

# Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen  
*Volume* **49**

Número  
*Number* **4**

Octubre-Diciembre  
*October-December* **2002**

*Artículo:*

## Las eliptocitosis hereditarias. Correlación morfológica-molecular

Derechos reservados, Copyright © 2002:  
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**Medigraphic.com**

# Las eliptocitosis hereditarias. Correlación morfológica-molecular

## Palabras clave:

Eliptocitosis hereditarias,  
eliptocitosis del Sudeste de Asia,  
membrana eritrocítica.

**Key words:** Hereditary elliptocytosis,  
Southeast Asian ovalocytosis,  
erythrocyte membrane.

Recibido: 30/09/2002

Aceptado: 11/10/2002

Maria Teresa Amador Guerrero,\* Sonia Pérez Vega,\*

Francisco J Estrada,\*\* Manuel Ramos Kuri,\*

Sergio García Tello,\* Joaquín Carrillo-Farga\*

\* Instituto de Hematopatología. Sociedad Anton Van Leeuwenhoek para el Estudio de las Ciencias Biológicas y Exactas.

\*\* Laboratorio de Biología Molecular. Escuela de Medicina. Universidad Panamericana.

## Correspondencia:

Dr. Joaquín Carrillo-Farga.

Instituto de Hematopatología. Sociedad A.V. Leeuwenhoek para el estudio de las Ciencias Biológicas y Exactas.

Tamaulipas No. 131, Col. Cuajimalpa. México D.F. 05000.

jcarillo@avlsoociety.com

## Resumen

El grupo de enfermedades llamadas eliptocitosis hereditarias son causadas por varios defectos moleculares en distintas proteínas de la membrana eritrocítica y, por lo tanto, no corresponden a un grupo homogéneo de entidades, aunque todas tienen en común la presencia de eritrocitos elípticos. Desde el punto de vista morfológico, molecular y clínico, se pueden dividir las eliptocitosis en dos grandes grupos: eliptocitosis hereditaria común y eliptocitosis del Sudeste de Asia, también llamada eliptocitosis melanésica o eliptocitosis estomatocítica. La más frecuente de las dos es la eliptocitosis hereditaria común. En la mayor parte del mundo, la eliptocitosis hereditaria común está presente en una de cada 2,000 a 4,000 personas. La eliptocitosis del Sudeste de Asia parece estar restringida a esa zona geográfica o se encuentra en personas con ancestros directos provenientes de ella. En México no existen estudios sobre la frecuencia de la eliptocitosis hereditaria común, pero, en la experiencia del Instituto de Hematopatología, su frecuencia es cercana a la descrita para otros países. Además, en la población mexicana hemos encontrado varias familias con eliptocitosis del Sudeste de Asia sin antepasados directos de esa región. Las dos formas de eliptocitosis hereditaria se deben a una estructura defectuosa del esqueleto membranoso o de las proteínas de membrana asociadas al esqueleto. Los defectos moleculares

## Summary

185

The group of disorders called collectively "hereditary elliptocytosis" are the result of several molecular defects in different proteins of the red cell membrane, therefore they do not correspond to an homogeneous entity, although all have in common the presence of elliptical red cells. Using morphologic, clinic and molecular criteria, the hereditary elliptocytosis can be divided in two groups: common hereditary elliptocytosis (CHE) and Southeast Asian ovalocytosis (SAO), being the former the most frequent. In almost all countries CHE is present in one of 2000-4000 individuals; in Mexico, the experience of the Institute of Hematopathology shows a similar frequency. SAO appears to be restricted to Southeast Asia or it is found in people with direct ancestors in this region. Interestingly, we have found several mexican mestizo families with typical SAO, who lack any known ancestors from Southeast Asia. Both variants of hereditary elliptocytosis are the result of a defective structure of the red cell membrane skeleton proteins or skeletal-associated integral membrane proteins. In this article, we review the morphologic features of these disorders trying to establish a correlation of morphology with the molecular defects.

más frecuentemente encontrados en estas enfermedades se pueden dividir en tres tipos fundamentales: 1) Defectos en la autoasociación de las alfa y beta espectrinas por defectos tanto en las espectrinas alfa (generalmente mutaciones) como en las cadenas beta (por lo común cadenas truncadas en la zona de asociación). 2) Disminución o anormalidad de la proteína 4.1. y 3) Deleción de los aminoácidos 400 a 408 de la proteína de la banda 3. Las dos primeras alteraciones dan origen a la eliptocitosis hereditaria común en sus formas heterocigota u homocigota. La tercera alteración da origen a la eliptocitosis del Sudeste de Asia. El propósito de este artículo es revisar las alteraciones morfológicas de estas enfermedades y tratar de correlacionarlas con las alteraciones moleculares.

## Introducción

### La estructura de la membrana eritrocítica normal

186

**L**a figura 1 muestra la localización cromosómica de los genes de los dos tipos de espectrinas, de la proteína de la banda 3 y de la proteína de la banda 4.1, que son algunas de las proteínas más abundantes de la membrana del eritrocito.

El esqueleto membranoso normal de los eritrocitos es una estructura en forma de red o malla constituida por aproximadamente 100,000 unidades hexagonales; las porciones laterales de los hexágonos están formadas por moléculas de alfa y beta espectrinas y los vértices por moléculas de actina y otras proteínas. Tanto los vértices (nodos) como las porciones laterales, están unidos a proteínas integrales de la membrana plasmática formando una estructura continua con ésta (*figuras 2 a 7*).

Cada lado del hexágono tiene cuatro moléculas de espectrina, dos alfa y dos beta (*figuras 3 a 7*). Una molécula de alfa espectrina se une lateralmente con una molécula de beta espectrina a través de zonas de nucleación situadas en la porción COOH terminal de la alfa espectrina y NH<sub>2</sub> terminal de la beta espectrina, es decir cerca del vértice o nodo del hexágono, formando un heterodí-

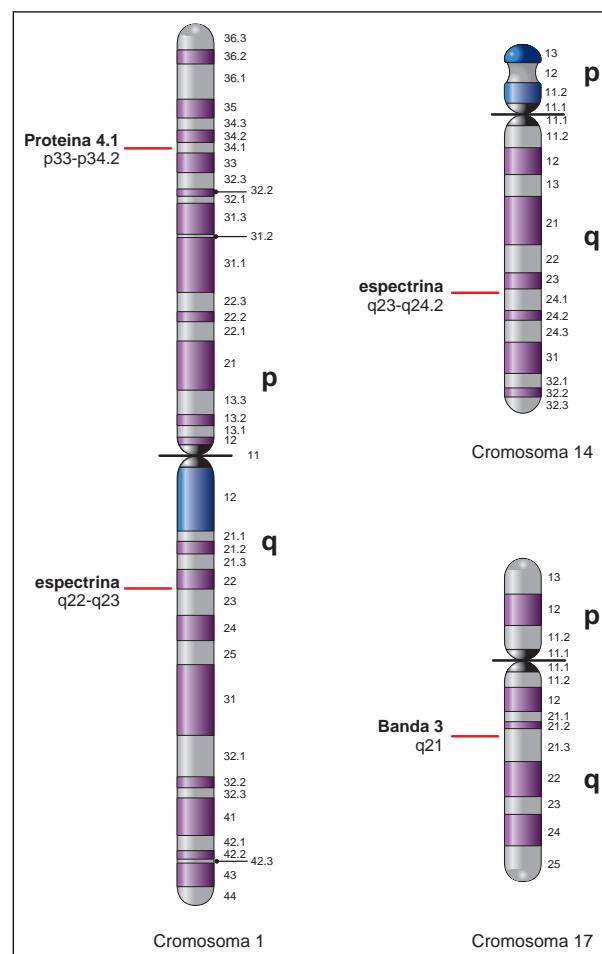
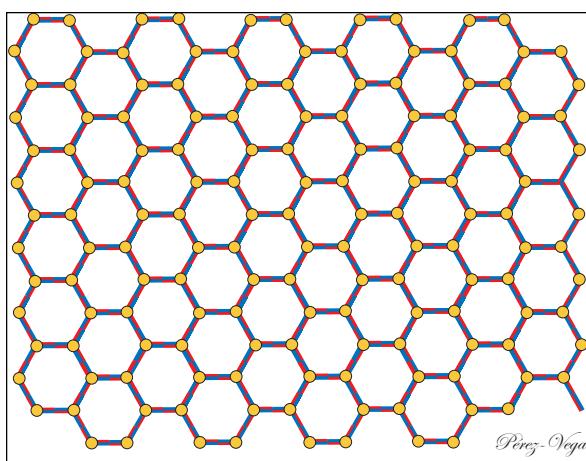
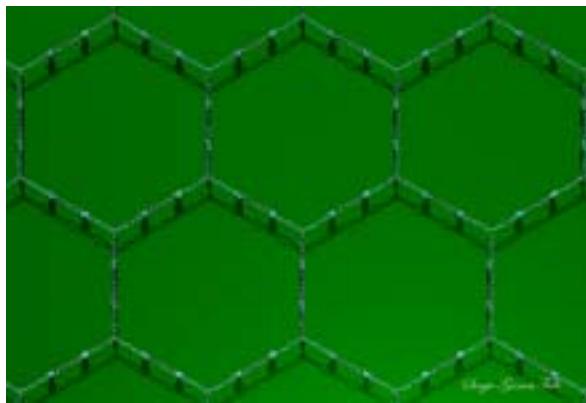


Figura 1. Localización de los genes de las cuatro proteínas más abundantes en la membrana eritrocítica.



**Figura 2.** El esqueleto membranoso del eritrocito es una red de proteínas formada por aproximadamente 100,000 hexágonos, cuyos lados están formados por espectrinas (azul y rojo), y sus vértices (amarillo) por actina y otras proteínas. Esta red está fija a proteínas integrales de la membrana.

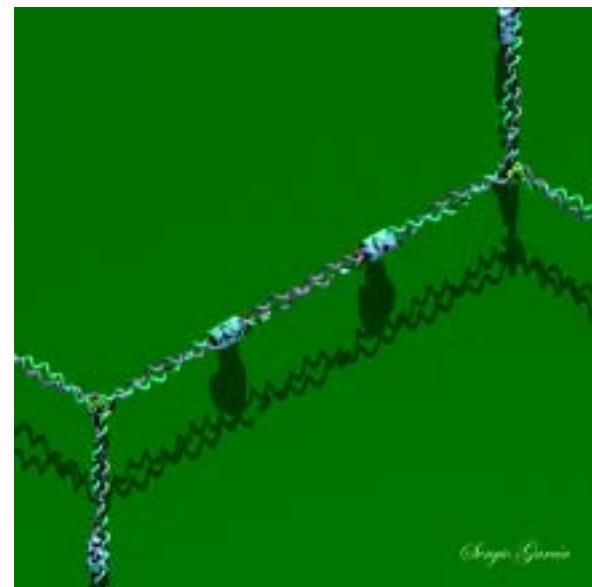


**Figura 3a.** Esquema del esqueleto membranoso visto desde el interior del eritrocito. La red elástica de hexágonos está fija a proteínas incluidas en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (verde).

mero (*figuras 5 a 7*). Por otro lado, en la zona media de cada lado del hexágono, cada molécula de alfa espectrina se une a una molécula de beta espectrina a través de una zona de asociación situada en la porción  $\text{NH}_2$  terminal de la espectrina alfa y la región  $\text{COOH}$  terminal de la cadena beta (cabezas) (*figuras 4 a 7*); la unión de los dos heterodímeros forma un tetramero.

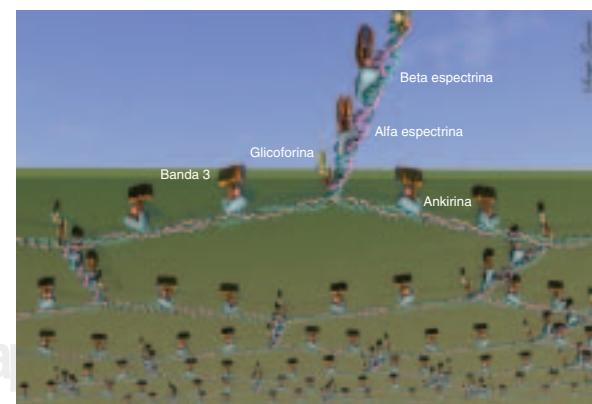
La *figura 7* muestra los pasos en la síntesis y ensamblaje de los diferentes componentes del esqueleto membranoso.

La forma tridimensional de las zonas de asociación y de nucleación y, por lo tanto, el ajuste del acoplamiento entre las moléculas de alfa y beta

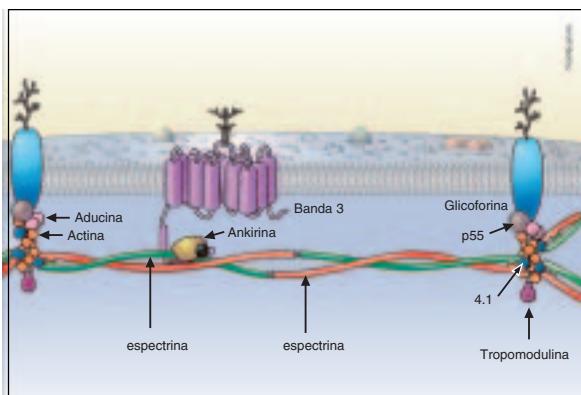


187

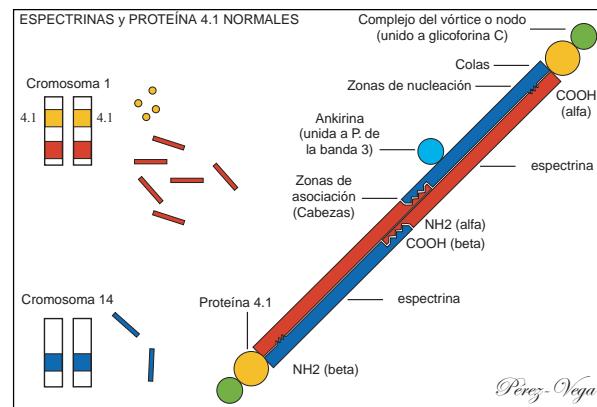
**Figura 3b.** Detalle de los vértices y de un lado de los hexágonos. Las moléculas de espectrina tienen forma de resorte y son elásticas.



**Figura 4.** El esquema es el mismo de la figura 3, pero observado desde otro ángulo. La bicapa lipídica de la membrana plasmática está cortada para observar las proteínas integrales incluidas en ella y fijas a la red del esqueleto.

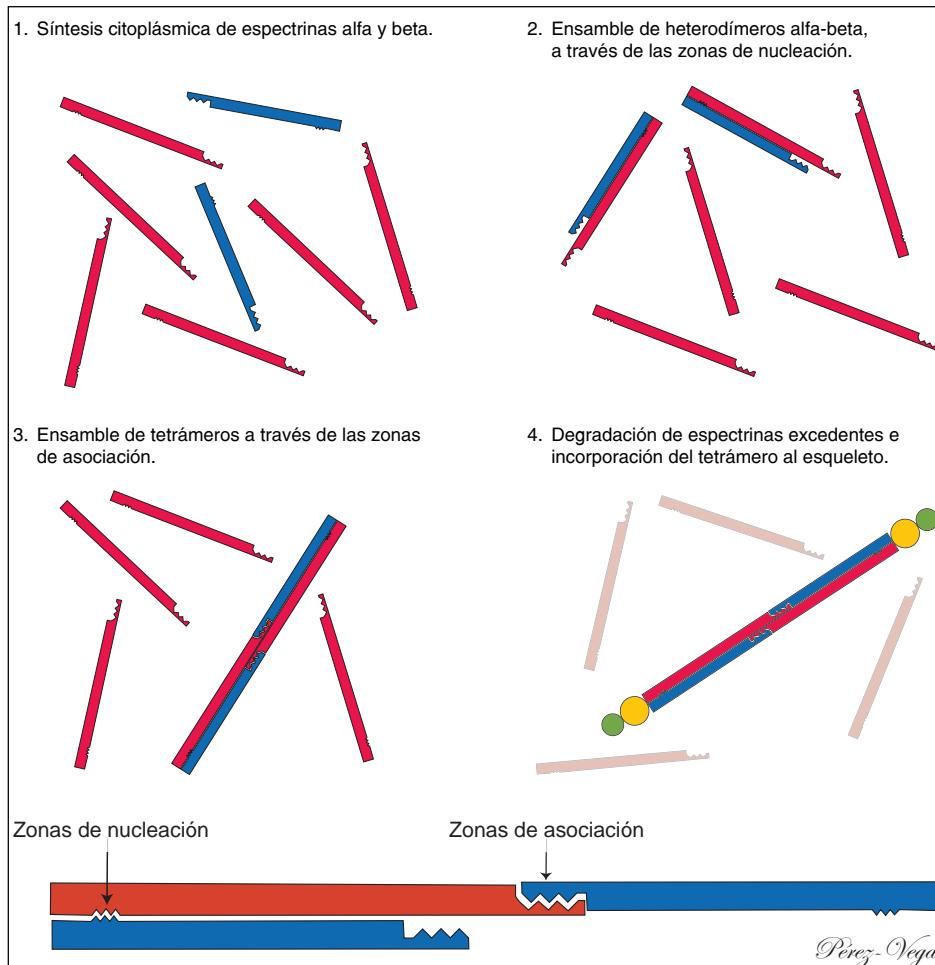


**Figura 5.** Los complejos proteicos de los vértices están unidos a la glicoforina C; mientras que, en las porciones laterales del hexágono, la beta espectrina se une a la proteína de la banda 3 a través de la ankirina.



**Figura 6.** Esquema de un lado del hexágono del esqueleto membranoso unido a dos vértices. Los dos genes para alfa espectrina producen de tres a cuatro veces más moléculas que los correspondientes para beta espectrina. La proteína 4.1 fija las "colas" de las espectrinas al complejo del vértice.

188

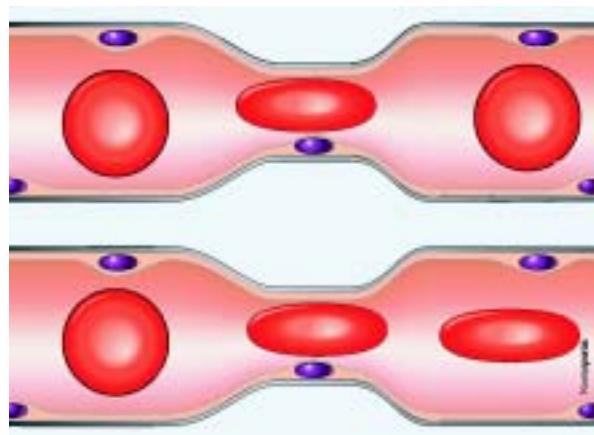


**Figura 7.** El esquema muestra las etapas en la síntesis y asociación de espectrinas, así como las zonas de nucleación, a través de las cuales se forman los heterodímeros. También se muestran las zonas de asociación por las que dos heterodímeros se unen para formar un tetrámero.

espectrina, tanto en la zona lateral como en la zona terminal, dependen de la secuencia de aminoácidos en estas regiones de las moléculas.

Las porciones laterales de los hexágonos están unidas a la membrana plasmática a través de la molécula de beta espectrina que, en una zona cercana a la zona de asociación, se une a otra proteína del esqueleto llamada ankirina, que a su vez se une a una proteína integral de la membrana llamada proteína de la banda 3 o intercambiadora de aniones del eritrocito (AE1; Anion Exchanger 1) (*figuras 4 a 6*).

Los extremos NH<sub>2</sub> de la beta espectrina y COOH de la alfa espectrina (colas) se unen a los vértices o nodos de los hexágonos formados por varias proteínas (complejos de unión). Los complejos de unión están constituidos por varias moléculas de actina que forman un pequeño agregado polimérico (dos cadenas de seis a siete monómeros cada una) que rodea una molécula de tropomiosina; en los vértices existen también moléculas de proteína 4.1, tropomodulina, aducina, dematina, y proteína p55 (*figuras 5 y 6*). Las porciones NH<sub>2</sub> terminales de la beta espectrina

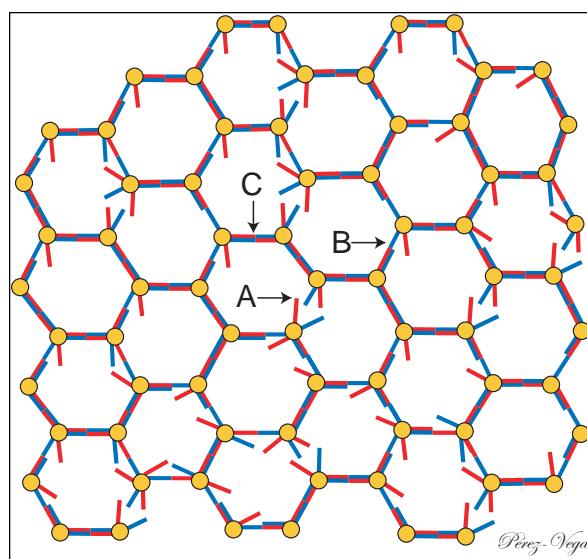


**Figura 8.** Los eritrocitos normales, gracias a su esqueleto elástico, pueden deformarse al pasar por vasos de pequeño calibre, volviendo posteriormente a su forma normal (parte superior). En la eliptocitosis hereditaria, el eritrocito deformado queda fijo en la forma alargada al reorganizarse el esqueleto membranoso (parte inferior).

tienen sitios de unión para actina y para proteína 4.1 (*figuras 5 y 6*).

Este complejo de proteínas está unido, posiblemente a través de la proteína p55, a una molécula integral de membrana, la glicoforina C (*figuras 4 y 5*). Por lo tanto, las proteínas del esqueleto membranoso no sólo están unidas entre ellas, sino a dos proteínas integrales de membrana: la proteína de la banda 3 y la glicoforina C.

Las moléculas de espectrina tienen forma de resorte y de hecho son elásticas, pudiendo estirarse y contraerse pasivamente (*figuras 3, 4 y 5*). El esqueleto membranoso completo tiene forma de disco bicóncavo, por lo que la membrana, que incluye la bicapa de fosfolípidos y proteínas unidas al esqueleto, toma también esta forma. Siendo elástico el esqueleto, el eritrocito puede deformarse pasivamente, por ejemplo al atravesar un vaso sanguíneo pequeño, y volver posteriormente a su forma normal (*figura 8*).



**Figura 9.** En los pacientes heterocigotos para espectrinas con defecto en la zona de asociación (eliptogénicas), más o menos la mitad de las uniones son defectuosas. Como las espectrinas anormales se incorporan al azar al esqueleto, existen lados de los hexágonos con las dos zonas de asociación defectuosas (A), lados con una zona anormal (B), o lados con las dos zonas de asociación normales (C).

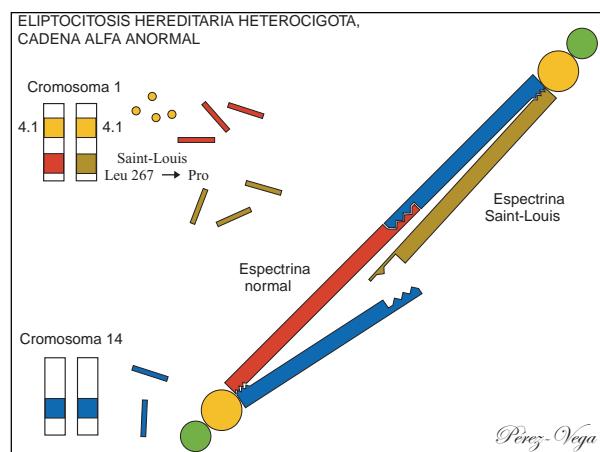
## Las eliptocitosis hereditarias

### Defectos de espectrina en el estado heterocigoto

El primer grupo molecular de eliptocitosis hereditarias está constituido por enfermedades en las que existen defectos en las zonas de asociación terminal de las moléculas de alfa y beta espectrinas y, básicamente, consisten en mutaciones en las porciones del gen que codifican para los aminoácidos de las "cabezas" de las moléculas, lo que determina un cambio en la estructura tridimensional de la zona de asociación y, por lo tanto, un mal ajuste, que trae como consecuencia la debilidad o rompimiento de estas uniones; como resultado, las porciones laterales de los hexágonos se debilitan o rompen, lo que desestabiliza en mayor o menor grado el esqueleto (*figura 9*).

Existe una diferencia entre las moléculas de alfa y beta espectrina: en las primeras, el extremo amino (el inicio de la molécula) se encuentra en la zona de asociación terminal, es decir el aminoácido número 1 se encuentra en esta región y el últi-

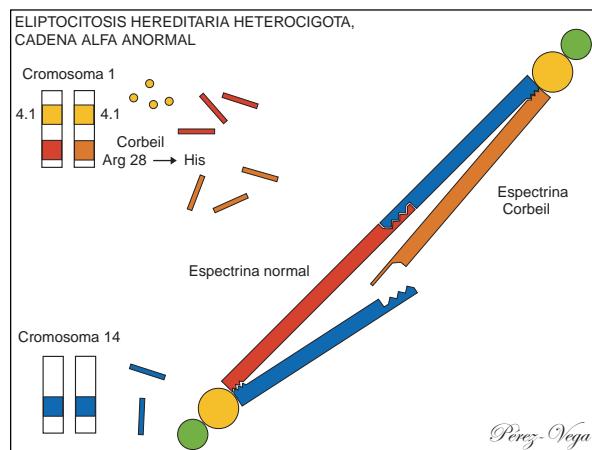
190



**Figura 11.** En la alfa espectrina eliptogénica Saint-Louis, el cambio de la leucina 267 por prolina ocasiona un grado de desajuste severo, pero menor que en la alfa espectrina Corbeil.

mo aminoácido (COOH terminal) en la zona adyacente a los vértices de los hexágonos; en cambio, en la beta espectrina, el aminoácido número 1 se encuentra en la zona de unión con el vértice, mientras que el último aminoácido se encuentra en la zona de asociación terminal (*figura 6*). Por lo tanto, los defectos que dan origen a eliptocitosis hereditaria son mutaciones en los primeros aminoácidos de la alfa espectrina o de los últimos de las beta espectrinas.

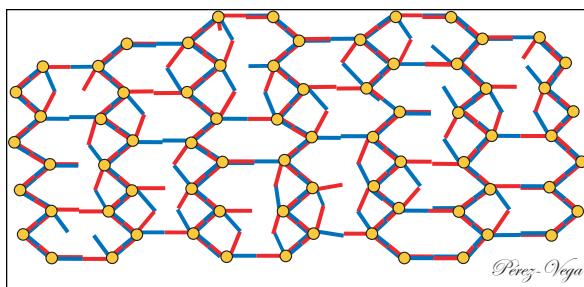
Se han descrito numerosas mutaciones que originan defectos de asociación en las porciones terminales tanto de las alfa como de las beta espectrinas. Dependiendo del tipo de mutación, el cambio tridimensional de la molécula y, por lo tanto, el grado de desajuste son distintos; por ejemplo, los cambios en el aminoácido 28 de la alfa espectrina alteran de manera notable la capacidad de autoasociación: en la espectrina alfa Corbeil, el cambio de la arginina 28 por histidina produce una notable alteración tridimensional de la porción terminal de la molécula, lo que hace que su unión con la beta espectrina sea muy defectuosa (*figura 10*). Por otro lado, en la alfa espectrina Saint Louis, el cambio de la leucina 207 por prolina ocasiona una menor alteración de la estructura tridimen-



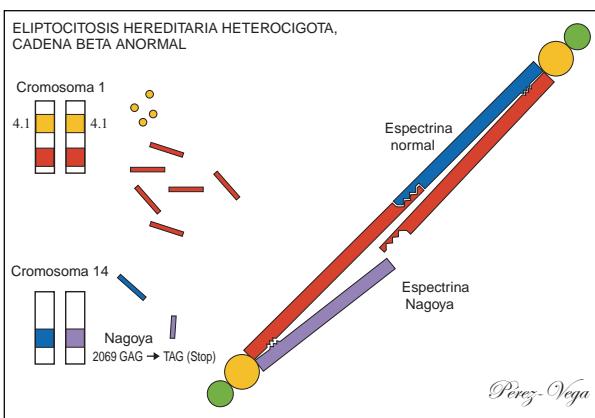
**Figura 10.** En la alfa espectrina Corbeil, el cambio de la arginina 28 por histidina produce una zona de asociación muy anormal con la beta espectrina. En el estado heterocigoto, aproximadamente la mitad de las espectrinas incorporadas al esqueleto son anormales (eliptogénicas) y la otra mitad normales.

sional y el desajuste no es tan marcado como en el caso anterior (*figura 11*). En la alfa espectrina Ponte de Sór, el cambio de la glicina 151 por ácido aspártico produce una alteración tridimensional mucho menor en la zona de asociación y, por lo tanto, un grado de desajuste menor que con las espectrinas Corbeil y Saint-Louis.

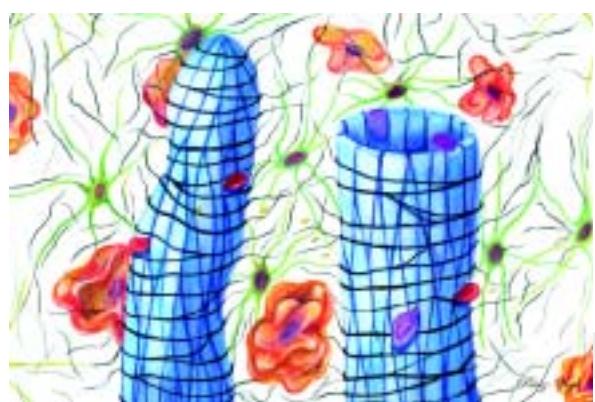
Los defectos en la beta espectrina también pueden consistir en cambios de aminoácidos; por ejemplo, el cambio de la alanina 2018 por glicina (espectrina Cagliari), ocasiona una alteración tri-



**Figura 14.** Esqueleto membranoso de un eliptocito en la eliptocitosis heterocigota. Cuando las espectrinas no se unen correctamente en la zona de asociación y el esqueleto es deformado, las moléculas se sueltan y se reacomodan en una posición de menor estrés tensional, de tal manera que la forma del esqueleto y, por lo tanto, de la célula quedan modificadas.



**Figura 12.** En la beta espectrina eliptogénica Nagoya, un codón de terminación prematuro ocasiona una cadena beta truncada en su zona de asociación con la alfa espectrina.



**Figura 13.** En el esquema se observan algunos eritrocitos (rojo), situados en los cordones de Billroth del bazo, iniciando su penetración a los sinusoides (azul) a través de las estrechas rendijas existentes entre sus células endoteliales.

dimensional en la zona de asociación terminal con la molécula de alfa espectrina. Sin embargo, en la beta espectrina, son frecuentes las mutaciones que dan origen a un codón de terminación prematuro, por lo que la porción terminal de la molécula (que es la zona de asociación terminal) queda amputada y, por lo tanto, no puede asociarse con la molécula de alfa espectrina. Por ejemplo, en la espectrina Nagoya, el codón 2069 (GAG) muta por TAG que es un codón de terminación (*figura 12*).

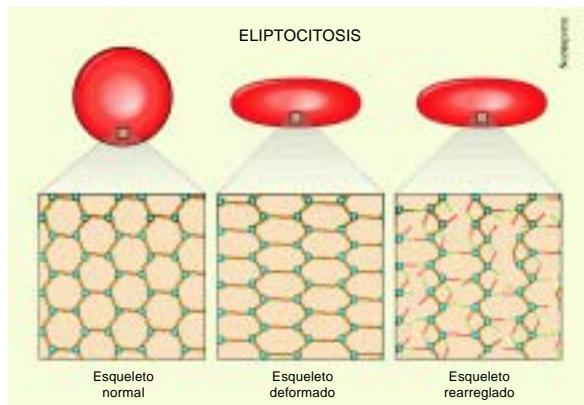
El número de mutaciones tanto en cadenas alfa como en cadenas beta es grande y crece cada vez más; los casos que hemos descrito son sólo ejemplos representativos.

La consecuencia de estas mutaciones es distinta si el paciente es heterocigoto o es un homocigoto (o más frecuentemente que un homocigoto, un doble heterocigoto). Las mutaciones son tan variables que es raro encontrar un verdadero homocigoto; casi todos los casos de "homocigotos" descritos son en realidad dobles heterocigotos.

En los pacientes heterocigotos para los defectos mostrados, aproximadamente la mitad de las moléculas de espectrina no pueden unirse en forma apropiada con su contraparte en la porción de la cabeza; la otra mitad lo hacen correctamente; como las espectrinas anormales se distribuyen al azar, el desajuste en las porciones laterales de los hexágonos

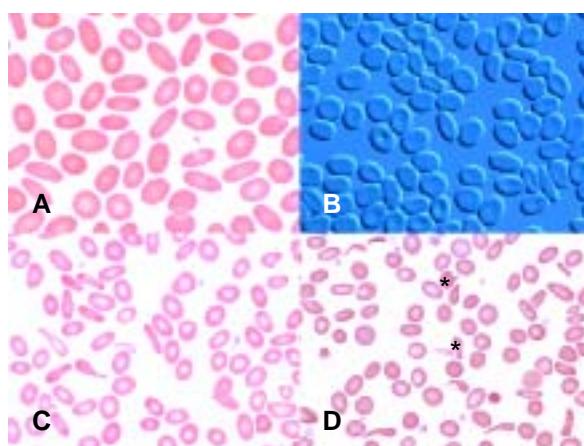
puede afectar las dos zonas de asociación (A), una sola de ellas (B), o ninguna (C) (*figura 9*).

Como hemos visto el esqueleto membranoso normal es una estructura elástica; las moléculas de espectrina tienen forma de resorte y pueden

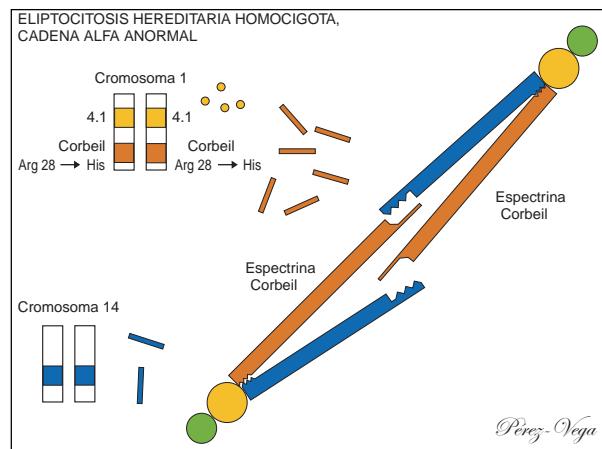


**Figura 15.** Esquema que muestra cómo en la eliptocitosis heterocigota se produce la deformación del esqueleto con la ruptura de las uniones entre las espectrinas y su posterior reacomodo en una nueva forma.

192



**Figura 16.** A) Eliptocitosis hereditaria heterocigota común. Se observan exclusivamente eliptocitos. B) Eliptocitosis hereditaria heterocigota común. Células en vivo con microscopía de contraste interferencial diferencial según Nomarski. C) Eliptocitosis hereditaria heterocigota + alfa espectrina LELY. Además de los eliptocitos se observan algunos poliquilocitos. D) Eliptocitosis hereditaria homocigota. Se observan abundantes poliquilocitos y eritrocitos en gemación.



**Figura 17.** Eliptocitosis homocigota (Corbeil). En la forma homocigota de la eliptocitosis hereditaria todas las espectrinas son eliptogénicas (tienen una zona de asociación anormal que produce un desajuste en todas las uniones del esqueleto).

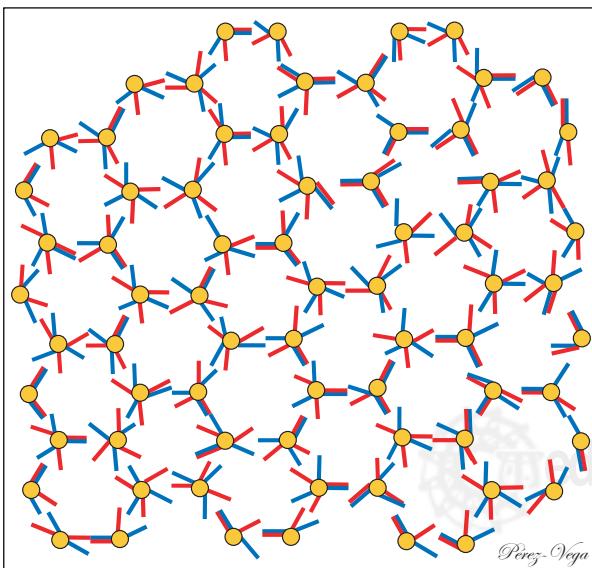
estirarse y encogerse pasivamente, permitiendo la deformación del esqueleto y del eritrocito cuando éste atraviesa zonas estrechas, como capilares de pequeño calibre (*figura 8*) o como cuando entra a los sinusoides esplénicos desde los cordones de Billroth (*figura 13*). Aunque el esqueleto se deforme, al cesar el fenómeno que lo deforma pasivamente, vuelve a recobrar su forma debido a su elasticidad (*figura 8*). Sin embargo, cuando los lados de los hexágonos del esqueleto están mal unidos, al producirse una tensión mayor en las zonas de asociación durante el estiramiento del esqueleto, éstas se sueltan y se reacomodan en una posición de menor estrés tensional, quedando el esqueleto y la célula deformados de manera elíptica (*figuras 8, 14 y 15*).

Dicho de otra manera, en la circulación los eritrocitos son deformados en sentido longitudinal por el flujo sanguíneo pero normalmente regresan a su forma de disco (*figura 8*). Sin embargo, en los pacientes con eliptocitosis hereditaria heterocigota, por el fenómeno descrito en el párrafo anterior, no vuelven a su forma normal y quedan fijados en la forma elíptica (*figuras 8 y 14 a 16*). Los eritrocitos no son elípticos cuando salen de la médula ósea,

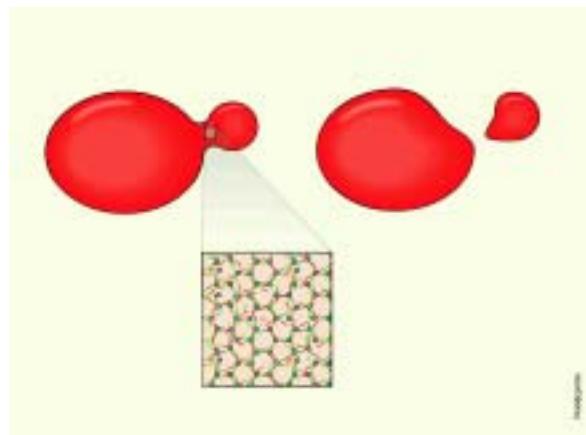
sino que adquieren la deformación a medida que transcurre su vida en la circulación periférica.

Los eliptocitos, a causa de su esqueleto mal unido en las zonas de asociación, son ligeramente menos deformables y más frágiles que los eritrocitos normales, por lo que estos pacientes tienen mínima hemólisis que su médula ósea puede compensar totalmente, por lo que no tienen anemia. Su biometría hemática y los histogramas de volumen y concentración de hemoglobina son totalmente normales. La hemólisis es detectable sólo por la presencia de reticulocitosis y por la disminución de haptoglobina, que es un indicador muy sensible de ella.

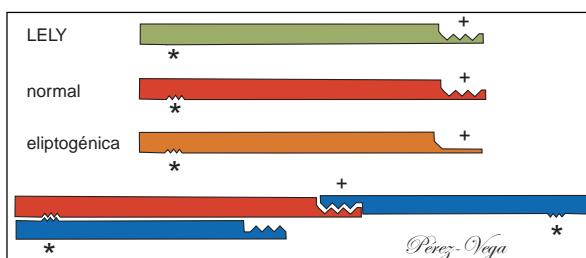
Los pacientes con estos tipos de eliptocitosis heterocigota son totalmente asintomáticos o pueden mostrar mínima ictericia por aumento de bilirrubina indirecta secundaria al aumento de catabolismo de protoporfina; sólo ocasionalmente tienen mínima esplenomegalia. En los frotis sanguíneos se observan numerosos eritrocitos elípticos con distinto grado de alargamiento y sin poiquilocitosis (*figuras 16 a, b*). Generalmente estos pacientes tienen clínicamente lo que se denomina



**Figura 18.** En las formas homocigotas de eliptocitosis, todas las zonas de asociación carecen de un ajuste normal.



**Figura 19.** Eliptocitosis homocigota. El desajuste de todas las zonas de asociación entre espectrinas origina que los eritrocitos se fragmenten por gemación, con destrucción total de la célula o con formación de poiquilocitos.



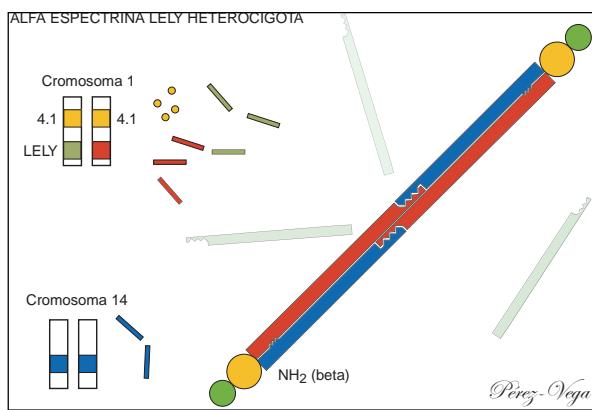
193

**Figura 20.** La espectrina alfa LELY tiene una zona de nucleación (\*) defectuosa, lo que resulta en una desventaja al formarse heterodímeros, que las cadenas beta forman preferentemente con otras cadenas alfa con zonas de nucleación normales (aunque las zonas de asociación sean defectuosas, como en las alfa espectrinas eliptogénicas).

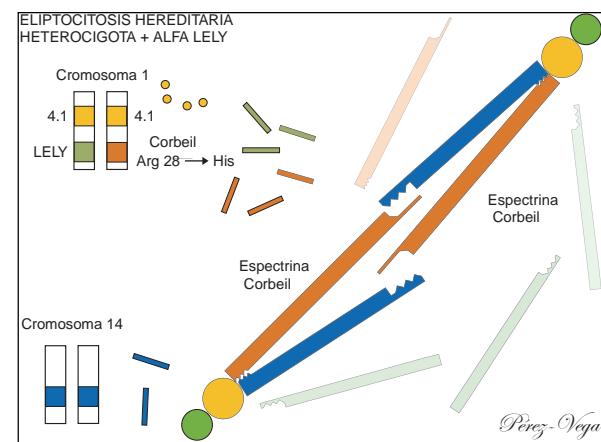
\* Zonas de nucleación. + Zonas de asociación.

eliptocitosis hereditaria común con hemólisis mínima (ver clasificación clínica).

Aquellos pacientes heterocigotos para defectos en los que la capacidad de unión de la espectrina sólo está ligeramente disminuida (por ejemplo, la alfa espectrina Ponte de Sôr), frecuentemente tienen sólo ocasionales eliptocitos o ninguno en lo absoluto. Estos pacientes se describen clínicamente en la siguiente sección como portadores silenciosos.

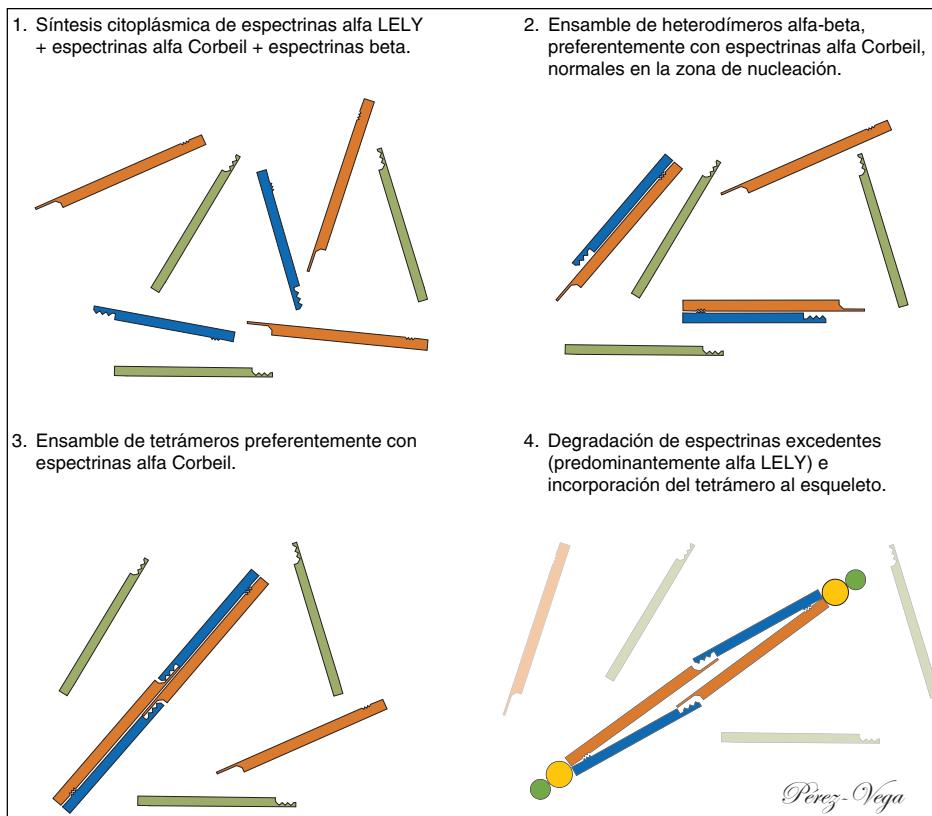


**Figura 21.** Las espestrinas alfa LELY, al tener una zona de nucleación defectuosa, tienen menor posibilidad de formar heterodímeros —y por lo tanto de quedar incluidas en la membrana— que las alfa espestrinas normales. Ejemplo: alfa espestrina normal (I) + alfa espestrina normal (II): 50%/50%, alfa espestrina normal + alfa espestrina LELY: 65%/35%. Sin embargo, cuando las espestrinas LELY se logran incorporar, funcionan como si fueran normales porque su zona de asociación es normal.

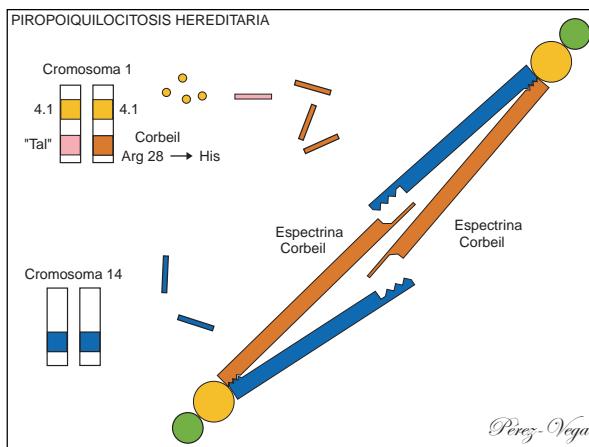


**Figura 23.** Estado doble heterocigoto para una espestrina eliptogénica y alfa espestrina LELY. Existe un ligero aumento en la posibilidad de que la espestrina eliptogénica se incorpore al esqueleto porque ésta tiene zonas de nucleación normales.

194



**Figura 22.** El doble heterocigoto para una alfa espestrina eliptogénica y una alfa espestrina LELY tiene más alfa espestrinas eliptogénicas incorporadas a la membrana, pues, al tener las últimas zonas de nucleación normales, tienen una ventaja ligera sobre las alfa espestrina LELY para formar heterodímeros. Ejemplo: alfa espestrina eliptogénica + alfa espestrina normal: 50%/50%, alfa espestrina eliptogénica + alfa espestrina LELY: 65%/35%.



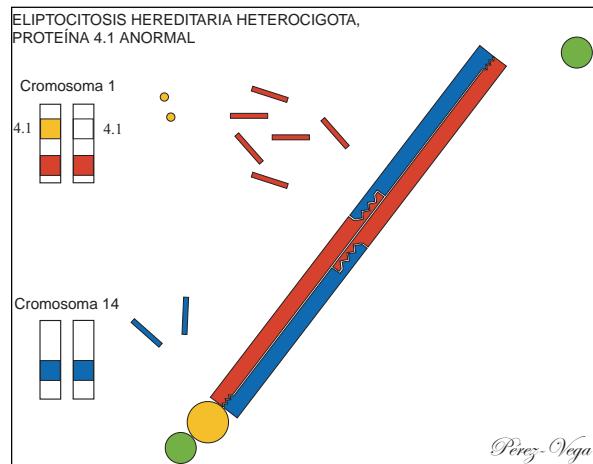
**Figura 24.** En la piropoiquilocitosis hereditaria, y aunque el sujeto es sólo heterocigoto para una alfa espestrina eliptogénica, la mayor parte de las alfa espestrinas incorporadas a la membrana son eliptogénicas porque el otro gen para alfa espestrina no produce cadenas o produce muy pocas. Ejemplo: alfa espestrina eliptogénica + alfa espestrina normal: 50%/50%, alfa espestrina eliptogénica + alfa espestrina "tipo talasémico": 95%/5%.

### Defectos de espestrina en el estado homocigoto

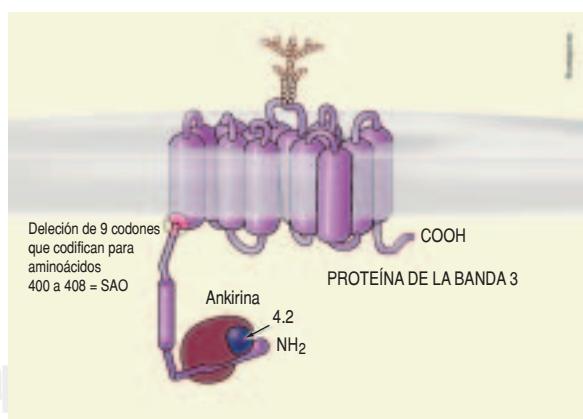
Los pacientes homocigotos o dobles heterocigotos para alfa espestrinas eliptogénicas tienen un mal acoplamiento en todas sus zonas de asociación (*figuras 17 y 18*) y la gravedad de la enfermedad dependerá del tipo de mutación de las espestrinas y, por lo tanto, del grado de desajuste. Por ejemplo, un paciente homocigoto para una alfa espestrina con muy mala capacidad de asociación con la beta espestrina, como por ejemplo la espestrina Corbeil, tendrá muy mal ajuste en todas las uniones (*figura 17*).

El resultado es que, aparte de formarse eliptocitos, muchos de los eritrocitos tienen zonas de esqueleto membranoso muy desestabilizado que geman dando origen a una gran cantidad de poiquilocitos (*figuras 16d y 19*). Estos pacientes tienen hemólisis muy severa no compensada que puede ser incluso mortal, con niveles de hemoglobina tan bajos como 2 g/dL. Sin embargo, el grado de hemólisis, de anemia y la cantidad de poiquilocitos

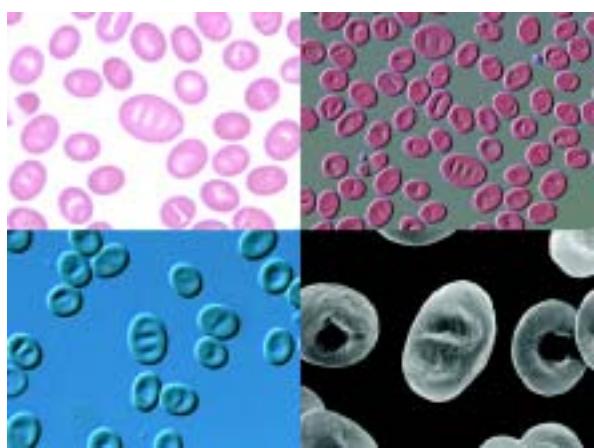
dependerá, en los homocigotos o dobles heterocigotos, de la severidad del desajuste; por ejemplo, un homocigoto para espestrina Pont de Sôr, cuyo grado de desajuste es mínimo, posiblemente tendrá eliptocitos, escasos poiquilocitos y hemólisis sólo ligeramente descompensada y, por lo tanto, parecerá un heterocigoto para un defecto más grave,



**Figura 25.** Cuando existe disminución o mala función de la proteína 4.1 en estado heterocigoto, la mitad de las uniones de las porciones laterales de los hexágonos con los vértices son débiles, produciéndose cambios similares a los de las eliptocitosis por defectos en las espestrinas.



**Figura 26.** En la eliptocitosis del Sudeste de Asia (*Southeast Asian ovalocytosis: SAO*), existe una delección de los nueve codones que codifican para los aminoácidos 400 a 408, en la zona de entrada de la proteína a la bicapa lipídica de la membrana.



**Figura 27.** Eliptocitos estomatocíticos en un caso mexicano de eliptocitosis del Sudeste de Asia observados con campo claro (imágenes superiores), microscopía de Nomarski (inferior izquierda) y microscopía electrónica de barrido (inferior derecha).

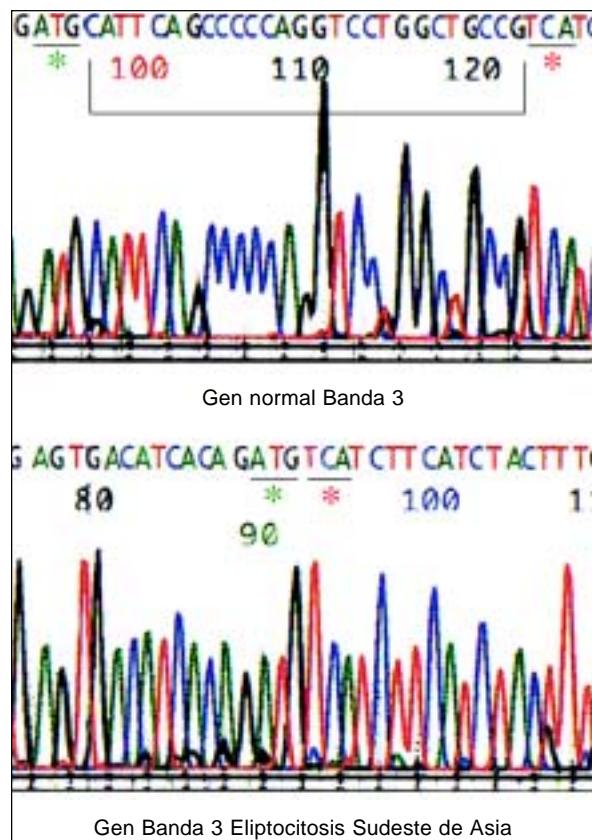
por ejemplo clínicamente puede tener el cuadro de eliptocitosis hereditaria común con hemólisis crónica con la diferencia que sus padres posiblemente sólo tendrán cambios mínimos.

Debido a la gran variedad de mutaciones, que producen zonas de asociación con un grado de desajuste muy variado, los homocigotos o dobles heterocigotos pueden tener una gama muy amplia de severidad, que va desde niveles de hemoglobina alrededor de 2 g/dL hasta niveles casi normales y desde frotis con abundantísimos poiquilocitos y pocos eliptocitos reconocibles hasta frotis con muchos eliptocitos y pocos o ningún poiquilocito.

### Espectrina LELY

En ocasiones, dentro de una misma familia, se encuentran individuos heterocigotos con diferentes grados de afección; por ejemplo, un individuo puede tener en el frotis exclusivamente eliptocitos con mínima hemólisis compensada, mientras que otro, heterocigoto para el mismo gen, puede tener algunos poiquilocitos además de los eliptocitos (*figura 16c*) y un mayor grado de hemólisis, posiblemente no totalmente compensada.

Una de las posibles explicaciones de estos casos es la siguiente: en 20 a 30% de la población humana "normal" uno de los dos genes de alfa espectrina no es totalmente normal y produce una espectrina llamada alfa LELY (*low expression alpha-spectrin allele*). Esta espectrina tiene una zona de asociación normal con la beta espectrina en su porción terminal. Sin embargo, la zona de nucleación lateral para formar el dímero con la cadena de beta espectrina no es normal a causa de la delección de 6 aminoácidos en esta zona (*figura 20*), lo que ocasiona que esta molécula ten-



**Figura 28.** Parte de las secuencias del gen de la proteína de la banda 3 normal comparada con la proteína de la banda 3 en un paciente mexicano con eliptocitosis del Sudeste de Asia. En el gen normal, el triplete ATG (asterisco verde) está separado del triplete TCA (asterisco rojo) por 27 bases; en el gen anormal, los dos tripletes son consecutivos por la delección de las 27 bases intermedias, que codifican normalmente para los aminoácidos 400 a 408.

ga, durante el ensamble de los heterodímeros, menos posibilidades que la otra molécula normal de alfa espectrina para unirse al esqueleto (*figuras 21 y 22*); las moléculas de espectrina LELY que no se unen al esqueleto quedan libres y son degradadas proteolíticamente en el citoplasma. Los heterocigotos, sin embargo, no tienen alteración alguna porque las moléculas de alfa espectrina se producen en cantidades tres a cuatro veces mayores que las de beta espectrina (*figura 21*), por lo que las cadenas que restan son suficientes para formar un esqueleto normal.

Sin embargo, cuando una persona hereda de uno de sus padres un gen para una alfa espectrina anormal, que produce eliptocitosis, y del otro un gen de alfa espectrina LELY, la primera, que tiene zonas de nucleación lateral normales para formar el dímero con la beta espectrina, tiene una ventaja, al formarse los heterodímeros, sobre la alfa espectrina LELY que no se une tan eficazmente y que, como se dijo, queda libre y es degradada en el citoplasma. Esto ocasiona que el porcentaje de alfa espectrinas anormales (eliptogénicas), que quedan en el esqueleto, sea mayor que 50% del esperable en el heterocigoto (por ejemplo, 65%) (*figuras 22 y 23*), por lo que el esqueleto tiene mayor porcentaje de porciones laterales de los hexágonos mal unidos que en los heterocigotos comunes. Esto ocasiona que, además de formarse eliptocitos, existan zonas en el eritrocito con muy mal ensamble del esqueleto membranoso; en estas zonas se produce gemación del eritrocito, perdiéndose porciones más o menos grandes del citoplasma y formándose algunos poiquilocitos (*figura 16c*).

El grado de hemólisis es mayor en estos casos y el aumento de eritropoyesis medular puede o no compensar la hemólisis completamente. Estos pacientes tienen clínicamente eliptocitosis hereditaria común con hemólisis crónica (ver sección clínica).

En estos pacientes uno de los padres tiene eliptocitosis heterocigota típica, con menos hemólisis y sin poiquilocitos, mientras que el otro es completamente normal.

### Piropoiquilocitosis hereditaria

La piropoiquilocitosis hereditaria es, en realidad, una forma de eliptocitosis peculiar. Los pacientes tienen un cuadro que no puede ser distinguido de las formas graves de eliptocitosis homocigota; con la notable excepción de que, cuando se estudia a los padres, se encuentra que sólo uno de ellos tiene eliptocitosis heterocigota, mientras que el otro es completamente normal fenotípicamente, aunque heterocigoto para alfa espectrina LELY.

Se ha demostrado, sin embargo, que el parente normal es heterocigoto para un gen de alfa espectrina de tipo "talasémico", esto es, con una mutación que ocasiona una notable disminución o ausencia de RNAm funcional. Esta persona es completamente normal porque las cadenas de alfa espectrina se producen en cantidades tres o cuatro veces mayor que las de beta espectrina; por lo que, si un gen no produjera incluso nada de RNAm, el otro transcribiría suficiente RNA para formar todavía más cadenas alfa que las beta producidas por dos genes funcionantes.

Sin embargo, si una persona hereda de un parente un gen que produce una cadena alfa eliptogénica y del otro un gen en "trans" de tipo "talasémico", las cadenas de alfa espectrina anormal ahora no tendrán casi competencia para entrar a formar parte del esqueleto y, en lugar de que aproximadamente la mitad de las uniones sean anormales, ahora lo serán hasta en 100% (*figura 24*), dependiendo del grado de disminución en la producción de alfa espectrinas por el gen de tipo talasémico.

El resultado es que los pacientes tienen un cuadro clínico y de laboratorio que no es diferenciable del de un homocigoto. La hemólisis y anemia son severas en estos casos, y el frotis muestra pocos eliptocitos, muchos poiquilocitos y esferocitos por las mismas razones que en los pacientes homocigotos. En la práctica, el diagnóstico diferencial se establece al estudiar a los padres: en la eliptocitosis homocigota ambos padres tienen eliptocitosis heterocigota, mientras que en la piropoiquilocitosis hereditaria uno de los padres tiene eliptocitosis mientras que el otro es normal.

## Deficiencia o anormalidad de la proteína 4.1

Como hemos visto, la proteína 4.1 forma parte del complejo de unión de los nodos y la beta espestrina tiene zonas de unión para ella en su extremo  $\text{NH}_2$ ; la proteína probablemente estabiliza las uniones de las colas de las espestrinas y el complejo de unión.

En los pacientes heterocigotos para deficiencia de esta proteína, o en los que forman una proteína no funcional, la mitad de las uniones de las "colas" de las espestrinas con los complejos de unión son débiles, produciéndose un fenómeno muy similar a los defectos de unión de las "cabezas" de espestrinas, sólo que ahora la zona débil no se encuentra a la mitad de la región lateral de los hexágonos, sino en la zona de los vértices (*figura 25*). Las consecuencias desde el punto de vista celular y clínico son idénticas a las de los pacientes con un defecto heterocigoto de espestrina. En los frotis se encuentran eliptocitos, con pocos o ningún poiquilocito, y los pacientes tienen un cuadro clínico indistinguible de la eliptocitosis hereditaria común con hemólisis mínima.

Por otra parte, en los pacientes homocigotos para deficiencia de proteína 4.1, existe desestabilización mucho mayor de las uniones de espestrina con los complejos de unión. Los pacientes tienen cuadro clínico y de laboratorio indistinguible de la eliptocitosis hereditaria común homocigota.

En estos casos, sólo el estudio molecular puede establecer la diferencia con las eliptocitosis causadas por alteraciones en las espestrinas.

## Clasificación clínica

Desde el punto de vista clínico (independiente de la clasificación molecular que hemos visto), la eliptocitosis hereditaria común puede dividirse en los siguientes grupos.

## Portadores silenciosos

Generalmente estos pacientes son heterocigotos para una alfa espestrina eliptogénica con características de unión no muy anormales, por ejemplo, la espestrina Pont de Sôr.

Estos pacientes son totalmente asintomáticos clínicamente y su biometría y la morfología del frotis son normales. Los pacientes han sido estudiados por ser familiares de individuos con eliptocitosis o piropoiquilocitosis hereditaria, y se han encontrado en ellos defectos sutiles del esqueleto membranoso eritrocítico que son los siguientes:

- Disminución de la estabilidad térmica de los eritrocitos.
- Disminución de la estabilidad mecánica de esqueletos membranosos aislados.
- Mapas anormales de péptidos de espestrina obtenidos por tripsinización.
- Aumento en el porcentaje de dímeros de espestrina obtenidos por extracción a  $0^\circ\text{C}$ , esto es, se forman más dímeros que tetrámeros.

Es muy interesante que algunos de estos sujetos aparentemente normales tienen la misma alteración molecular que pacientes que sí tienen eliptocitos en el frotis y tienen un cuadro de eliptocitosis hereditaria mínima.

## Eliptocitosis hereditaria común con hemólisis mínima

Ésta es la forma clínica más común. La mayoría de los pacientes son asintomáticos, pues aunque tienen numerosos eliptocitos en el frotis; éstos tienen una supervivencia normal o ligeramente disminuida. Sin embargo, esta hemólisis mínima generalmente está compensada, por lo que los pacientes no tienen anemia, aunque raramente pueden tener esplenomegalia.

La mínima hemólisis compensada se manifiesta por aumento de reticulocitos y disminución de haptoglobina, que es una prueba muy sensible de hemólisis.

En el frotis se encuentran más de 30% de eliptocitos y con frecuencia hasta 100% de los eritrocitos son elípticos. La mayor parte de los eritrocitos son elipses regulares y homogéneas, existen muy escasos poiquilocitos o eritrocitos en gemación y no se observan esferocitos (*figuras 16a, b*). La biometría hemática es normal.

En general, el diagnóstico es sencillo, pues los eliptocitos son abundantes, homogéneos y normocíticos normocrómicos, lo que los distingue de los macro-ovalocitos de las anemias megaloblásticas y los eliptocitos hipocrómicos de las talasemias y la anemia por deficiencia de hierro.

La mayoría de estos pacientes son heterocigotos para espectrinas eliptogénicas con disminución moderada o acentuada de la capacidad de unión terminal, como las alfas espectrinas Corbeil o Saint Louis (*figuras 10, 11 y 16a, b*).

### **Eliptocitosis hereditaria común con hemólisis crónica**

En estos pacientes el grado de hemólisis es mayor y puede no estar compensado, aunque en general, en los heterocigotos, no existe anemia acentuada. Es interesante notar, que dentro de una misma familia con la misma alteración molecular, algunos miembros pueden tener la forma mínima y otros la forma con hemólisis crónica.

Estos casos se caracterizan morfológicamente porque, además de los eliptocitos, es frecuente encontrar en el frotis poiquilocitos o eritrocitos en gemación, que traducen inestabilidad de la membrana, por inestabilidad del esqueleto membranoso.

La biometría hemática generalmente muestra algunos cambios, con anemia normocítica normocrómica y reticulocitos altos, aunque los histogramas de volumen pueden mostrar algunas células microcíticas (los poiquilocitos formados por gemación). Estos pacientes por lo común son heterocigotos para una espectrina eliptogénica y tienen en "trans" una alfa espectrina LELY (*figuras 16c y 23*).

### **Eliptocitosis hereditaria común con hemólisis esporádica**

Algunos pacientes con eliptocitosis mínima y sin hemólisis notable en condiciones basales, pueden desarrollar hemólisis no compensada en respuesta a estímulos que causan hiperplasia del sistema fagocítico, sobre todo de los macrófagos del bazo: hepatitis viral, cirrosis hepática, mononucleosis infecciosa, infecciones bacterianas y paludismo. Los eliptocitos parecen ser muy sensibles a la hemólisis microangiopática y se ha producido severa hemólisis en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica o con coagulación intravascular diseminada. Por razones desconocidas, el embarazo y la deficiencia de vitamina B12 aumentan la hemólisis en estos pacientes.

### **Eliptocitosis hereditaria común con poiquilocitosis infantil**

Algunos casos, que posteriormente se comportarán como una típica eliptocitosis hereditaria heterocigota común, tienen al nacimiento una hemólisis moderada a severa, con un frotis que muestra abundantes eritrocitos fragmentados, poiquilocitos, eritrocitos en gemación y esferocitos, además de eliptocitos. En este momento el cuadro es indistinguible del que se encuentra en la eliptocitosis hereditaria homocigota y en la piropoiquilocitosis hereditaria.

Aunque en la etapa neonatal la enfermedad puede ser muy difícil de distinguir de la piropoiquilocitosis hereditaria o de la eliptocitosis hereditaria homocigota, a diferencia de éstas la enfermedad se transforma espontáneamente (entre cuatro meses y dos años) en una eliptocitosis heterocigota típica sin anemia y sin poiquilocitosis notable.

La explicación es que en estos casos, los pacientes son heterocigotos para una alfa espectrina eliptogénica, pero adicionalmente los eritrocitos tienen en este momento mucha hemoglobina fetal; esto ocasiona que exista mucho

2,3 difosfoglicerato libre porque esta molécula no se fija a la hemoglobina fetal, mientras que sí lo hace a la hemoglobina A. El aumento de 2,3 DFG libre debilita las uniones entre espectrina, actina y proteína 4.1, lo que agrava el defecto y hace que el paciente clínica y morfológicamente parezca un homocigoto.

### **Eliptocitosis hereditaria común homocigota**

Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para defectos eliptogénicos del esqueleto frecuentemente tienen una severa hemólisis descompensada con anemia severa (2 a 6 g de hemoglobina), aunque en ocasiones pueden tener un cuadro menos grave (hemoglobina de 7 a 11 g).

Los profundos defectos del esqueleto traen como consecuencia gran fragmentación de eritrocitos, observándose en el frotis eritrocitos en gemación, poiquilocitos fragmentados y esferocitos, además de eliptocitos (*figura 16d*), con una morfología idéntica a la de la piropoiquilocitosis hereditaria. Los pacientes responden parcialmente a la esplenectomía.

200

### **Piropoiquilocitosis hereditaria**

En general, los pacientes tienen hemólisis grave con anemia severa (4 a 8 g de hemoglobina) y en el frotis se encuentran los mismos datos ya mencionados en la eliptocitosis con poiquilocitosis neonatal y en la eliptocitosis homocigota: poiquilocitos, fragmentos eritrocíticos, eritrocitos en gemación, esferocitos y eliptocitos. Es de hacer notar que esta morfología es muy parecida a la de los frotis de pacientes quemados y los eritrocitos de la piropoiquilocitosis son muy sensibles al calor.

La mayor parte de los pacientes descritos con piropoiquilocitosis son de origen africano y generalmente se presentan con hiperbilirrubinemia al nacimiento como consecuencia de la hemólisis o anemia severa durante los primeros meses de vida;

clínicamente se encuentra también esplenomegalia; y en el frotis, además de los cambios descritos, casi siempre se encuentran eritroblastos.

Como consecuencia de la anemia, los pacientes presentan retardo en el desarrollo y crecimiento; además, el aumento de eritropoyesis secundario a la hemólisis produce abombamiento del hueso frontal. El aumento de bilirrubina excretada frecuentemente es la causa de cálculos biliares a edad temprana.

A causa de la presencia de esferocitos, la fragilidad osmótica está aumentada y en la biometría se encuentra una notable microcitosis causada por la fragmentación eritrocítica (VGM 25 a 75 fL).

Uno de los datos de laboratorio típico de la enfermedad, y que se utiliza como criterio diagnóstico, es el aumento en la fragilidad térmica de los eritrocitos, que se fragmentan por incubación a 45° C por 10 minutos (los eritrocitos normales se fragmentan por incubación a 49° C).

Todos estos datos, sin embargo, no son exclusivos de la piropoiquilocitosis, sino que se encuentran también en las eliptocitosis homocigotas.

### **Eliptocitosis (“ovalocitosis”) del Sudeste de Asia**

Esta enfermedad, también llamada eliptocitosis melanésica o eliptocitosis estomatocítica, está causado por un defecto único en la proteína de la banda 3 o proteína intercambiadora de aniones, la que muestra la delección de un segmento de nueve aminoácidos (490 a 498), en la porción en donde la cadena proteica se introduce en la bicapa fosfolípídica de la membrana (*figura 26*).

Los eliptocitos son muy característicos en esta enfermedad, debido a que muestran de una a tres hendiduras transversales que les dan el nombre de eliptocitos estomatocíticos (*figura 27*).

La enfermedad, que se hereda de manera autosómica dominante, es frecuente en el Sudeste de Asia, en Malasia, Papúa Nueva Guinea y las Filipinas. Su alta frecuencia probablemente se correlaciona con el hecho de que protege de la in-

fección por *Plasmodium falciparum*. Dado que su frecuencia es mayor que la esperada por varios eventos de mutación espontánea, se considera un polimorfismo que proporciona a los afectados una ventaja de supervivencia en las zonas endémicas de paludismo. Las personas afectadas son asintomáticas.

El mecanismo por el que el defecto molecular produce las alteraciones morfológicas descritas podría ser el siguiente: la proteína de la banda 3 mutada cambia su estructura tridimensional e interfiere con la motilidad del esqueleto, permitiendo su deformación al pasar por los pequeños vasos sanguíneos pero "trabando" las especítrinas del esqueleto y volviéndolo rígido cuando la célula toma la forma elíptica. Esta proteína, que es un intercambiador de aniones en el eritrocito, en su forma mutada posiblemente permite un ingreso aumentado de iones y de agua a la célula, que se convierte entonces en un estomatocito, además de un eliptocito.

Los casos descritos en otras partes del mundo generalmente han correspondido a personas oriundas de la región del Sudeste de Asia o descendientes directos de ellas. Sin embargo, nosotros hemos encontrado en México varias familias con la enfermedad, pero en ninguna de ellas se ha podido demostrar el antecedente de un ancestro conocido del Sudeste de Asia. Por otra parte, nuestros estudios moleculares indican que la delección de los 27 nucleótidos es idéntica a la encontrada en aquellos países (*figura 28*).

Las posibles explicaciones son tres: la presencia de un ancestro proveniente del Sudeste de Asia no conocido por las familias, quizá muy lejano; como la enfermedad se transmite de manera autosómica dominante y no produce trastornos clínicos puede encontrarse después de muchas generaciones, sin haber sido diagnosticada previamente. La segunda opción es interesante: se considera que los indígenas americanos emigraron al continente a través de la región norte, pasando de Asia a América por el estrecho de Behring o

por las Islas Aleutianas; estos emigrantes provenían probablemente de las regiones boreales del continente asiático. Sin embargo, parece probable que otro grupo de emigrantes, menor en número pero que tuvo gran importancia cultural, llegó al continente atravesando el Océano Pacífico desde las Islas del Sudeste de Asia y se estableció en América. Si alguno de estos individuos era portador de la alteración, siendo la enfermedad dominante, podría haberse transmitido hasta nuestros días. La tercera posibilidad es que se trate de una mutación idéntica, pero independiente, en poblaciones autóctonas americanas expuestas también al paludismo falciparum.

Los casos de eliptocitosis del Sudeste de Asia que presentamos fueron descritos por primera vez en México por nosotros en el Instituto de Hematopatología, y los estudios moleculares fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana. La publicación formal de estos casos se encuentra en preparación.

201

## Referencias

1. Gallagher PG, Forget BG, Lux SE. Disorders of the erythrocyte membrane, in *Hematology of Infancy and Childhood*, edited by D Nathan, S Oskin, Saunders, Philadelphia, 1998.
2. Tse W, Lux S. Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. In: Scriver C, Beaudet A, Shy W et al (eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001.
3. Gallagher PG, Tse W, Forget BG. Clinical and molecular aspects of disorders of the erythrocyte membrane skeleton. *Semin Perinatol* 1990; 14: 51.
4. Glele-Kakai C, Garbarz M, Lecomte M-C et al. Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *Br J Haematology* 1996; 95: 57.
5. Coetzer T, Palek J, Lawler J et al. Structural and functional heterogeneity of alpha spectrin mutations involving the spectrin heterodimer self-association site: Relationship to hematologic expression of homozygous hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 1990; 75: 2235.
6. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30: 171.
7. Gallagher PG, Forget BG. Hematologically important mutations: Spectrin variants in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22: 254.

8. Gallagher PG, Weed SA, Tse WT et al. Recurrent fatal hydrops fetalis associated with a nucleotide substitution in the erythrocyte b-spectrin gene. *J Clin Invest* 1995; 95: 1174.
9. Conboy JG. Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. *Semin Hematol* 1993; 30: 58.
10. Takakuwa Y, Tchernia G, Rossi M, Benabadj M, Mohandas N. Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1 -deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1. *J Clin Invest* 1986; 78: 80.
11. Winardi R, Reid M, Conboy J, Mohandas N. Molecular analysis of glycophorin C deficiency in human erythrocytes. *Blood* 1993; 81: 2799.
12. Wilmette R, Harper SL, Ursitti JA, Marechal J, Delaunay J, Speicher DW. The exon 46 encoded sequence is essential for stability of human erythroid a-spectrin and heterodimer formation. *Blood* 1996; 90: 4188.
13. Jarolim P, Palek J, Amato D et al. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11022.
14. Liu SC, Jarolim P, Rubin HL et al. The homozygous state for the band 3 protein mutation in Southeast Asian ovalocytosis may be lethal. *Blood* 1994; 84: 3590.
15. Gallagher PG, Forget BG. Hereditary spherocytosis, eliptocytosis, and related disorders. In: Beutler E, Lichtman M (eds) *Williams hematology*. New York: McGraw-Hill, 2001.
16. Kuma H, Abe Y, Askin D et al. Molecular basis and functional consequences of the dominant effects of the mutant band 3 on the structure of normal band 3 in Southeast Asian ovalocytosis. *Biochemistry* 2002; 41: 3311.
17. Patel SS, Mehlutra RK, Kastens W et al. The association of the glycophorin C exon 3 deletion with ovalocytosis and malaria susceptibility in the Wosera, Papua New Guinea. *Blood* 2001; 96: 3489.
18. Beckman R, Smithe JS, Anstee DJ, Tanner MJ. Coexpression of band 3 mutants and Rh polypeptides: Differential effects of band 3 on the expression of the Rh complex containing D polypeptide and the Rh complex containing CcEe polypeptide. *Blood* 2001; 97: 2496.