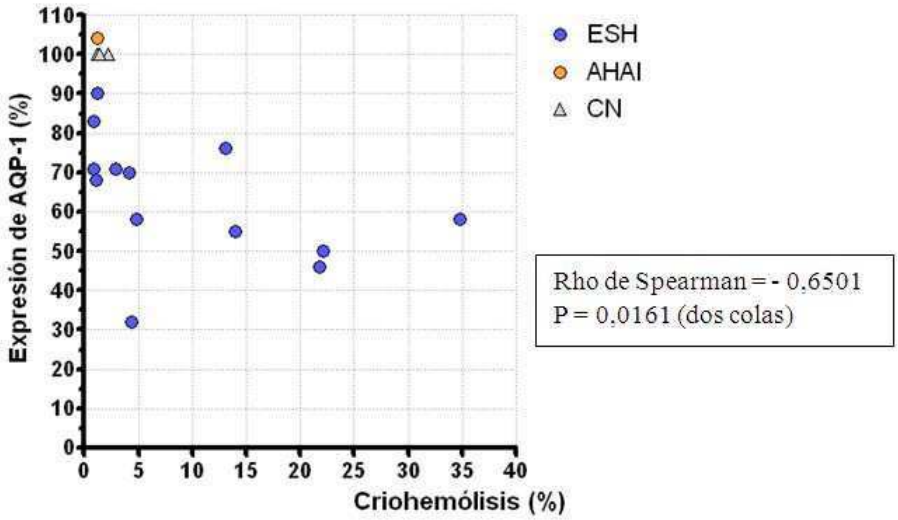


Figura VII-16: Relación entre los niveles de expresión de AQP-1 determinados por citometría de flujo y el porcentaje de la Criohemólisis (determinaciones no simultáneas).

Los pacientes estudiados pertenecían a diferentes grupos de severidad. El análisis de la expresión de AQP-1 permitió establecer que la AQP-1 se encuentra disminuida en la ESH y esta disminución correlaciona con el grado de severidad clínica. Los pacientes pertenecen a diferentes grupos familiares y con deficiencias aisladas y/o combinadas de las diversas proteínas asociadas a ESH (figura VII-17). Consistentemente se encontró una correlación significativa entre la expresión de AQP-1 y los niveles de hemoglobina al momento del estudio (figura VII-18).

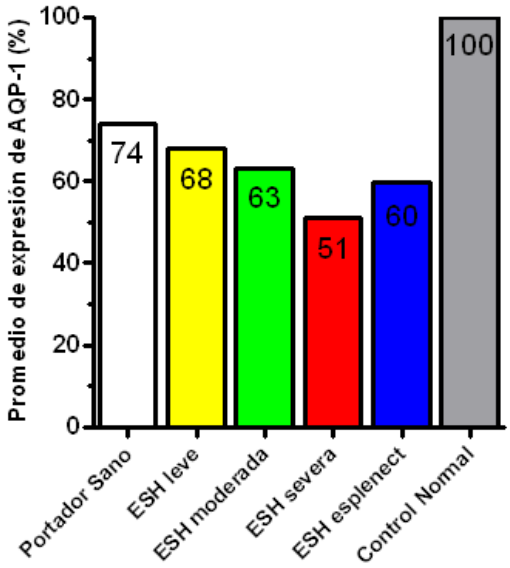


Figura VII-17: promedio de expresión de AQP-1 según subgrupo de severidad.

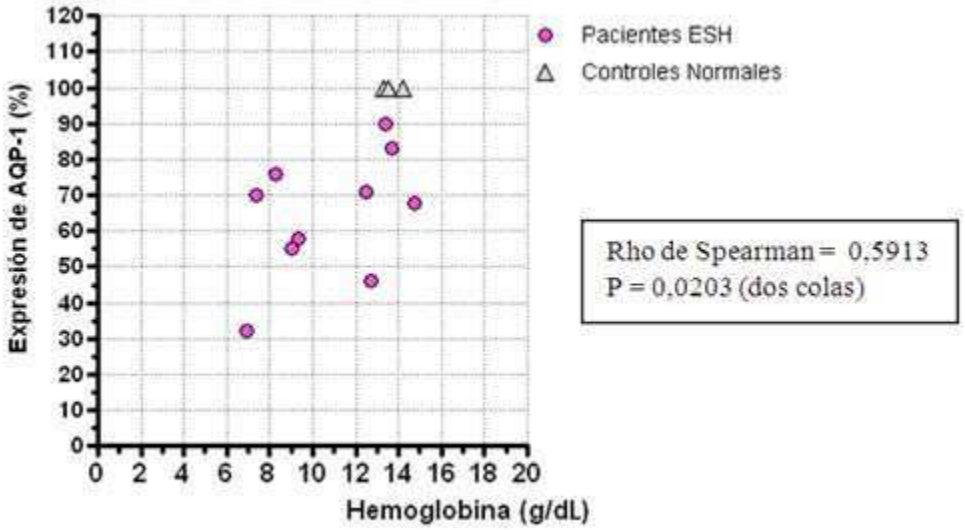


Figura VII-18: Correlación entre el promedio de expresión de AQP-1 y la concentración de hemoglobina al momento del estudio. Los pacientes esplenectomizados fueron excluidos.

Osmolalidad sérica

En experimentos *in vitro*, Blanc y colaboradores demostraron que si la maduración de los reticulocitos se producía en un medio de mayor tonicidad, los eritrocitos obtenidos expresaban mayores cantidades de AQP-1 en su membrana. Para corroborar si estos cambios ocurren *in vivo*, se determinaron las osmolalidades de los sueros en un grupo de pacientes y controles normales. Consistentemente con el hallazgo previo de la menor expresión de AQP-1 en pacientes, se observó que las osmolalidades de sus sueros (n=13; leves 4, moderados 4, severos 2, esplenectomizados 3) fueron significativamente menores que las de los individuos normales (n=20); $\bar{x} \pm$ DE: 270,5 ± 1,57 vs 275,9 ± 1,50; P = 0,015 (figura VII-19).

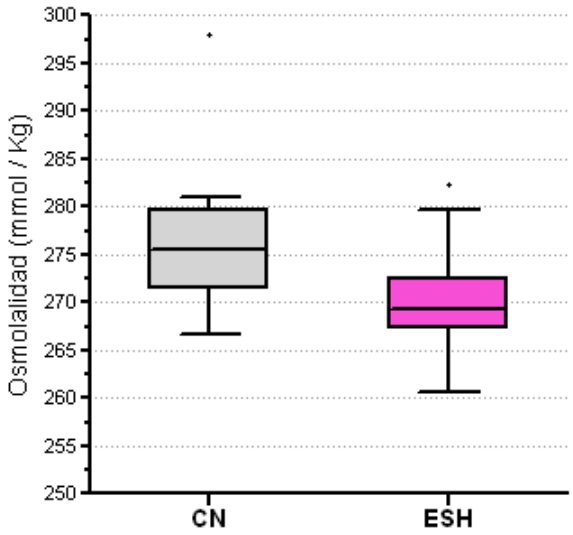


Figura VII-18: Osmolalidades de sueros de controles normales $\bar{x}$ ± SEM: (275,91 ± 1,50; N=20) y de pacientes (270,53 ± 1,57; N=13). Cada determinación fue realizada por triplicado. La diferencia (5,38 mmol/Kg) es significativa (Mann – Whitney, P = 0,0149)

Discusión

La primera descripción de disminución de AQP-1 asociada a una patología eritrocitaria fue realizada por Peter Agre y colaboradores *(Agre et al 1994)* en un paciente con anemia diseritropoyética congénita. Posteriormente en un estudio sobre el macrocomplejo Banda 3 también se la describió disminuída en un paciente deficiente para Banda 3 homocigota y en ratones *knock out* Banda 3 -/- *(Bruce et al 2003)*. En el presente estudio se observa que la AQP-1 se encuentra disminuida (10 - 55%) en todos los pacientes estudiados (N=13) y esta disminución correlaciona con el grado de severidad clínica. Los pacientes pertenecen a diferentes grupos familiares y con deficiencias aisladas y/o combinadas de las diversas proteínas asociadas a ESH.

La disminución en la expresión de AQP-1 podría deberse a una segregación anómala durante el proceso de enucleación del eritroblasto ya que en la ESH se encuentra alterado el grado de conectividad de las proteínas al citoesqueleto. Este mecanismo fue demostrado para otras proteínas en modelos murinos de ESH y de Eliptocitosis Congénita *(Salomao et al 2010)*. Aún más, en la maduración de los reticulocitos –*in vivo*– podría acentuarse la pérdida de AQP-1 por vía exosomal ya que, como hemos comprobado en el presente estudio, las células se encuentran inmersas en un plasma de menor osmolaridad respecto de individuos normales. La regulación de la expresión de AQP-1 mediada por la tonicidad del medio fue demostrada *in vitro* por Blanc y colaboradores

(2009). Los datos obtenidos sugieren que este mecanismo podría observarse *in vivo* habiéndose hallado una mayor expresión de AQP-1 en los individuos con mayor osmolalidad sérica.

Es interesante mencionar que la administración de eritropoyetina en adultos sanos genera un aumento de la expresión de AQP-1 en los eritrocitos *(Rentsch et al 2006)*. Teniendo en cuenta el hallazgo de la disminución de la expresión de AQP-1 relacionada con la severidad clínica de la ESH, podemos hipotetizar que éste podría ser al menos uno de los mecanismos por los cuales la administración de Epo mejora transitoriamente el cuadro clínico de los pacientes.

En aproximadamente un 10% de pacientes ESH no puede identificarse la mutación en el gen responsable de la alteración en la proteína de membrana *(An y Mohandas 2008)*. Un estudio reciente mostró que mutaciones en el gen GATA1 generan deficiencias simultáneas de expresión en AQP-1, Banda 3 y α-espectrina desencadenando un cuadro compatible con ESH *(Hasegawa et al 2012)*.

La ESH, patología basada en la alteración de diferentes proteínas de membrana y su citoesqueleto, constituye un grupo heterogéneo de desórdenes si se considera la severidad clínica y la alteración proteica involucrada. Dichas alteraciones no logran explicar totalmente la severidad de la anemia. No existe relación entre la severidad del cuadro clínico y la proteína de la membrana alterada. La menor expresión de AQP-1 proporciona una alteración en común en los pacientes y puede correlacionar con la severidad de la anemia independientemente de cuál sea la proteína de membrana afectada.

ANEXO

Aspectos clínicos y evolución de los pacientes

El tiempo de seguimiento de los 86 pacientes con ESH evaluables para evolución varió entre 1 mes y 33 años. Clasificados por formas clínicas, 29 fueron leves (33,7%), 38 moderadas (44,2%) y 19 severas (22,1%).

Se detectaron 5 casos de crisis aplásicas secundarias a infección por parvovirus B19. El análisis del comportamiento de cada caso durante el curso de enfermedades febriles permitió establecer que el 67,2% de los pacientes hacían repetidamente crisis hemolíticas severas al cursar episodios febriles de etiología tanto viral como bacteriana.

En 89 pacientes se dispuso de los antecedentes al nacimiento. De ellos, 72 (80,9%) habían presentado ictericia y/o anemia en periodo neonatal. Se observó que la incidencia de estas manifestaciones neonatales era significativamente mayor en las formas moderadas o severas que en las leves (figura VI-1). Como tratamiento, requirieron luminoterapia 57 pacientes y exsanguineotransfusión 4 casos (figura VI-2).

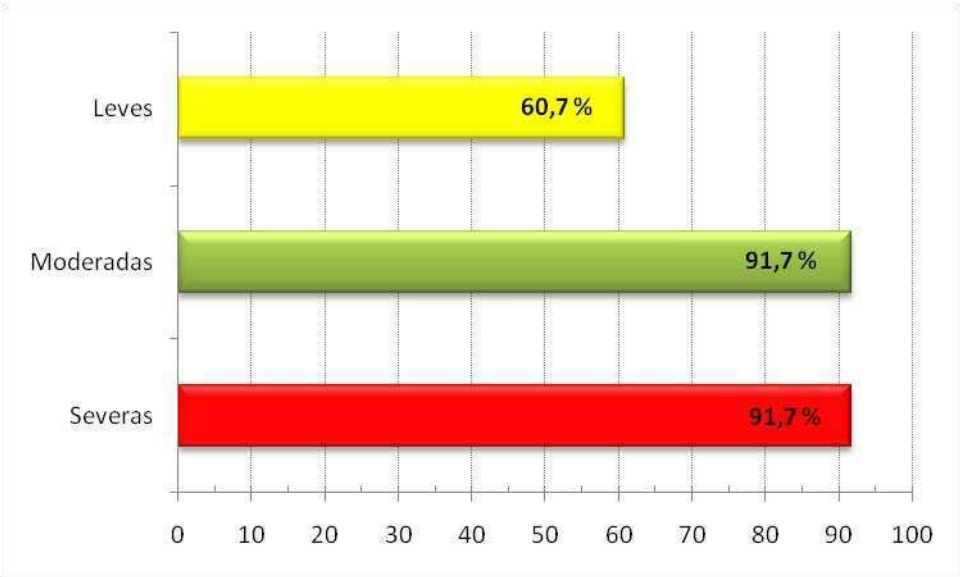


Figura VI-1: Incidencia de manifestaciones neonatales (ictericia y/o anemia) según severidad de la evolución clínica. La incidencia es significativamente menor en las formas leves (chi cuadrado, $P < 0,05$)

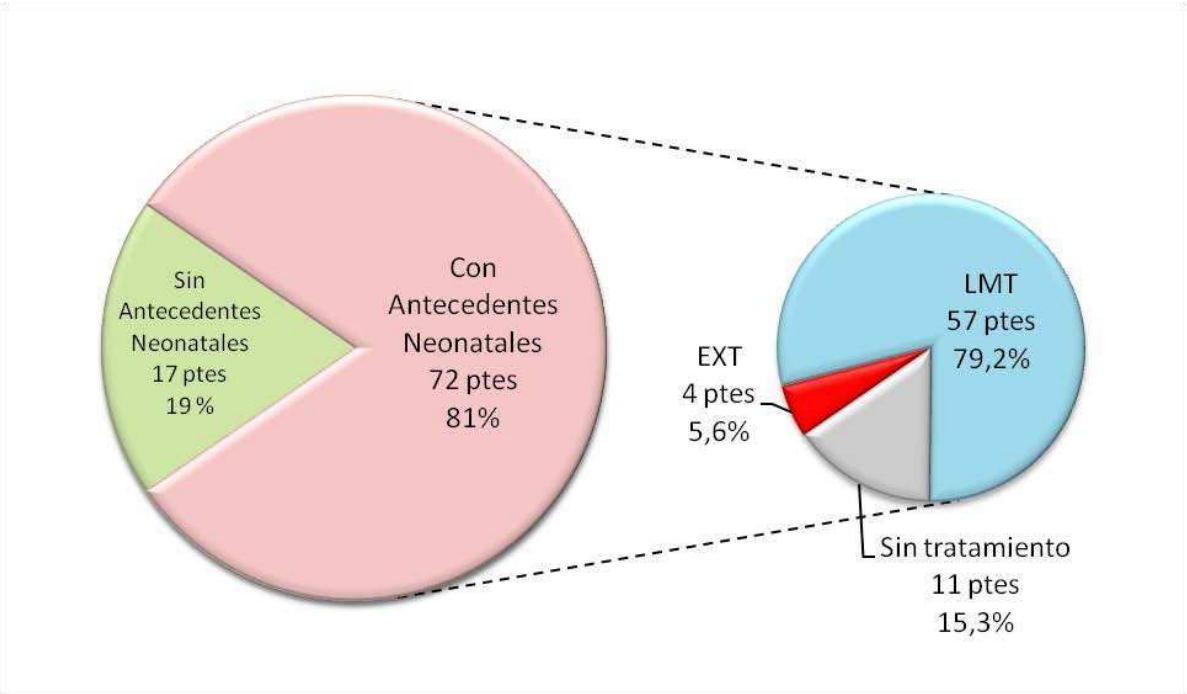


Figura VI-2: Incidencia de manifestaciones neonatales (ictericia y/o anemia) y tratamiento requerido. Fueron evaluables para estas variables 89 pacientes con diagnóstico de ESH. LMT: luminoterapia, EXT: exanguineotransfusión.

Al evaluar la evolución de la enfermedad, no se pudo demostrar asociación entre severidad clínica y forma de transmisión o deficiencia proteica predominante. Tampoco se observó entre los subgrupos de severidad diferencia significativa en lo relativo al resultado de las pruebas diagnósticas confirmatorias (en capítulo V, ver figura V-18).

Presentaron litiasis biliar el 21% de los pacientes. La edad al diagnóstico fue 20,7 ± 20,1 años (4 - 59 años; mediana 10,5 años).

Los resultados de las distintas medidas terapéuticas utilizadas en estos pacientes mostraron los siguientes datos.

La cantidad de transfusiones recibidas por paciente varió entre 0 y 29 (media ± DE: 3,6 ± 5,8; mediana 1,0). El 37,7% de los pacientes no recibió ninguna transfusión.

Se realizó esplenectomía en 24 pacientes. La edad media al procedimiento fue 16,7 ± 17,0 años (mediana 11,6 años). En 15 pacientes (62,5%) se realizó por vía laparoscópica, en 3 (12,5%) por laparotomía y en 5 (20,8%) se comenzó por laparoscopía pero debió terminarse por laparotomía. Todos los pacientes alcanzaron valores de hemoglobina normales después de la operación, que fueron sostenidos durante el tiempo de seguimiento. La única complicación perioperatoria fue

perforación diafragmática intraoperatoria en un niño. En un solo paciente se detectó la persistencia de un bazo supernumerario luego de la esplenectomía, pero hasta la fecha continua con hemoglobina en valores normales. Como profilaxis de la sepsis postesplenectomía, todos los pacientes menores de 18 años recibieron vacunación previa para estreptococo, neumococo y H.Influenzae, y profilaxis antibiótica con penicilina/amoxicilina luego de la operación. Hasta la fecha ningún paciente ha padecido algún episodio infeccioso severo.

Se realizó colecistectomía en 14 de los 121 pacientes. La misma fue realizada antes de la esplenectomía en 6 de ellos y simultáneamente con la misma en 8 casos.

Discusión

En el recién nacido la ictericia es el síntoma más frecuente, presente en más del 90% de los pacientes diagnosticados en esta etapa, asociándose a anemia en 50 - 80% de los casos *(Burman 1958, Trucco y Brown 1967, Schroter y Kashnitz 1983)*. Se estima que aproximadamente el 50% de los pacientes a los que se diagnostica ESH presentan como antecedente el haber padecido ictericia neonatal *(Stamey y Diamond 1957, Burman 1958, Schroter y Kashnitz 1983, Pinto et al 1995)*, estando siempre presente el riesgo de kernicterus *(Burman 1958, Berardi et al 2006, Sgro et al 2006)*. Saada y colaboradores comunicaron que el 1% de los neonatos que requerían luminoterapia padecían ESH *(Saada et al 2006)*, y Christensen y Henry recientemente han llamado la atención sobre su subdiagnóstico, postulando que la ESH es una causa significativamente ignorada de hiperbilirrubinemia neonatal *(Christensen y Henry 2010)*. El antecedente de ictericia y/o anemia neonatal estuvo presente en el 80,9% de nuestros pacientes, valor superior al 50 - 65% informado por otros grupos *(Stamey y Diamond 1957, Pinto et al 1995, Gallagher 2005, Mariani et al 2008)*. La explicación para esta diferencia no está clara, pero no puede descartarse la influencia de factores genéticos de nuestra población que determinen un distinto comportamiento de la enfermedad en este periodo de la vida.

La distribución de las distintas formas clínicas en nuestra población fue similar a la de otras series de pacientes *(Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009)*. No se pudo demostrar asociación entre resultados de las pruebas de laboratorio y la evolución del paciente. La asociación entre tipo de transmisión y severidad de la enfermedad es actualmente motivo de controversia. Algunos autores opinan que las formas no dominantes son más severas que las dominantes *(Eber et al 1990, Miraglia del Giudice et al 2001, Iolascon y Avvisati 2008)*. Sin embargo, en nuestros pacientes no pudimos demostrar dicha relación, coincidiendo con lo informado por Mariani y colaboradores en

su serie de 300 pacientes *(Mariani et al 2008)*. A diferencia de otros autores *(Aramburu Arriaga et al 2000, Delhommeau et al 2000, Iolascon y Avvisati 2008)*, observamos que la incidencia de manifestaciones neonatales fue mayor en los casos moderados y severos.

La litiasis biliar es la complicación más frecuente de la ESH. En series publicadas antes del advenimiento masivo de la ecografía, se estimaba una incidencia de 37 - 43% en adolescentes y adultos, y aproximadamente 5% en niños *(Rapetti et al 2005)*. Es probable que, si se realizara una detección rutinaria y precoz, esta incidencia se elevaría considerablemente. En una búsqueda sistemática realizada a pacientes de 4 a 22 años de edad, Tamary y col. encontraron una incidencia de 41%, por lo que recomiendan examen ecográfico anual a partir de los 4 años *(Tamary et al 2003)*. Es probable que la menor incidencia en nuestra población de pacientes se deba al hecho de que recién en los últimos años se ha comenzado con la detección precoz sistemática de la litiasis.

La esplenectomía corrige la sintomatología de la enfermedad en casi todos los pacientes con ESH, debido a que se elimina el principal órgano donde los eritrocitos sufren severos cambios y son finalmente destruidos. La anemia y la hiperbilirrubinemia se corrigen totalmente, el recuento reticulocitario desciende a valores normales o cercanos a lo normal y la sobrevida eritrocitaria se normaliza *(Grace y Lux 2009)*. En la totalidad de los pacientes de nuestro grupo en los que se realizó se obtuvo remisión completa de la sintomatología. A diferencia de otros autores *(Grace y Lux 2009)*, nuestros resultados no mostraron ninguna mejoría en las curvas de FOE luego de la esplenectomía. Si bien la sepsis fulminante es la mayor complicación postesplenectomía, se desconoce su real incidencia actual en pacientes que han recibido prevención con vacunas y profilaxis antibiótica. En nuestra serie no hemos tenido ningún caso, coincidiendo con otros informes *(Jugenburg et al 1999)*.

CONSIDERACIONES FINALES

La ESH es la anemia hemolítica hereditaria más frecuente en sujetos caucásicos. La incidencia se ha estimado en 1 cada 5.000 nacimientos en el norte de Europa *(Morton et al 1962)*. Estudios de fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) efectuados en controles sanos establecen una prevalencia de 1 cada 2.000 habitantes *(Godal y Heisto 1981, Eber et al 1992)*, aunque esta prueba no posee la máxima sensibilidad para detectar los casos subclínicos *(Bolton-Maggs et al 2004,Grace y Lux 2009, Crisp et al 2011)*. Se la conoce también como enfermedad de Minkowski-Chauffard por haber sido quienes describieron el aspecto clínico y proporcionaron el primer método diagnóstico de laboratorio en 1900 y 1907, respectivamente. Hasta los años 70, el diagnóstico de ESH se basaba en el cuadro clínico –anemia, ictericia y esplenomegalia- y desde el laboratorio sólo se disponían de la prueba de autohemólisis *(Selwyn y Dacie 1954)* y las curvas de fragilidad osmótica. La técnica de electroforesis discontinua con SDS, descripta por Laemmli en 1970, fue aplicada al estudio de las proteínas de la membrana eritrocitaria permitiendo establecer que la etiología de la enfermedad subyacía en los defectos cuali o cuantitativos de las proteínas de la misma, particularmente de aquéllas que están vinculadas al anclaje del citoesqueleto con la bicapa lipídica ("interacciones verticales"): espectrina, Banda 3, ankirina y proteína 4.2. Los avances de la biología molecular no resultaron efectivos para la aplicación diagnóstica de rutina dado que las bases genéticas de la enfermedad involucran a múltiples proteínas con variadas alteraciones. Casi 30 años transcurrieron hasta que nuevas técnicas diagnósticas fueran desarrolladas. Sin embargo, en nuestro país no estaban disponibles.

El principal objetivo de esta tesis consistió en desarrollar y difundir estas nuevas técnicas diagnósticas. La implementación de las mismas en forma conjunta con las tradicionales permitió establecer los alcances y limitaciones de cada una. Los resultados obtenidos en pacientes con anemias hemolíticas de otras etiologías fueron valiosos para esclarecer diagnósticos diferenciales. Los valores hematimétricos no permiten establecer la diferente etiología aunque un valor de ADE >17 y un valor de CHCM >33 son orientativos de ESH (tabla II-7). Las curvas FOE tienen el valor agregado de orientar el estudio hacia las hemoglobinopatías o a la coexistencia de otras patologías cuando se observa un perfil resistente. Esta información no la provee ni la CH ni la 5'EMA-CF. Hemos establecido que estas dos últimas pruebas tienen la gran ventaja de ser altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de ESH. Mediante el análisis de curvas ROC se establecieron los valores de corte: para CH > 2,6% (Sensibilidad 93,4%; Especificidad 94,1%; figura V-8) y para 5'EMA-CF una disminución de la IFM > 17% (Sensibilidad 85,1%; Especificidad 97,7%; figura V-15). La CH se constituyó en la prueba más sensible y la 5'EMA-CF en la más específica. Sin

embargo, es importante destacar que con valores de CH > 4,6% se obtiene un 100% de especificidad. La combinación de estas pruebas permite incrementar la certeza diagnóstica dado el elevado CP+ (37,0) para 5'EMA-CF y el muy bajo CP- (0,07) para CH. Para establecer el punto de corte óptimo de la FOE-CF se requiere de una mayor difusión y experiencia. Sólo tres grupos han publicado su experiencia con esta prueba, siendo nosotros uno de ellos. La incorporación de un mayor número de pacientes trajo aparejado corrimientos en el punto de corte, situación que también es reflejada por otros investigadores *(Shim y Won 2013)*. Sin embargo, considerando la utilidad de la prueba con criterio diagnóstico –no de *screening*– aconsejamos mantener un valor de corte bajo (< 22,8%) evitando así los falsos positivos y reforzando la especificidad (figura V-7). Realizando en forma simultánea las tres pruebas (CH, 5'EMA y FOE-CF) puede establecerse el diagnóstico en el 95,9% de los pacientes, obteniendo los resultados –si fuera necesario– en el mismo día de la extracción. La incorporación en las Guías de la Sociedad Argentina de Hematología de estas pruebas para el diagnóstico de ESH, demuestra que se ha logrado la difusión y aceptación de las mismas en nuestra comunidad, cumpliéndose uno de los objetivos propuestos en este trabajo.

Otro objetivo importante fue tratar de establecer el diagnóstico certero en forma precoz. Debido a que esta enfermedad puede manifestarse desde los primeros días de vida, se necesitó disminuir el volumen de muestra requerido. A partir de la sangre capilar, contenida en 6 tubos de micro-hematocrito, pudo realizarse el diagnóstico en niños y en neonatos de sólo 2 días de vida. Como paso previo debió comprobarse que ni el tipo de sangre ni el cambio de anticoagulante influían en los resultados. En esta etapa fue importante el aporte de la prueba diagnóstica descripta en 2009 (FOE-CF), porque entonces se pudo definir que al menos dos de tres pruebas fueran positivas para asegurar el diagnóstico. Debido a que ninguna de las pruebas detecta el 100 % de los casos, si sólo hubiéramos efectuado dos pruebas (CH y 5'EMA-CF) no podríamos realizar con certeza el diagnóstico con una sola prueba positiva. La disyuntiva sería si los resultados representan un falso negativo de una de las pruebas o un falso positivo de la otra. En la actualidad la metodología capilar la empleamos de rutina para todos los estudios de niños pequeños, ampliando los estudios sólo en aquellos casos con resultados no concluyentes pero con fuerte presunción diagnóstica.

El estudio de las proteínas de membrana permitió establecer las deficiencias más prevalentes en nuestra población: espectrina y ankirina. La clasificación tradicional de la ESH en base a la severidad clínica involucra al contenido de Sp. Al igual que otros autores, pudimos comprobar que el tipo y el porcentaje de disminución de las proteínas de membrana no guardan relación con la severidad clínica ni con el nivel de alteración de las pruebas diagnósticas aquí presentadas (figura V-18). Por este motivo consideramos que la nueva clasificación, basada en los niveles de

hemoglobina, es más adecuada para referirse a la severidad clínica. El estudio de membranas constituyó una determinación insustituible para detectar a los portadores sanos y diagnosticar fehacientemente a los pacientes que, por presentar coexistencia de otra patología, arrojaban resultados no concluyentes en las otras pruebas.

La construcción de una extensa base de datos con los antecedentes y la evolución de los pacientes nos permitió describir el comportamiento clínico de los mismos y analizar similitudes y diferencias con respecto a otras cohortes (Anexo). El antecedente de ictericia y/o anemia neonatal estuvo presente en el 80,9% de nuestros pacientes, valor superior al 50 - 65% informado por otros grupos *(Stamey y Diamond 1957, Pinto et al 1995, Gallagher 2005, Mariani et al 2008)* y a diferencia de otros autores *(Aramburu Arriaga et al 2000, Delhommeau et al 2000, Iolascon y Avvisati 2008)*, observamos que fue mayor en los casos moderados y severos. El desarrollo de las pruebas diagnósticas con sangre capilar presentada en esta tesis constituye, sin lugar a dudas, un gran avance para el estudio del recién nacido ya que la ESH es una causa significativamente ignorada de hiperbilirrubinemia neonatal *(Christensen y Henry 2010)*.

La distribución de las distintas formas clínicas en nuestra población fue similar a la de otras series de pacientes *(Mariani et al 2008, Grace y Lux 2009)*. No pudimos demostrar la asociación entre tipo de transmisión y severidad de la enfermedad, coincidiendo con lo informado por Mariani y colaboradores en su serie de 300 pacientes *(Mariani et al 2008)*.

La menor incidencia de litiasis biliar en nuestra población de pacientes, respecto a otras cohortes, refuerza el concepto de realizar la búsqueda sistemática para su detección precoz, dado que constituye la complicación más frecuente de la ESH.

En la totalidad de los pacientes de nuestro grupo en los que se realizó la esplenectomía se obtuvo remisión completa de la sintomatología. A diferencia de otros autores *(Grace y Lux 2009)*, nuestros resultados no mostraron ninguna mejoría en las curvas de FOE luego de la esplenectomía. Los pacientes esplenectomizados presentaron resultados alterados, acordes a su patología, para todas las pruebas diagnósticas (figura V-18), permitiendo corroborar el diagnóstico.

Disponer de pacientes acabadamente caracterizados a nivel diagnóstico y evolutivo permite además avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad. El análisis del comportamiento de cada caso durante el curso de enfermedades febriles permitió establecer que el 67,2% de los pacientes hacían repetidamente crisis hemolíticas severas al cursar episodios febriles de etiología tanto viral como bacteriana. Esta observación determinó la exploración del efecto de la temperatura

en los esferocitos, estableciendo que el estado febril *per se* genera eriptosis mediante el ingreso de iones Ca^{2+}. La indicación de disminuir la temperatura corporal en forma temprana constituye una consecuencia práctica de nuestros hallazgos. Paralelamente, en la búsqueda de una alteración en común que pudiera correlacionar con la severidad clínica, profundizamos el estudio de las proteínas de la membrana eritrocitaria, encontrando una expresión disminuida de AQP-1, independientemente de la proteína de membrana afectada.

Sin duda, aún quedan muchos interrogantes por resolver. Consideramos que con este trabajo hemos abierto un nuevo camino en la investigación de la esferocitosis hereditaria. Además, constituyéndose en un servicio asistencial, cada año se incrementa el número de pacientes correctamente diagnosticados y evolucionados. Sin lugar a dudas, este es el mayor objetivo que cumplimos y esperamos seguir cumpliendo.

BIBLIOGRAFÍA

A

Agre P, Orringer EP, Bennet V. Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. N Engl J Med 306: 1155-1161, 1982.

Agre P, Asimos A, Casella JF, McMillan C. Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. N Engl J Med 315: 1579-1583, 1986.

Agre P, Smith B, Baumgarten R, Preston G, Pressman E, Wilson P, Illum N, Anstee D, Lande M, Zeidel M. Human Red Cell Aquaporin CHIP. Expression during Normal Fetal Development and in a Novel Form of Congenital Dyserythropoietic Anemia. J Clin Invest 94: 1050-1058, 1994.

Agre P, Bonhivers M, Borgnia M. The Aquaporins, Blueprints for Cellular Plumbing Systems. J Biol Chem 273: 14659-14662, 1998.

Allan D, Thomas P. Ca^{2+}-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation. Biochem J 198: 433-440, 1981.

Amer J, Golfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. Cytometry 60: 73-80, 2004.

Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. Br J Haematol 132: 108-113, 2006.

An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane.Br J Haematol 141: 367-375, 2008.

Aramburu Arriaga N, Fernández Cuesta MA, Martínez Gonzalez MJ, Astigarraga Aguirre I, Fernandez-Teijeiro Alvarez A, Navajas Gutierrez A, et al. Hereditary spherocytosis in neonates. Review of our casuistics. Ann Esp Pediatr 52: 569-572, 2000.

Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. Cell Physiol Biochem 16:133-146, 2005.

B

Bain B. Disorders of red cells and platelets. En: Bain B. Blood cells: a practical guide. Fourth Edition. Blackwell Publishing 2006.

Ballin A, Waisbourd-Zinman O, Saab H, et al. Steroid therapy may be effective in augmenting hemoglobin levels during hemolytic crises in children with hereditary spherocytosis. Pediatr Blood Cancer 57: 303-305, 2011.

Bates GC, Brown CH. Incidence of gallbladder disease in chronic hemolytic anemia (spherocytosis) Gastroenterology 21: 104-109, 1952.

Bell A, Satchwell T, Heesom K, Hawley B, Kupzig S, Hazell M, Mushens R, Herman A, Toye A. Protein Distribution during Human Erythroblast Enucleation *In Vitro*. PLoS ONE 8(4): e60300. doi:10.1371/journal.pone.0060300, 2013.

Berardi A, Lugli L, Ferrari F, y col. Kernicterus associated with hereditary spherocytosis and UGT1A1 promoter polymorphism. Biol Neonat 90: 243-246, 2006.

Bessman JD, Gilmer PR Jr, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. Am J Clin Pathol 80: 322-326, 1983.

Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, y col. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. Haematologica 97: 516-523, 2012.

Blanc L, Liu J, Vidal M, Chasis J, An X, Mohandas N. The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maduration: Implication for the regulation of cell volume. Blood 114: 3928-3934, 2009.

Blecher TE. What happens to the microspherocytosis of hereditary spherocytosis in folate deficiency? Clin Lab Haematol 10: 403-408, 1998.

Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in haemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3077-3081, 1998.

Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ on behalf of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Br J Haematol 126: 455-474, 2004.

Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis-2011 update. Br J Haematol 156: 37-49, 2012.

Bosman G, Willekens F, Werre J. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? Cell Physiol Biochem 16: 1-8, 2005.

Bratosin D, Estaquier J, Petit F, et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. Cell Death Differ 8: 1143-1156, 2001.

Broséus J, Visomblain B, Guy J, Maynadié M, Girodon F. Evaluation of mean sphere corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis. Int Jnl Lab Hem 32: 519-523, 2010.

Bruce J. Red cell membrane transport abnormalities. Curr Opin Hematol 15: 184-190, 2008.

Bruce L, Beckmann R, Ribero M, Peters L, Chasis J, Delaunay J, Mohandas N, Anstee D, Tanner M. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood 101: 4180-4188, 2003.

Brugnara C, Mohandas N. Red cell indices in classification and treatment of anemias: from M.M. Wintrobes's original 1934 classification to the third millennium. Curr Opin Hematol 20: 222-230, 2013.

Burak Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin Chim Acta 390: 1-11, 2008.

Burman D. Congenital spherocytosis in infancy. Arch Dis Child 33: 335-351, 1958.

Buttarello M, Plebani M. Automated Blood Cell Counts. State of the Art. Am J Clin Pathol 130: 104-116, 2008.

C

Casale M, Perrotta S. Splenectomy for hereditary spherocytosis: Complete, partial or not at all? Expert Review of Hematology 4: 627–635, 2011.

Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anaemia. Proc Soc Exp Biol Med 222: 274-282, 1999.

Chen T, Weiss L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. Blood 41: 529-537, 1973.

Christensen RD, Henry E. Hereditary spherocytosis in neonates with hyperbilirubinemia. Pediatrics 125: 120-125, 2010.

Cid Vidal J, Elies Fibla E. Immunohematologic study of ABO hemolytic disease. An Esp Pediatr 53: 249-252, 2000.

Coetzer TL, Lawler J, Liu SC, y col. Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary spherocytosis. N Engl J Med 318: 230-234, 1988.

Cooper RA, Jandl JH. The Role of Membrane Lipids in the Survival of Red Cells in Hereditary Spherocytosis. J Clin Invest 48: 736-744, 1969.

Costa FF, Agre P, Watkins PC, Winkelmann JC, Tang TK, John KM et al. Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane-skeleton protein ankyrin. N Engl J Med 323: 1046-1050, 1990.

Crisp R, Rapetti C, Alfonso G, Donato H. Una forma diferente de graficar la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE): ventajas sobre el método convencional. Hematología 11 (2): 141 (resumen 227), 2007.

Crisp R, Solari L, Gammella D et al. Use of capillary blood to perform the eosin-5’-maleimide flow cytometry (EMA-FC) test: Results are comparable to venous blood. Haematologica 95: 700 (abs 1808), 2010a.

Crisp R, Solari L, Gammella D et al. Flow cytometric osmotic fragility (FC-OF) can replace the traditional osmotic fragility (OF) test? Preliminary results. Haematologica , 95: 703 (abs 1816), 2010b.

Crisp RL, Solari L, Vota D, et al. A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. Ann Hematol 90: 625-634, 2011.

Crisp R, Solari L, Gammella D, Schvartzman G, Rapetti M C, Donato H. Use of Capillary Blood to Diagnose Hereditary Spherocytosis. Pediatr Blood Cancer 59: 1299-1301, 2012.

Crisp RL, Gammella D, Solari L, Rapetti MC, Schvartzman G, Donato H. Utilización de sangre capilar: Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria. Hematología; 17: 8-14, 2013.

Cynober T, Mohandas N, Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. J Lab Clin Med 12: 259-269, 1996.

D

Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, et al. Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. Blood 98: 2894-2899, 2001.

Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. Blood Reviews 27: 167-178, 2013.

Dacie JV, Lewis SM, Luzzato L. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Practical Haematology. Dacie JV, Lewis SM (eds). Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991.

Daniels G. Functions of red cell surface proteins. Vox Sang 93: 331-340, 2007.

Danise, Amendola, Nobili, Perrotta et al. Flow-cytometric analysis of erythrocytes and reticulocytes in congenital dyserythropoietic anaemia type II (CDA II): value in differential diagnosis with hereditary spherocytosis. Clin Lab Haem 23: 7-13, 2001.

Daugas E, Cande C, Kroemer G. Erythrocytes: Death of a mummy. Cell Death Differ 8: 1131-1133, 2001.

Delaunay J, Alloisio N, Morle L, Baklouti F, Dalla Venezia N, Maillet P, Wilmotte R. Molecular genetics of hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis. Ann Genet 39:209-221, 1996.

Delhommeau F, Cynober T, Schischmanoff PO, Rohrlich P, Delaunay J, Mohandas N, et al. Natural history of hereditary spherocytosis during the first year of life. Blood 95: 393-397, 2000.

Dhermy D, Bournier O, Bougeois M, Grandchamp B. The red blood cell band 3 variant (band 3 Bicetrel: R 490 C) association with dominant hereditary spherocytosis causes defective membrane targeting of the molecule and a dominant negative effect. Mol Membr Biol 16: 305-312, 1999.

Diamond LK. Indications for splenectomy in childhood: Results in fifty-two operated cases. Am J Surg 39: 400-410, 1938.

Do HY. Hereditary spherocytosis presenting in pregnancy. Acta Haematol 72: 29-33, 1984.

Donato H, Rapetti C, Crisp R, Martorelli D. Anemias hemolíticas. En: Donato H, Rapetti C (Eds). Hematología Neonatal. Buenos Aires. Fundasap 2007.

Donato H, Crisp R, Rapetti C. Anemias hemolíticas hereditarias por trastornos de membrana. En: Donato H, Rapetti C, Crisp R (Eds). Anemias en pediatría. Buenos Aires. Ediciones JOURNAL, 2014.

Donato H, Crisp RL, García E, Rapetti MC, Solari L, Vota D, Chamorro ME, Schvartzman G, Miguez G, Gammella D, Vitttori D, Nesse A. Aspectos demográficos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de la Esferocitosis hereditaria en nuestro país. Estudio sobre 143 casos pertenecientes a 84 familias. Hematología 18: 9-16, 2014.

Dubbelman TMAR, De Bruijne AW, Christianse K, Van Steveninck J: Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells. J Membr Biol 50: 225, 1979.

E

Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility and autohemolysis. J Pediatr 177: 409-416, 1990.

Eber SW, Pekrun A, Neufeldt A, Schroter W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: Screening using a modified glycerol lysis test. Ann Haematol 64: 88-92, 1992.

Eisele K, Lang P, Kempe D, Klarl B, Niemoller O, Wieder T, Huber S, Duranton C, Lang F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. Toxicology and Applied Pharmacology 210: 116-122, 2006.

Eraklis AJ, Filler RM. Splenectomy in childhood: a review of 1413 cases. J Pediatr Surg 7: 382-388, 1972.

F

Ferrant A, Leners N, Michaux JL, Verwilghen RL, Sokal G. The spleen and haemolysis: evaluation of the intrasplenic transit time. Br J Haematol 65: 31–34, 1987.

Fibach E, Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anaemia. Curr Mol Med 8: 609-619, 2008.

Föller M, Braun M, Qadri S, Lang E, Mahmud H, Lang F. Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. Eur J Clin Invest 40: 534-540, 2012.

Franceschi L, Rivera A, Fleming M, et al. Evidence for a protective role of the Gardos channel against hemolysis in murine spherocytosis. Blood 106: 1454-1459, 2005.

G

Gallagher PG, Forget BG, Lux SE. Disorders of the erythrocyte membrane. En: Nathan DG, Orkin SA (Eds). Nathan and Orki's Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia. WB Saunders, 1998.

Gallagher PG. Disorders of erythrocyte metabolism and shape. En: Hematologic Problems of the Neonate. Christensen RD (Ed). Philadelphia. WB Saunders, 2000.

Gallagher PG. Red cell membrane disorders. Hematology. American Society of Hematology, Educational Program 2005.

Gallagher P. Red blood cell Membrane Disorders. En: Hoffman R, Benz E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J (Eds). Hematology-Basic principles and practice. Sixth Edition. Philadelphia. Saunders, 2013.

Gauthier E, Xinhua G, Mohandas N, and Xiuli A. Phosphorylation-Dependent Perturbations of the 4.1R-Associated Multiprotein Complex of the Erythrocyte Membrane. Biochem 50: 4561-4567, 2011.

Ghoti H, Amer J, Winder A, Rachmilewitz E, Fibach E. Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome, Eur J Haematol 79: 463-467, 2007.

Ghoti H, Fibach E, Dana M, et al. Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation. Ann Hematol 90: 509-513, 2011.

Gilsanz F, Ricard MP, Millan I. Diagnosis of hereditary spherocytosis with dual-angle differential light scattering. Am J Clin Pathol 100: 119-122, 1993.

Girodon F, Garçon L, Bergoin E, Largier M, Delaunay J, Fénéant-Thibault M, Maynadie M, Couillaud G, Moreira S, Cynober T. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. Br J Haematol 140: 464-474, 2008.

Glader B, Allen G. Neonatal hemolysis. En: Alarcón P, Werner E (Eds). Neonatal Hematology. Cambridge. Cambridge University Press, 2005.

Godal HC, Heist H. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian donors. Scand J Haematol 27: 30-34, 1981.

Golafshan AH, Ranjbaran R, Kalantari T, Moezzi L, Karimi M, Behzad- Behbahani A, Aboualizadeh F, Sharifzadeh S. Diagnosis of RBC Membrane Defects. Turk J Hematol 31: 25-31, 2014.

Grace RF, Lux SE. Disorders of the red cell membrane. En: Hematology of Infancy and Childhood. Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Fisher DE, Lux SE (Eds). Philadelphia. Saunders, 2009.

Green FA, Jung CY. Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu. J Membr Biol 33:249, 1977.

H

Hasegawa A, Shimizu R, Mohandas N, Yamamoto M. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. Blood 119: 2615-2623, 2012.

Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. Blood Rev 10: 129-147, 1996.

Herlax V, Vazquez R, Mate S, Bakás L. Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. Acta Bioquím Clín Latinoam 45: 287-96, 2011.

Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts withATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 76: 3107-3110, 1979.

Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. Ann Hematol 78: 555-557, 1999.

I

Iolascon A, Perotta S, Tavano R, Miraglia del Giudice E. Hereditary spherocytosis in newborns. En: Bellanti JA, Bracci R, Prindull G, Xanthou M (Eds). Neonatal Hematology and Immunology III. Elsevier Science, 1997.

Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Alloisio N, Morlé L, Delaunay J. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. Hematologica 83: 240-257, 1998.

Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. Haematologica 93: 1283-1288, 2008.

J

Jugenburg M, Haddock G, Freedman MH, Ford-Jones L, Ein SH. The morbidity and mortality of pediatric splenectomy: Does prophylaxis make a difference? J Pediatr Surg 34: 1064-1067, 1999.

K

Kedar PS, Colah RB, Kulkarni S, Ghosh K, Mohanty D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. Clin. Lab. Haem 25: 373-376, 2003.

Kelleher JF, Luban NL, Mortimer PP, Kamimura T. Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis. J Pediatr 102: 720-722, 1983.

King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. Br J Haematol 111: 924-933, 2000.

King MJ, Smythe J, Mushens R.Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. Br J of Haematol, 124: 106-113, 2004.

King MJ, Telfer P, MacKinnon H, y col. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. Cytometry 74B: 244-250, 2008.

King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. Int J Lab Hematol 35: 237-243, 2013.

Kling PJ, Schmidt RL, Roberts RA, Widness JA. Serum erythropoietin levels during infancy: associations with erythropoiesis. J Pediatr 128:791-796, 1996.

Kodippili G, Spector J, Sullivan C, Kuypers F, Labotka R, Gallagher P, Ritchie K, Low P. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. Blood 113: 6237-6245, 2009.

Korones D, Pearson HA. Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis. J Pediatr 114: 264-266, 1989.

Koury S, Koury M, Bondurant M. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. J Cell Biol 109: 3005-3013, 1989.

Kreuger HC, Burgart EO. Hereditary spherocytosis in 100 children. Mayo Clin Proc 41: 821-830, 1966.

Krivit W, Giebink GS, Leonard A. Overwhelming postplenectomy infection. Surg Clin North Am 59: 223-233, 1979.

Kumar D, Parakh A, Sharma S. Gilbert syndrome increasing unconjugated hyperbilirubinemia in a child with hereditary spherocytosis. J Pediatr Hematol Oncol 34: 54-56, 2012.

L

Lanciotti M, Perutelli P, Valetto A, Di Martino D, Mori PG. Ankyrin deficiency is the most common defect in dominant and non dominant hereditary spherocytosis. Haematologica 82: 460-462, 1997.

Lang KS, Myssina S, Brand V, et al. Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. Cell Death Differ 11: 231-243, 2004.

Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 15: 195-202, 2005.

Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. Cell Physiol Biochem 26: 21-28, 2010.

Lang F, Lang E, Föller M. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. Transfus Med Hemother 39: 308-314, 2012.

Lee JC, Gimm JA, Lo AJ, Koury MJ, Krauss SW, Mohandas N, Chasis JA. Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. Blood 103: 1912-1919, 2004.

Lee YK, Cho HI, Park SS, Lee YJ, Ra E, Chang YH et al. Abnormalities of erythrocyte membrane proteins in Korean patients with hereditary spherocytosis. J Korean Med Sci 15: 284-288, 2000.

Leitch V, Agre P, King L. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. PNAS 98: 2894-2898, 2001.

Liu J, Guo X, Mohandas N, Chasis J, An X. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. Blood 115: 2021-2027, 2010.

Liu SC, Derick LH, Agree P, Palek J. Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. Blood 76: 198-205, 1990.

Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.

Lusher JM, Barnhart MI. The role of the spleen in the pathophysiology of hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. Am J Pediatr Hematol Oncol 2: 31-42, 1980.

Lux SE, Palek J. Disorders of the red cell membrane. En: Blood: Principles and Practice of Hematology. Handin RI, Stossel TP, Lux SE (Eds). Philadelphia. JB Lippincot, 1995.

M

MacKinney AA, Morton NE, Kosower NS, Schilling RF. Ascertaining genetic carriers of hereditary spherocytosis by statistical analysis of multiple laboratory tests. J Clin Invest 41: 554-567, 1962.

Mallouh AA, Qudah A. An epidemic of aplastic crisis caused by human parvovirus B19. Pediatr Infect Dis J 14: 31-34, 1995.

Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. Haematologica 93: 1310-1317, 2008.

Mathai J, Mori S, Smith B, Preston G, Mohandas N, Collins M, van Zijl M, Agre P. Functional Analysis of Aquaporin-1 Deficient Red Cells. The Colton-null phenotype. J Biol Chem 271: 1309-1313, 1996.

Mayman D, Zipursky A. Hereditary spherocytosis: the metabolism of erythrocytes in the peripheral blood and in the splenic pulp. Br J Haematol 27: 201-217, 1974.

Michaels LA, Cohen AR, Zhao H, y col. Screening for hereditary spherocytosis by use of automated erythrocyte indexes. J Pediatr 130: 957-960, 1997.

Michetti M, Salamino M, Minafra R, Melloni E, Pontremoli S. Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. Biochem J 325: 721-726, 1997.

Miraglia del Giudice F, Iolascon A, Pinto L, Nobili B, Perrotta S. Erythrocyte membrana protein alterations underlying clinical heterogeneity in hereditary spherocytosis. Br J Haematol 88: 52-55, 1994.

Miraglia del Giudice E, Nobili B, Francese M, et al. Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis. Br J Haematol 112: 42-47, 2001.

Mohandas N, Kim YR, Ticko DH, et al. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. Blood 68: 506-513, 1986.

Mohandas N, Gallagher P. Red cell membrane: past, present, and future. Blood 112: 3939-3948, 2008.

Moore A, Sherman MM, Strongin MJ. Hereditary spherocytosis with hemolytic crisis during pregnancy. Treatment by splenectomy. Obstet Gynecol 47: 19S-21S, 1976.

Mortimer PP, Humphries RK, Moore JG, Purcell RH, Young NS. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. Nature 302: 426-429, 1983.

Morton NE, Mac Kinney AA, Kosowes N y col. Genetics of spherocytosis. Am J Hum Genet 14: 170-184, 1962.

Myhre Jensen O, Kristensen J. Red pulp of the spleen in autoimmune haemolytic anaemia and hereditary spherocytosis: morphometric light and electron microscopy studies. Scand J Haematol 36: 263-266, 1986.

O

Oski FA, Naiman JL. Problemas Hematológicos en el Recién Nacido. Buenos Aires. Panamericana, 1982.

Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. Science 233: 883-886, 1986.

P

Packman CH. The spherocytic haemolytic anaemias. Br J Haematol 112: 888-899, 2001.

Palek J, Lux S. Red Cell Membrane Skeletal Defects in Hereditary and Acquired Hemolytic Anaemias. Seminars in Hematology 20: 189-224, 1983.

Palek J, Jarolim P. Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. Semin Hematol 30: 249-283, 1993.

Parpart AK, Lorenz PB, Papart ER, Gregg JR, Chase AM. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. J Clin Invest 26: 636-640, 1947.

Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, et al. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. Blood 108: 791-780, 2006.

Pati AR, Patton WN, Harris RI. The use of the Technicon H1 in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Clin Lab Haematol 11: 27-30, 1989.

Pautard B, Feo C, Dhermy D, et al. Occurrence of hereditary spherocytosis and betha-thalassemia in the same family: Globin chain synthesis and viscodiffractometric studies. Br J Haematol 70: 239-245, 1988.

Pekrun A, Eber SW, Kuhlmey A, Schröter W. Combined ankyrin and spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. Ann Hematol 67: 89-93, 1993.

Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. Lancet 372: 1411-1426, 2008.

Petz L, Garratty G. Historical Concepts of Immune Hemolytic Anemias. En: Immune Hemolytic Anemias. Lawrence D. Petz, George Garratty, 2nd ed. Philadelphia. Churchill Livingstone. Elsevier Inc, 2004.

Pinto L, Iolascon A, Miraglia del Giudice E, et al. The Italian pediatric survey on hereditary spherocytosis. Int J Pediatr Hematol Oncol 2: 43-47, 1995.

Pistis G, Okonkwo SU, Traglia M, Sala C, Shin S-Y, et al. Genome Wide Association Analysis of a Founder Population Identified TAF3 as a Gene for MCHC in Humans. PLoS ONE 8(7): e69206. doi:10.1371/journal.pone.0069206, 2013.

Ponder E. A method for determining the form of the distribution of red cell resistances to simple hemolysin. Blood 3: 556-565, 1948.

Posey DL, Marks C. Overwhelming postsplenectomy sepsis in childhood. Am J Surg 145: 318-321, 1983.

Poveda Gómez F, Camacho Siles J, Quevedo Morales E, et al. Pattern of blood levels of erythropoietin and proinflamatory cytokines in patients with anemia of chronic disorders secondary to infection. An Med Interna 18: 298-304, 2001.

Premetis E, Stamoulakatou A, Loukopoulos D. Hereditary spherocytosis in Greece: collective data on a large number of patients. Hematology 4: 361-366, 1999.

Preston,GM, Agre P. Isolation of the CDNA for erythrocyte integral membrane-protein of 28-kilodaltons - member of an ancient channel family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11110-11114, 1991.

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red-cell CHIP28 protein. Science 256: 385-387, 1992.

R

Rachmilewitz EA, Weizer-Stern O, Adamsky K, et al. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? Ann N Y Acad Sci 1054: 118-123, 2005.

Rapetti C, Donato H, Crisp R, Martorelli D. Anemias hemolíticas. En: Anemias en Pediatría. Donato H, Rapetti C (eds). Buenos Aires, Fundasap, 2005.

Rentsch R, Damsgaard R, Lundby C, Juel C. Effects of darbepoetin injections on erythrocyte membrane transport protein expressions in humans. J Appl Physiol 101: 164-168, 2006.

Ricard MP, Gilsanz F, Millan I. Erythroid membrane protein defects in hereditary spherocytosis. A study of 62 Spanish cases. Haematologica 85: 994-995, 2000.

Rocha S, Rebelo I, Costa E, Catarino C, Belo L, Castro EBM et al. Protein deficiency balance as a predictor of clinical outcome in hereditary spherocytosis. Eur J Haematol 74: 374-380, 2005.

Rocha S, Costa E, Rocha-Pereira P, Ferreira F, Cleto E, Barbot J, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Complementary markers for the clinical severity classification of hereditary spherocytosis in unsplenectomized patients. Blood Cells Mol Dis 46: 166-170, 2011.

Romero RR, Poo JL, Robles JA, Uriostegui A, Vargas F, Majluf-Cruz A. Usefulness of cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Arch Med Res 28: 247-251, 1997.

Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Dacie and Lewis. Practical haematology. Eleven ed. Elsevier. Churchill Livingstone, 2011.

Roudier N, Verbavatz J M, Maurel C, Ripoche P, Tacnet F. Evidence for the Presence of Aquaporin-3 in Human Red Blood Cells. J Biol Chem 273: 8407-8412, 1998.

Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec P, Daniels G, Cartron J P, Bailly P. Deficiency in Humans and the Molecular Basis of a Novel Blood Group System, GIL J. Biol Chem 277: 45854-45859, 2002.

S

Saad ST, Costa FF, Vicentin DL, Salles TS, Pranke PH. Red cell membrane protein abnormalities in hereditary spherocytosis in Brazil. Br J Haematol 88: 295-299, 1994.

Saada V, Cynober T, Brossard Y, y col. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. Pediatr Hematol Oncol 23: 387-397, 2006.

Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig J, Chasis J, Mohandas N, An X. Protein .1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane. Proc Natl Acad Sci USA 105: 8026-8031, 2008.

Salomao M, Chen K, Villalobos J, Mohandas N, An X, Chasis J. Hereditary Spherocytosis and Hereditary Elliptocytosis: Aberrant protein sorting during erytroblast enucleation. Blood 116: 267-269, 2010.

Sánchez-López JY, Camacho AL, Magaña MT, Ibarra B, Perea FJ. Red cell membrane protein deficiencias in Mexican patients with hereditary spherocytosis. Blood Cells Mol Dis 31: 357-359, 2003.

Savvides P, Shalev O, John KM, Lux SE. Combined spectrin and ankyrin deficiency is common in autosomal dominant hereditary spherocytosis. Blood 82: 2953-2960, 1993.

Schilling RF. Estimating the risk for sepsis after splenectomy in hereditary spherocytosis. Ann Intern Med 122:187-188, 1995.

Schroter W, Kashnitz E. Diagnosis of hereditary spherocytosis in newborn infants. J Pediatr 103: 460-466, 1983.

Selwyn JG, Dacie JV. Autohemolysis and other changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. Blood 9: 414-438, 1954.

Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada. CMAJ 175: 587-590, 2006.

Shim Y, Won D. Flow Cytometric Osmotic Fragility Testing Does Reflect the Clinical Severity of Hereditary Spherocytosis. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 00:00–00.DOI: 10.1002/ cyto.b.21143, 2013.

Sieff CA, Williams DA. Hematopoiesis. En: Blood: Principles and Practice of Hematology. Handin RI, Lux SE, and Stossel TP (Eds) Philadelphia. JB Lippincott, 1995.

Stamey CC, Diamond LK. Congenital hemolytic anemia in the newborn. Am J Dis Child 94: 616-624, 1957.

Steinberg M, Benz E, Adewoye A, Ebert B. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. En: Hematology-Basic principles and practice. Hoffman R, Benz E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J (Eds). Sixth Edition. Philadelphia, Saunders, 2013.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, y col. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. Human Mut 21: 577-581, 2003.

Stevens RF, Evans DIK. Congenital spherocytosis is often not hereditary. Clin Pediatr 20: 47-49, 1981.

Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Hereditary Spherocytosis. Acta Haematol 116: 186-191, 2006.

Streichman S, Gesheidt Y, Tatarsky I. Hypertonic cryohemolysis: a diagnostic test for hereditary spherocytosis. Am J Hematol 35: 104-109, 1990.

Streichman S, Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. Am J Hematol 58: 206-212, 1998.

Suess JS, Limentani D, Dameshek W, Dolloff MJ. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. Blood 3: 1290-1303, 1948.

T

Tamary H, Aviner S, Freud E, et al. High incidence of early cholelithiasis detected by ultrasonography in children and young adults with hereditary spherocytosis. J Pediatr Hematol Oncol 25: 952-954, 2003.

Taylor JJ. Haemolysis in infectious mononucleosis: inapparent congenital spherocytosis. Br Med J 4: 525-526, 1973.

Tchernia G, Delhommeau F, Perrotta S, et al. ESPHI working group on hemolytic anemias. Recombinant erythropoietin therapy as an alternative to blood transfusions in infants with hereditary spherocytosis. Hematol J 1: 146-152, 2000.

Tissieres P, Kernen Y, Gervaix A, Humbert J, Suter S. Varicella zoster virus induced haemolytic crisis in a child with congenital spherocytosis. Eur J Pediatr 159: 788-791, 2000.

Trucco JI, Brown AK. Neonatal manifestations of hereditary spherocytosis. Am J Dis Child 113: 263-270, 1967.

Tse WT, Lux SE. Red blood cell membrane disorders. Br J Haematol 104: 2-13, 1999.

V

Van Kim C, Colin Y, Cartron J. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Reviews 20: 93-110, 2006.

Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Perez G, Nesse A. Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein. Biochimica et Biophysica Acta 1558: 142-150, 2002.

Vota D, Crisp R, Nesse A, Vittori D. Stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. J Cell Biochem 113: 1581-1589, 2012.

Vota D, Maltaneri R, Wenker S, Nesse A, Vittori D. Differential Erythropoietin Action upon Cells Induced to Eryptosis by Different Agents. Cell Biochem Biophys 65: 145-157, 2013.

W

Warang P, Gupta M, Kedar P, Ghosh K, Colah R. Flow Cytometric Osmotic Fragility-An Effective Screening Approach for Red Cell Membranopathies. Cytometry 80B: 186-190, 2011.

Warkentin TE, Barr RD, Ali MA, Mohandas N. Recurrent acute splenic sequestration crisis due to interacting genetic defects: hemoglobin SC disease and hereditary spherocytosis. Blood 75: 266-270, 1990.

Weiss L, Tavassoli M. Anatomical hazards to the passage of erythrocytes through the spleen. Semin Hematol 7: 372-380, 1970.

Westhoff C. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. Semin Hematol 44: 42-50, 2007.

Wintrobe MM. Classification of the anemias on the basis of differences in the size and hemoglobin content of the red corpuscles. Proc Soc Exp Biol Med 27: 1071-1073, 1930.

Wintrobe MM. The size and hemoglobin content of the erythrocyte: methods of determination and clinical application. J Lab Clin Med 17: 889-912, 1931.

Wintrobe MM. Anemia: classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. Arch Intern Med 54: 256-280, 1934.

Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. Cytometry 76B: 135-141, 2009.

Won DI. Flow-Assisted Differential Diagnosis of Hemolytic Anemia with Spherocytosis: A Case Report. Korean J Lab Med 30: 339-344, 2010.

Wood JH, Partrick DA, Hays T, Sauaia A, Karrer FM, Ziegler MM. Contemporary pediatric splenectomy: continuing controversies. Pediatr Surg Int 27: 1165-1171, 2011.

Y

Yamashita H, Kukita J, Ohga S, Nakayama H, Akazawa K, Ueda K. Serum erythropoietin levels in term and preterm infants during the first year of life. Am J Pediatr Hematol Oncol 16: 213-218, 1994.

Yang B, Ma T, Verkman A S. Erythrocyte Water Permeability and Renal Function in Double Knockout Mice Lacking Aquaporin-1 and Aquaporin-3. J Biol Chem 276: 624-628, 2001.

Yang B, Kim J, Verkman A. Comparative efficacy of $HgCl_2$ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA^+ and acetazolamide. FEBS Lett 580: 6679-6684, 2006.

Yawata Y. Band 4.2 Abnormalities in Human Red Cells. Am J Med Sci 307: 190-203, 1994.

Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. Int J Hematol 7: 118-135, 2000.

Yawata Y. Cell Membrane. The Red Blood Cell as a Model. Darmstadt, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

Young LE, Izzo MJ, Platzer RF. Hereditary spherocytosis: I. Clinical, hematologic, and genetic features in 28 cases, with particular reference to the osmotic and mechanical fragility of incubated erythrocytes. Blood 6: 1073-1098, 1951.

Young LE, Izzo MJ, Altman KI, Swisher SN. Studies on Spontaneous In Vitro Autohemolysis in Hemolytic Disorders. Blood 11: 977-997, 1956.

Young N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. Semin Hematol 25: 159-172, 1988.

Z

Zipursky A, Brown E, Palko J, Brown EJ. The erythrocyte differential count in newborn infants. Am J Pediatr Hematol Oncol 5: 45-51, 1983.