OBSERVACIONES SOBRE UNA FAMILIA CON ESFEROCITOSIS HEREDITARIA Y REVISION DE LA LITERATURA

German F. Sáenz, **Jessie Orlich***. Mario Chaves**,*
*Gerardo Montero**, Javier Jiménez**, Bernal Azofeifa***, Roberto Muñoz ***

Resumen

Se presenta el estudio de una extensa familia estudiada por esferocitosis hereditaria (EH), en la que se detectó doce casos de la enfermedad. Anotamos los resultados del estudio, así como una revisión de los aspectos genéticos, clínicos, bioquímicos, hematológicos y fisiopatológicos de la literatura reciente. Hemos creído importante analizar la familia estudiada, y la literatura citada, con el fin de poner de manifiesto que este problema existe en Costa Rica con cierta frecuencia, y que es necesario afinar los procedimientos diagnósticos en los diferentes centros de salud para detectar las personas afectadas. Esto redundará en un total alivio de la sintomatología de estos pacientes, al ofrecerse la posibilidad de tratar esta hematopatía hereditaria. (Rev. Cost. Cienc, Méd. Dic. 1981; 2(2):).

Introducción

La esferocitosis hereditaria (EH) es una anemia hemolítica que se caracteriza por hemólisis extravascular, esferocitos en sangre periférica, fragilidad osmótica aumentada, autohemólisis incrementada que se corrige por la adición de glucosa, completa remisión luego de la esplenectomía y un patrón hereditario de carácter dominante. El trastorno primario se debe muy posiblemente a una anormalidad de la membrana del eritrocito, permaneciendo desconocido el defecto específico.

Esta enfermedad hereditaria es una tara frecuente en las poblaciones europeas, por lo que afecta principalmente a la raza blanca (3). En los Estados Unidos se considera que existen aproximadamente de 200 a 300 casos de EH por cada millón de habitantes de extracción predominantemente noreuropea (2, 38, 55).

A pesar de que la EH no es un problema médico mayor en términos de frecuencia, hay dos razones convincentes para seguir prestando atención a este problema hematológico: 1) puede hacerse mucho por el enfermo y sus parientes afectados una vez que se ha establecido el diagnóstico; y 2) los estudios de esta alteración han contribuido y contribuirán en el futuro a la comprensión de la genética médica, del metabolismo y estructura del eritrocito, así como de la circulación esplénica y sus efectos ante la estructura eritrocítica y su metabolismo.

En el presente reporte señalamos los hallazgos de laboratorio de una extensa familia en la que detectamos doce casos de la enfermedad, aprovechando las circunstancias para señalar en la discusión las características fundamentales del trastorno hereditario, tanto a nivel clínico como molecular, de acuerdo con la literatura que tuvimos a nuestro alcance a la hora de preparar la presente información.

***** Centro de Investigación de Hemoglobinas anormales y trastornos afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.
****** Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, Hospital San Juan de Dios.
******* Laboratorio Clínico, Hospital Nacional Psiquiátrico.

Materiales y Métodos

Esta investigación nació al demostrarse un ligero cuadro anémico en una paciente del Hospital Nacional Psiquiátrico, en la que llamó la atención un valor alto de CHCM (37 g/dl). Posteriormente se confirmó un cuadro de esferocitosis y se procedió al estudio familiar respectivo. Los métodos de los análisis hematológicos de rutina se hallan consignados en la literatura (13, 43), e incluyen hemoglobina, hematocrito, cómputo de reticulocitos y morfología eritrocítica. Las pruebas de fragilidad osmótica (F.O.) (con sangre Fresca y post-incubación) se efectuaron con ligeras modificaciones introducidas por nosotros: con glóbulos rojos frescos se practicó la prueba en concentraciones de NaCl de 0,50 y 0,55 por ciento, en tanto que con la sangre incubada se utilizaron de 060, 0,65, 0,70 y 0,75 por ciento. Para estos efectos como para otras pruebas, se usó sangre venosa obtenida estérilmente y anticoagulada con EDTA (16, 20). En tres ocasiones, por la edad de los pacientes, se procesó la prueba con sangre capilar anticoagulada con heparina. En cuanto a la prueba de la autohemólisis utilizamos una técnica simplificada (13) para la cual empleamos sangre tomada estérilmente con EDTA y solución estéril de glucosa al 5 por ciento en agua destilada. Las haptoglobinas séricas las medimos de acuerdo con el método de Owen *et al.* (40) y la hemoglobina libre en suero por la clásica reacción de la bencidina H_2O_2 (13). Las bilirrubinas séricas se cuantificaron por el método tradicional de la diazo-reacción. Se investigó la G6PD a través de las técnicas del cianuro ascorbato (22) y de la generación de NADPH (5), y las proteínas séricas por electroforesis en acetato de celulosa.

Resultados

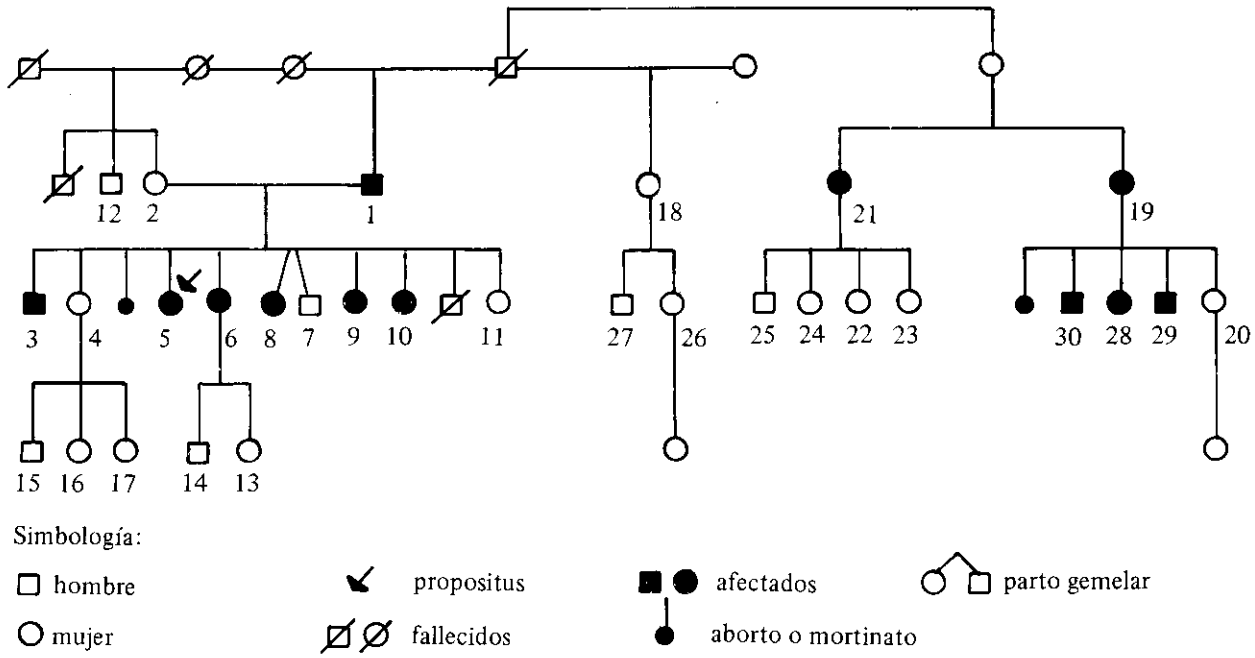
En la figura 1 se indica la genealogía de la familia y en los Cuadros 1 y 2 los resultados de la bioquímica hematológica obtenidos en doce familiares con EH. Los pacientes números 1, 6 y 19 presentaban, al momento del estudio, manifestaciones clínicas que pueden relacionarse con su padecimiento. El padre de la propósitus (número 1) ha sido internado siete veces con diferentes sintomatologías, en las que ha predominado la esplenomegalia, ictericia y anemia. Actualmente dice sentirse débil, y se ve ictérico. Una hermana de la propósitus (número 6) se encuentra sumamente débil y pálida, con desmayos y se nota subictérica. Finalmente, una tía paterna (número 19) está débil e ictérica, y fue internada hace varios años por una crisis ictérica típica, de la que se recuperó tras ser transfundida y con “mucho descanso”. En nueve de los doce casos con EH se practicó electroforesis de proteínas no demostrándose alteraciones cualitativas tipo banda monoclonal. Tampoco se encontró deficiencia de la G6PD eritrocítica, y los valores de hemoglobina sérica en el 80 por ciento de los casos estudiados no revelaron tasa mayor de lo esperable para suero normal (< de 7 mg/dl).

Discusión

El presente estudio logró demostrar la presencia de doce casos de EH en los 30 familiares de la propositus que fue posible estudiar, demostrándose la línea paterna de herencia del trastorno. Todos los casos con la alteración hereditaria cumplieron con los requisitos que se exigen para el diagnóstico de certeza, vale decir anemia ligera o moderada, esferocitosis en sangre periférica, reticulocitosis, fragilidad osmótica (F.O.) aumentada sobre todo

FIGURA 1

Genealogía de la familia estudiada con esferocitosis hereditaria



CUADRO 1

HALLAZGOS HEMATOLOGICOS EN 12 CASOS INTRAFAMILIARES DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

No.	Edad/sexo	Parentezco	Hto (%)	Hb (g/dl)	CHCM (%)	Reticulocitos (%)	Bilirrubinas (mg/dl) Ind.	Bilirrubinas (mg/dl) Total	Morfología eritrocítica*
1	57 M	Padre	36	13,2	36	11	2,2	3,4	Esferocitos y eritroblastos (1%)
3	27 M	Hermano	8	14,0	37	10	4,0	5,1	Esferocitos y eritroblastos (1%)
5	23 F	*Propositus*	36	13,6	37	9	1,6	2,2	Esferocitos y eritroblastos (1%)
6	22 F	Hermana	34	12,6	37	8	1,0	1,8	Esferocitos
8	27 F	Hermana	33	11,5	35	13	1,8	2,7	Esferocitos y eritroblastos (2%)
9	20 F	Hermana	37	13,4	36	9	1,1	1,6	Esferocitos
10	18 F	Hermana	35	12,9	37	10	0,9	1,4	Esferocitos
19	42 F	Tía paterna	36	12,7	35	8	0,9	1,5	Esferocitos
21	47 F	Tía paterna	34	12,4	36	11	1,8	2,7	Esferocitos y eritroblastos (1%)
28	21 F	Prima paterna	39	14,0	36	11	1,4	1,8	Esferocitos
29	20 M	Primo paterno	43	15,6	36	9	1,3	1,6	Esferocitos
30	22 M	Primo paterno	42	14,8	35	11	0,85	1,4	Esferocitos

* Se destaca en todos los casos la presencia de anisocitosis, con macrositosis variables.

CUADRO 2

HALLAZGOS HEMATOLOGICOS EN 12 CASOS INTRAFAMILIARES DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

No.	F.O. (%) fresca		F.O. (%) post-incubación			Autohemólisis (%)		Haptoglobinas
	0,50%	0,55%	0,65%	0,70%	0,75%	Sin glucosa	Con glucosa	(mg/dl)
1	18	13	71	50	30	5,2	2,2	26
3	43	17	66	62	37	12,6	4,9	34
5	28	13	57	34	17	12,0	6,0	44
6	11	4	41	36	24	10,7	3,3	26
8	19	6	67	43	34	22,1	4,5	38
9	15	6	50	38	24	17,0	3,2	36
10	15	4	72	52	34	15,2	2,7	34
19	23	6	59	37	21	7,1	3,3	50
21	53	9	41	23	18	6,2	1,5	27
28	46	14	65	44	27	15,6	3,8	34
29	40	20	68	50	35	19,0	3,0	31
30	36	14	60	44	33	6,8	2,6	50
Normal(es)	0–6	0	0–10	0–5	0	< 3	< 1	50–150

post-incubación a 37°C, autohemólisis incrementada que corrigió sustancialmente con glucosa, aumento ligero o moderado de la bilirrubina indirecta; disminución variable de las haptoglobinas y un patrón familiar con herencia de tipo mendeliano. Tal y como ha sido descrito (1, 15, 18, 34, 35, 54), la expresión del gene anormal varió dentro de los casos positivos, desde formas mínimas del trastorno hasta condiciones ligeras (ver Cuadros 1 y 2) dando todos la imagen de un síndrome hemolítico compensado (18). Llama la atención los valores altos de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) en los casos positivos, tal y como se ha reiterado en la literatura (4, 14, 18, 19), habiendo sido el índice eritrocitario que primero hizo pensar en EH en los inicios del estudio analítico de la propositus.

Al ser la penetrancia del gene para la EH tan variable, algunos miembros afectados de una determinada familia pueden tener un cuadro muy ligero y no presentan anemia. La presencia del gene anormal usualmente se detecta en casos mínimos o en estudios familiares por una ligera reticulocitosis, la presencia de algunos microesferocitos, una curva anormal de F.O., y especialmente por una prueba de autohemólisis corregible por glucosa (3, 10, 15, 28, 29, 37, 51).

Si se obtiene una historia cuidadosa se puede demostrar que aproximadamente la mitad de los individuos con EH manifiestan ictericia neonatal (49), la cual comúnmente cursa con exagerada hiperbilirrubinemia, pudiendo requerir exanguino-transfusión (47, 48). El hallazgo de esplenomegalia, tan común en niños mayores, es inconstante en el período neonatal (49). Uno de los padres biológicos en un caso particular de EH debe esperarse que tenga el gene anormal (en ausencia de la rara posibilidad de una nueva mutación) y por supuesto 50 por ciento de sus hijos, como promedio, deberían presentar la anormalidad genética (10). En vista de que aproximadamente el 25 por ciento de los casos de EH son esporádicos (55), una penetración incompleta del gene, o, menos frecuentemente, una mutación espontánea, son mecanismos que se han esgrimido para explicar las diferencias que se observan, tratándose de una enfermedad hereditaria mediada por un gene autosómico dominante (18, 42). Si en algún otro miembro de la familia se puede demostrar un cuadro hemolítico similar, ello ayudará a establecer el diagnóstico. Se citan en la literatura casos en donde no se pudo demostrar el defecto en los padres (18, 37, 55), especialmente por ser normal la prueba de F.O. (3, 15, 18). En vista de la naturaleza tratable de la enfermedad y de su patrón hereditario de dominación autosómica, es muy importante hacer el diagnóstico correcto de un paciente dado, así como a sus familiares en riesgo de haber heredado del gene anormal, a efecto de poder ofrecerle a todos los afectados el tratamiento efectivo, a saber, la esplenectomía. En este sentido, la EH es un ejemplo claro del uso de la genética para practicar la medicina preventiva (10). A pesar de que la mayoría de los pacientes con EH son asintomáticos, la necesidad de ese diagnóstico preciso es evidente cuando observamos la severidad en que pueden presentarse las complicaciones por crisis aplástica, colelitiasis y enfermedad hemolítica en el recién nacido (15)- Por otra parte, los cuadros de hiperhemólisis que se observan en estos pacientes se pueden presentar luego de ejercicio extremo o fatiga excesiva (18).

Los microesferocitos presentan una reducción de la superficie de la membrana, en comparación con el volumen celular, que se mantiene normal (52). Esto hace a las células susceptibles a su atrapamiento y destrucción (12) o a la lista osmótica, tal y como se demuestra con las pruebas de F.O. (10, 52, 55).

Además de la anisocitosis típica, dada por macrocitos, esferocitos y microesferocitos, el cuadro morfológico de la EH incluye también knizocitos (células con hoyuelos; con más de dos concavidades), estomatocitos (células unicóncavas) (4) y células en broche.

A pesar de que se han reportado varias aberraciones de membrana, los informes son controversiales, por lo que la lesión molecular en EH continúa siendo un enigma (1, 6, 26, 33, 50). En todo caso, la alteración de la membrana conduce a una permeabilidad aumentada para los cationes, y, como consecuencia, una hiperactividad de la bomba de sodio para luchar contra la entrada excesiva de ese catión (21, 23, 53) y la salida de potasio (25). La glicólisis se encuentra muy aumentada, tanto para asegurar el funcionamiento de esta bomba de cationes como por la población de células jóvenes típicas de la enfermedad y por la utilización incrementada de ATP dada por el bombeo adicional de cationes a través de la membrana (10).

Por alguna razón, mal conocida, existe una pérdida de lípidos de membrana, quizás ligada directamente a una anomalía de estructura o a una hiperactividad metabólica (3, 11), siendo la microesferocitosis su consecuencia. Estos lípidos tienden a normalizarse después de la esplenectomía (46), por lo que la anormalidad parece ser secundaria al defecto primario (41). Lo mismo se ha señalado para la permeabilidad anormalmente aumentada al sodio (46).

Se está trabajando actualmente en tres áreas fundamentales para tratar de definir la anormalidad del eritrocito en EH (57): en primer lugar se está estudiando el papel de las quinasas de proteína, que son enzimas ligadas a la membrana eritrocítica y que catalizan la fosforilación de varios polipéptidos, y cuya anormalidad podría afectar la forma del eritrocito y su deformabilidad (6). Se han señalado anormalidades en la fosforilación de proteínas de membrana (36), y que la espectrina debe ser fosforilada por una quinasa que requiere ATP (7), pero en general no hay un consenso acerca de la naturaleza de algún defecto específico. Otra área de estudio tiende a buscar anormalidades en las proteínas estructurales y lípidos de membrana del eritrocito. Está bien estudiado que la espectrina polimeriza en fibras y aparece como un retículo en la parte interna de la membrana eritrocítica (35), y es crítica para mantener la forma normal del eritrocito y para su deformabilidad. En esferocitosis hereditaria se han encontrado algunas anormalidades, como resistencia a la agregación o su precipitación con vinblastina, formando microesferocitos (57). McCann y Jacob (35) han postulado que es posible que este defecto se dé también en el tejido nervioso, rico en espectrina. Lanzan la hipótesis de que es una proteína prototipo la que está alterada, y en dos pacientes que describen se asocia una EH y un proceso degenerativo crónico e idiopático de la médula espinal. En EH de ratón se ha comprobado una deficiencia de espectrina (17). Finalmente, se estudian factores como el transporte de calcio. Se sabe que prácticamente todo el calcio está en la membrana, y la acumulación de ese catión se relaciona con una deformabilidad disminuida de la célula (57). Una disminución de la relación entre ATP e iones calcio (ATP/Ca^{++}) provoca una mayor rigidez de la membrana (24, 31, 56). En EH, hay una tendencia hacia una menor cantidad de ATP y a acumular iones calcio, por lo que se requieren mayores concentraciones de ATP para mantener la membrana con deformabilidad normal. La depleción de ATP lleva a esferocitosis (39). Si hay deficiencia de ATPasa dependiente de calcio (Ca^{++}-ATPasa), puede resultar una gran acumulación del mismo (57). En otros reportes, existe contradicción en este sentido (24, 31), particularmente Johnsson *et al.* (25) no encuentran deficiencias en la función enzimática de la Ca^{++}—ATPasa en EH, y arguyen que puede haber un cambio en la estructura de la membrana que afecta la extrucción de calcio, o en la localización funcional de la Ca^{++}, Mg^{++}—ATPasa.

La evidencia acumulada indica, entonces, que para el mantenimiento normal del eritrocito bicóncavo se requiere una espectrina normal adecuadamente fosforilada y que cualquier cambio en el sistema que iría desde los niveles de ATP hasta las quinasas de proteína,

la espectrina y cualquier otro componente de esta cadena de reacciones, llevará a esferocitosis (10). Se ha cuestionado si la EH en humanos es genéticamente homogénea, o si ocurre en diferentes familias como resultado de diferentes defectos (27). Recientemente Kimberling *et al.* (28) han sugerido que este trastorno no es heterogéneo, con base en un intenso estudio, sobre la localización cromosómica del gene y el enlace o ligación de este con una serie de marcadores séricos y eritrocíticos, y análisis citogenéticos. Aparentemente la más prometedora de las tres áreas señaladas por Zail y Van der Hock (57), es la que define una anormalidad topográfica de las proteínas o lípidos de la membrana, lo que en última instancia deberá definir a la EH como una anormalidad provocada por la presencia de una proteína anormal o una modificación funcional de proteínas de membrana. Estas son importantes en la determinación del área de superficie celular, en estrecha asociación tanto con lípidos como con Ca^{++}, e íntimamente comprometidas con los procesos de transporte a través de la membrana celular (12). El cambio de forma de discocito a esferocito hace a las células poco elásticas y no filtrables a través de los capilares esplénicos, que son los tamices más finos del organismo (55). La F.O. aumentada y la autohemólisis incrementada, corregible por glucosa, son la consecuencia de las anomalías de los cambios iónicos y de glucólisis exagerada resultante (3). Otros dos factores que pueden contribuir al secuestro esplénico de las células de la EH son, entre otras cosas, el pH bajo y la tensión de oxígeno baja presentes en la pulpa esplénica (8). Los eritrocitos de la EH muestran un aumento de su rigidez cuando se exponen a una PO_2 menor de 40 mm de Hg y a un ph de 7,34. Puesto que es posible que en la pulpa esplénica subsistan a la vez un pH y una PO_2 bajos, esto constituye una dificultad adicional en este punto crítico de la circulación. Por otra parte, las células pueden llegar a estar retenidas allí hasta unas diez horas, con lo que, ante este estado de congestión (eritroestasis y hemoconcentración), es probable que estén expuestas a un suministro de glucosa cada vez más reducido, con el inevitable deterioro energético intracelular (9, 12). Cuando el esferocito es atrapado en la pulpa esplénica, la escasa disponibilidad de ATP, dada por la mayor unión a la deoxihemoglobina, conduce a la pérdida en la superficie celular de lípidos y proteínas, es decir, a la fragmentación (30). Como consecuencia de la pérdida de superficie, la forma de la célula se acerca más a la esfericidad y se hace más rígida, con lo que queda más expuesta a ser atrapada durante su próximo paso a través del bazo, si en él toma el camino a través de la pulpa esplénica en vez de seguir la vía más directa de la arteriola esplénica al sinusoide esplénico (55). De esta forma, se establece un círculo vicioso de condicionamiento del esferocito con los repetidos pasos por el bazo, hasta que la célula rígida se desintegra y los fragmentos son captados por los macrófagos esplénicos (30). Es notable que ni la eritrofagocitosis (de hematíes enteros) en el bazo ni el acúmulo de oxihemoglobina o metahemalbúmina en la circulación periférica puedan demostrarse en pacientes con esferocitosis hereditaria. No obstante, las haptoglobinas desaparecen regularmente, quizá a causa de su unión con la hemoglobina liberada por las células que se destruyen en el bazo (55). Lo anterior fue demostrado en el presente estudio, en donde todos los familiares afectados presentan haptoglobinas en el límite inferior normal o disminuidas. Además, no encontramos valores altos de oxihemoglobina plasmática ni metahemalbúmina. Tras la esplectomía, los eritrocitos permanecen anormales pero son capaces de circular por un tiempo lo suficientemente largo como para que el paciente mantenga un nivel normal de hemoglobina(10).

Una gran parte de los pacientes con esferocitosis hereditaria desarrolla litiasis biliar si no son esplenectomizados antes de la pubertad. El retraso en la esplenectomía, puede tener consecuencias significativas (55). Otra amenaza que pesa sobre estos pacientes es el

desarrollo de crisis aplásticas que suelen acompañarse de infecciones. Dado que la demanda de folatos está aumentada en este proceso, así como en otros estados hemolíticos, la administración de ácido fólico puede colaborar en disminuir el fallo de la respuesta medular ante una demanda aumentada. La eritropoyesis ineficaz tiene escasas consecuencias en una persona cuyos hematíes tengan una vida media normal de alrededor de 120 días. Si la vida media se reduce a unos 10—20 días o menos, como ocurre con la mayoría de pacientes con esferocitosis hereditaria no esplenectomizados, una disminución marcada de la eritropoyesis, asociada con infección, puede representar un serio problema. En ausencia de infección o de déficit de folatos, la médula ósea suele compensarse suficientemente como para mantener valores del hematocrito por encima del 30 por ciento y, en algunos pacientes, por encima del 40 por ciento. No es frecuente encontrar pacientes con hematocritos persistentemente por debajo del 25 por ciento (55). Otra complicación que se ha señalado en la EH es la gamapatía monoclonal. Schafer *et al.* (44) sugieren que la relación no es fortuita, y que se puede deber a la estimulación crónica y persistente al sistema reticuloendotelial por el proceso hemolítico. Los autores indican también datos no publicados de doce pacientes que mostraron valores elevados de gamaglobulinas. Nosotros, cuantificando estas proteínas por electroforesis y densitometría en nueve casos de la familia estudiada, encontramos que cinco presentaron valores ligeramente elevados de las gama-globulinas (> de 1,50 g/dl). En ninguno se detectó banda o patología monoclonal. Los mismos autores arriba señalados hacen ver que se ha intentado relacionar la colecistiasis como implicada en la patogenia del mieloma múltiple tipo IgA, lo que debe tenerse en cuenta al estudiar procesos hemolíticos crónicos que puedan involucrar un compromiso vesicular y gamapatías asociadas. Esta asociación de mieloma y EH también la cita Lempert (32). En cuanto a la localización del gene para EH, Kimberling *et al.* (27) encontraron en un extenso estudio a través de tres generaciones de una familia con EH, que todos los miembros afectados con El-l presentaron una traslocación recíproca entre los cromosomas 8 y 12. Sin embargo, otras ocho familias con EH no presentaron dicha traslocación. Por otra parte, Sengar *et al.* (45) estudiaron dos familias, en las que se sugiere que el gene para EH puede estar ligado al locus para los antígenos mayores de histocompatiblidad (HLA), en el cromosoma 6. En los dos casos estudiados, los hijos afectados presentaron el mismo fenotipo HLA que el progenitor afectado.

Hemos creído importante analizar la familia estudiada, y la literatura reciente con relación a la EH, con el fin de poner de manifiesto que este problema existe en Costa Rica con cierta frecuencia y que es necesario afinar los procedimientos diagnósticos en los diferentes centros de salud para detectar las personas afectadas. Esto redundará en un total alivio de la sintomatología de estos pacientes, al ofrecerse la posibilidad de tratar esta hematopatía hereditaria.

ABSTRACT

We present the study of a family with hereditary spherocytosis, in which we detected twelve cases of this hematological illness. Genetic, clinical, biochemical hematological and physiopathological aspects are discussed, as related to the recent literature. We considered important to analize this family and these publications, to remind our readers that this problem exists in Costa Rica with a certain frecuency, and the proper study of suspect affected cases will lead to the proper treatment and total elimination of the symptoms of the patients.

Bibliografía

1. Anselstetter, V. Gel Electrophoresis of the Human Erythrocyte Membrane Proteins: Aberrant Patterns in Hematological and Nonhematological Diseases, *Blut* 1978; 36:135—144.

2. Beck, W. S. *Hematology.* 2nd Ed. The MIT Press, 1977; 274—277.

3. Bernard, J., Levy J. P. *Manual de Hematología 2º* Ed., Toray-Masson, S. A., 1979; 78—99.

4. Bessis, M. *Blood smears reinterpreted.* Springer-Verlag, Berlin, 1976; 96—98.

5. Beutler, E. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. Grume & Stratton, N. Y., 1967; 62—64.

6. Beutler, E., Guinto, E. & Johnson, C. Human red cell protein kinase in formal subjects and patients with hereditary spherocytosis, sickle cell disease and autoinmune hemolytic anemia. *Blood* 1976;48:887—898.

7. Birchmeir, W., Singer, S. J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. *J. Cell Biol.* 1977; 73:647—649.

8. Bellingham, A. J., Prankerd, T. A. J. Esferocitosis Hereditaria, In: *Clínica Hematológica,* Salvat Editores, 1976; 3(1) :44—62.

9. Benöhr, H. Chr., Waller, H. D.: Metabolismo en los estados hemolíticos, In: *Clínica Hematológica,* Salvat Editores, l976; 3(1):44—62.

10. Brewer, G. J. lnherited erythrocyte metabolic and membrane disorders. In: *Med. Clin. N. Amer.* 1980;64(4):579-596.

11. Cooper, R. A., Jandl, J. H. Role of membrans lipide in the survival of red cells in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 1969;48 :736—740.

12. Cooper, R. A., Jandl, J. H. Erythrocyte disorders-anemias due to increased destruction of erythrocytes with abnormal shape and normal hemoglobin (membrane defects?). In: Williams, W. *et al.: Hematology,* McGraw Hill. 2nd Ed., 1977;453—458.

13. Dacie, J. V. Lewis, S. M. *Practical Haematology,* Churchill Livingstone, 5th Ed., 1975; 21—83 y 202—212.

14. Erslev, A. J., Atwater, J. Effects of mean corpuscular hemoglobin concentration on viscosity. *J. Lab. Clin. Med.,* 1963; 62:401—405.

15. Fukagawa, N., Friedman, Gill, F. M., Schwartz, E., Shaller, C. Hereditary Spherocytosis with Normal Osmotic Fragility After Incubation. Is the Autohemolysis Test Really Obsolete? *JAMA* 1979: 242:63—64.

16. Gear, A. R. L. Erythrocyte Osmotic Fragility: Micromethod based on Resistive-Particle Counting. *J. Lab. Clin. Med.* 1977; 90:914—928.

17. Greenquist, A. C., Shohet, S. B., Bernstein, S. E. Marked reduction of spectrin in hereditary spherocytosis in the common house mouse. *Blood* 1978; 51:1149—1158.

18. Harris, J. W., Kellermeyer, R. W. *The Red Cell.* Commonwealth Fund-Harvard University Press, 1970; 539—559.

19. Hillman, R. S., Finch, C. A. *Manual de Hematología,* Edit. El Manual Moderno, S. A., 1977;67.

20. Ito, Y., Carmeci, P., Steele, R. Continous Flow Method for Determination of Erythrocyte Osmotic Fragility. *Am. J. Hemat.* 1977; 2:403—412.

21. Jacob, H. S. Hereditary spherocytosis. A disease of the red cell membrane. *Semin. Haematol.* 1965; 2:139—166.

22. Jacob, H. S., Jandl, J. H. A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide. *N. Engl J. Med.* 1966; 274:1162—1166.

23. Jacob, H. S. Dysfuction of the red blood cell membrane in hereditary spherocytosis. *Brit. J. Haematol* 9 8;14:99—101.

24. Jacob, H. S., Ruby, A., Overland, E. S., Mazia, D. Abnormal membrane protein of red blood cells in hereditary spherocytosis, *J. Clin. Invest.* 1971; 50:1800—1803.

25. Johnsson, R., Santaholma, S., Saris, N. E. Calcium transport and adenosine triphosphatase activities of erythrocyte membranes in congenital spherocytosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1978; 38:121-125.

26. Kaplay. S. S. Lack of association between human erythrocyte membrane acetylcholinesterase and osmotic fragility, *Biochem. Med.* 1978; 19:299—304.

27. Kimberling, W. J., Fulbeck, T., Dixon, L., Lubs, H. A. Localization of spherocytosis to chromosome 8 or 12 and report of a family with spherocytosis and a reciprocal translocation. *Am. J. Hum. Genet.* 1975; 27:586—594.

28. Kimberling, W. J., Taylor, R. A., Chapman, R. G. & Lube, H. A. Linkage and gene localization of Hereditary spherocytosis (HS) *Blood* 1978; 52:859—867.

29. Kostinas, J. E., Cantow, E. F., Wetzel, R. A. Autohemolysis of cord blood in congenital spherocvtosis and ABO incompatibility. *J. Pediatr.* 1967; 70:273—276.

30. LaCelle, P. L., Weed, R. I.: Low oxygen pressure: A cause of erythrocyte membrane rigidity. *J. Clin. Invest..* 1970;49:54a—57a.

31. LaCelle, P. L. Alterations of membrane deformability in haemolytic anaemias, *Sem. Haematol.* 1970; 7(4): 355 —371.

32. Lempert, K. D. Gammopathy and spherocytosis (Letters to Editor). *Ann. Inter. Med.* 1978: 89(1):145—146.

33. Mazo, E., Fernández, J. Zubizarreta, A. & Rocha, e. Estudio de la composición proteica de la membrana eritrocitaria en esferocitosis hereditaria. *Sangre* 1979; 24:376—388.

34. Mackinney. A. A.. Morton, N. E., Kosower, N. S., Schilling, R. F. Ascertaining genetic carriers of hereditary spherocytosis by statistical analysis of multiple laboratory tests. *J. Clin. Invest.* 1962; 41:554—567.

35. McCann, S. R., Jacob. H. S. Spinal cord disease in hereditary spherocytosis; report of 2 cases with a hypothesized common mechanism for neurologic and red cell abnormalities. *Blood* 1976; 48: 259-263.

36. Mohandas, N., Greenquist, A. C., Shohet, S. B. Effects of heat and metabolic depletion on erythrocyte deformability, spectrin extractability and phosphrylation In: *The Red Cell.* Brewer, G. J., Ed. Alan R. Liss, Inc., 1977; 453.

37. Montero, J. M., Alvares, C. & Serrano, y. Esferocitosis hereditaria. A propósito de un caso. *Rev. Clin. Esp.* 1977; 145: 387-389.

38. Morton, N. E., Mackinney, A. A., Kosower, N., Schilling, R. F., Gray, M. P. Genetics of spherocytosis. *Am. J. Hum. Genet.* 1962; 14:170—172.

39. Nakao, N., Nakao, T., Yamazoe, S. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Natura* 1980; 187:945 -946.

40. Owen, J. A., Better, F. C. Hoban, J. A simple method for the determination of serum haptoglobins. *J. Clin, Path.* 1960; 13:163—164.

41. Reed, C. F., Swisher, A. N. Erythrocyte lipid loss in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 1966; 45:777—780.

42. Rubins. J., Lawrence, E. Y. Hereditary Spherocytosis and Glucose 6—Phosphate dehydrogenase Deficiency. Double Hemolytic Jeopardy. *JAMA* 1977; 237:797-798.

43. Sáenz, G. F., Moreira, J. *Laboratorio Hemoglobinopatías. Manual latinoamericano.* Ministerio de Salud, Costa Rica. Depto. Publicaciones e impresos, 1980:40—44. 27

44. Schafer, A. I. Monoclonal gammopathy in HS: a possible pathogenic relation. *Ann. Intern. Med.* 1978, 88:45 --46.

45. Sengar, D. P. S. HLA and hereditary spherocytosis. *Vox Sang.* 1979; 33:278- 279.

46. Shohet, S. B., Ness, P. M. Hemlytic Anemias-Failure of the red cell membrane. *Med. Clin. N. Amer.* 1976; 60:913—932.

47. Smith. C. H. *Blood disease of infancy and childhood* 3th Ed., C. V. Mosby Co., St. Louis, 1972; 104—124.

48. Stamey, C. C., Diamond, L. K. Gongenital hemolytic anemia in the newborn. *Am. J. Dis. Child.* 1957; 94:616—622.

49. Stockman, J. A. Oski, F. A. Erythrocytes of the Human Neonate, In: *Current Topics in Hematology.* Alan R. Liss, Inc., N.Y., 1978; 1:193—232.

50. Valentine, W. N. The molecular lesion of hereditary spherocytosis (HS): A continuing enigma. *Blood* 977; 49:241—245.

51. Weed, R. I., Bowdler, A. J., Metabolic dependence of the critical hemolytic volume of human erythrocytes: Relationship to osmotic fragility and autohemolysis in hereditary spherocytosis and normal red cells. *J. Clin. Invest.* 1966; 45 :1137—1149.

52. Wiley, J. S. Red cell survival studies in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 1970;49:666— 671.

53. Wiley, J. S. Coordinated increase of sodium leak and sodium pump in hereditary spherocytosis. *Br. J. Haematol.* 1972; 33:529—542.

54. Wintrobe, M. M., Lee, R. G., Boggs, D. R., Bithell, T. C., Athens, J. W., Foerster, J., *Clinical Hematology,* 7th Ed. Lea & Febiger, Pa., 1974; 751—758.

55. Young, L. E. Hereditary spherocytosis In: *Hematology for Internists.* Weed, Rl (ed.): Little Brown & Co., 1971;11—127.

56. Zail, S. S. The erythrocyte membrane abnormality of hereditary spherocytosis. *Brit. J. Haematol.* 1977; 37:305—310.

57. Zail, S. S., Van den Hoek, A. K. Studies on calcium transport and calcium adenosine triphosphatase activity of erythrocyte membranes in hereditary spherocytosis. *Br. J. Haematol.* 1976; 34(4):605—611.