

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA**



Propuesta de Investigación para optar por el Título de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica.

***ESTUDIO EXPLORATORIO DE CASOS Y CONTROLES ACERCA DEL
DIAGNÓSTICO DE LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA EN COSTA RICA***

TUTORA:
Dra. Sandra Boza Oreamuno

ESTUDIANTE:
MARIELA SOLANO VARGAS A55509

SAN PEDRO, 2011

DEDICATORIA

A la persona que desde hace 90 años ha inspirado valentía y superación. A tita, quién me ha enseñado que luchar en la vida tiene sus recompensas...

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por permitirme un paso más en la vida acompañada de toda mi familia, la cuál siempre está a mi lado. Además extiendo mis agradecimientos a aquellas personas que de una u otra forma estuvieron presentes en el trayecto; a mis amigos, compañeros del CIHATA, profesores y personas participantes en el estudio. Su compañía y colaboración son parte fundamental de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE CUADROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	2
Hipótesis	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
ANTECEDENTES	4
Esferocitosis Hereditaria (EH)	9
Diagnóstico	10
Tratamiento	11
METODOLOGÍA	12
Contacto de familias diagnosticadas con Esferocitosis Hereditaria.	12
Evaluación de la presencia de Esferocitosis Hereditaria a cada participante en estudio a partir de parámetros hematológicos.	13
Realización de técnicas	14
Análisis de los datos.	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	34

<u>ANEXOS</u>	<u>36</u>
<u>1. CONSENTIMIENTO INFORMADO</u>	<u>36</u>
<u>2. CUESTIONARIO</u>	<u>39</u>

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Clasificación de proteínas de membrana y su asociación con algunas enfermedades.</i>	7
<i>Figura 2. Estructura de la membrana del eritrocito.</i>	9
<i>Figura 3. Nivel medio de hemoglobina según población en estudio</i>	19
<i>Figura 4. Nivel medio de CHCM según población en estudio</i>	20
<i>Figura 5. Porcentaje de reticulocitos según población en estudio</i>	21
<i>Figura 6. Porcentaje de RDW según población en estudio</i>	20
<i>Figura 7. Nivel medio de plaquetas según población en estudio</i>	21
<i>Figura 8. Nivel medio de VCM según población en estudio</i>	22
<i>Figura 9. Porcentaje de hemólisis por concentraciones de NaCl según población en estudio con relación al nivel referencia</i>	25
<i>Figura 10. Porcentaje de hemólisis en la Prueba Rosada de lisis con Glicerol o Pink test según población en estudio</i>	26
<i>Figura 11. Niveles de hemolisis por replica en la técnica de criohemólisis según población en estudio</i>	27

INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1 Cuadro modelo de Contingencia para análisis y comparación de datos</i>	<i>16</i>
<i>Cuadro 2 . Resumen de los niveles medios de los parámetros hematológicos según la población en estudio.</i>	<i>18</i>
<i>Cuadro 3. Comparación descriptiva de las técnicas usadas para el diagnóstico de la EH</i>	<i>26</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

CIHATA: Centro de Investigación en Hemoglobinopatías y Trastornos Afines

CH: Criohemólisis

CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

Cl: Cloruro

EH: Esferocitosis Hereditaria

EHRN: Enfermedad Hemolítica del recién nacido

FO: Curva de Fragilidad Osmótica

GR: Glóbulo rojo

Hb: Hemoglobina

HCO_3^- : Bicarbonato

HTO: Hematocrito

HSJD: Hospital San Juan de Dios

Ig: Inmunoglobulina

fl: fentolitros

PT: “Pink Test” o Prueba rosada de Glicerólisis

pg: picogramos

VCM: volumen Corpuscular Medio.

RESUMEN

La Esferocitosis Hereditaria (EH) representa una de las causas más frecuentes dentro de los desórdenes hemolíticos hereditarios, en donde los signos clínicos son muy heterogéneos. Este padecimiento posee un patrón hereditario autosómico dominante en el 75% de los casos (Sáenz et al., 2008) y se puede encontrar en todos los grupos étnicos, sin embargo, es frecuente en individuos con ancestros del norte de Europa en donde se estima una prevalencia de una persona afectada por cada 2500 (Estrada *et al.*, 2009). Para la población occidental en general se ha mencionado una frecuencia de 1:5000 casos de EH.

Pese a su diverso comportamiento la EH se suele clasificar en cuatro tipos: clásica o típica, leve o sintomática, atípica con hemolisis grave y neonatal, en donde los dos primeros son los más importantes y numerosos (Sáenz et al., 2008 y Ricard, 1993).

Esta membranopatía da como resultado una pérdida de la membrana a través del paso esplénico, lo que desestabiliza la forma eritrocítica y produce células redondas con una relación superficie/volumen disminuida que se refleja en un incremento en la vulnerabilidad del glóbulo rojo frente a la lisis hipotónica. Bajo el principio anterior es que en el laboratorio se tienen pruebas bioquímicas que detectan estos esferocitos, dentro de las pruebas destacan la fragilidad osmótica y la determinación del tiempo de lisis en glicerol, también conocido como Pink Test. A partir de 1990 surge una prueba bioquímica alternativa conocida como criohemólisis la cual, según Streichman y colaboradores (Streichman et al, 1990; Streichman y Gescheid, 1998) no depende necesariamente de la relación área/volumen y proponen un estrés inducido en los GR defectuosos suspendidos en soluciones hipertónicas, los cuáles son más susceptibles a cambios de temperatura que las células normales. Esta al no basarse netamente en la forma del eritrocito permite identificar todos los casos de esferocitosis hereditaria incluyendo a los portadores asintomáticos (parientes de los pacientes con diagnóstico) quienes todavía no presentan gran cantidad de células esféricas como tal.

El proyecto se ubicó en Costa Rica y con un impacto en la salud de las familias costarricenses con esferocitosis hereditaria.

El estudio exploratorio se realizó en varias fases: 1-Contacto de familias diagnosticadas con Esferocitosis Hereditaria. 2-Evaluación de la presencia de esferocitosis hereditaria en cada participante en estudio a partir de parámetros hematológicos. 3-Aplicación de las técnicas bioquímicas en las poblaciones reclutadas. 4- Análisis de resultado mediante la estadística descriptiva, en donde se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada uno de los métodos bioquímicos.

El estudio logró actualizar la base de datos con la que se inició el proyecto, además demostró que las técnicas bioquímicas pese a que son baratas y relativamente rápidas, no resultan específicas para la detección de casos pues se basan netamente en el supuesto de la presencia de esferocitos en sangre periférica.

Una vez más se muestra la necesidad de realizar más estudios como este, en dónde se recomienda un análisis estadístico previo para realizar un muestreo con base en datos de prevalencia de la enfermedad, esto puede trabajarse en conjunto con los centros de salud de la CCSS quién debe aportar un registro de los casos de EH. Además es importante introducir técnicas moleculares que puedan mejorar el diagnóstico y que permita una mejor descripción al cuerpo médico de la situación de los afectados y sus familiares, en beneficio de la atención que se pueda brindar en el sistema de salud del país.

INTRODUCCIÓN

La Esferocitosis Hereditaria (EH) es una de las membranopatías más comunes a nivel mundial. Presenta un patrón clásico hereditario autosómico dominante en la mayoría de los casos los cuales se han relacionado principalmente con individuos caucásicos; sin embargo, en nuestro país al existir una gran mezcla étnica su distribución no presenta ninguna tendencia. Se han descrito también cuadros autosómicos recesivos. La EH es un síndrome hemolítico que se caracteriza por su heterogeneidad clínica en donde se pueden encontrar signos como ictericia, esplenomegalia, cansancio, anemia crónica, entre otros. Actualmente su diagnóstico se realiza basado en la afección clínica que se relaciona con pruebas de laboratorio como la Fragilidad Osmótica (FO) y la Prueba Rosada de Glicerólisis (PT) que miden la susceptibilidad de los glóbulos rojos (GR) a la hemólisis en condiciones de estrés (Estrada *et al.*, 2009).

En la EH se ve afectada la estructura de los GR los cuáles son las células más abundantes en la sangre y cuya función está orientada al transporte de oxígeno hasta los tejidos. Para ello es necesario que estas células cuenten con una concentración adecuada y funcional de hemoglobina (Hb). Además deben caracterizarse por una membrana eritrocítica con capacidad de deformación reversible y gran estabilidad. De esta manera se facilita su paso a través del sistema capilar del organismo, lo que le permite responder al estrés metabólico mientras conserva su área superficial (Smith *et al.*, 2006). Esta membrana eritrocítica está compuesta por una bicapa lipídica distribuida asimétricamente y que se encuentra en constante interacción según lo propuesto por la teoría del mosaico fluido de las membranas celulares (Smith *et al.*, 2006). El GR también cuenta con un citoesqueleto en donde interaccionan gran cantidad de proteínas; dentro de las cuales se destacan la espectrina, ankirina, banda 3 y banda 4.2. En ciertas ocasiones los defectos en estas proteínas llevan a una malformación de dicho citoesqueleto lo que genera la salida a circulación de GR con formas anormales, tal como ocurre con los esferocitos. Estos poseen una vida media más corta en sangre lo que puede resultar en cuadros clínicos muy diversos

en donde la gravedad de los mismos correlaciona con el nivel de deficiencia en las diferentes proteínas anteriormente mencionadas (Sáenz *et al.*, 2008).

Al tener la Esferocitosis una presentación tan diversa, en muchas ocasiones el diagnóstico se hace por estudios familiares; por lo que se puede estimar un subregistro de la misma en el sistema hospitalario. Debido a esto el presente trabajo busca implementar una nueva técnica de laboratorio que la literatura muestra como una prueba ventajosa pues permite detectar portadores asintomáticos y pretende de esta manera un apoyo diagnóstico adecuado para la confirmación de casos, esto facilita el diagnóstico diferencial y propicia de esta manera ofrecer a las personas afectadas, familiares y personal de salud una herramienta más para el correcto abordaje de la patología.

Justificación

La Esferocitosis Hereditaria no se ha registrado como una causa prevalente dentro de las enfermedades hematológicas padecidas actualmente por los costarricenses. Esto puede deberse a un subregistro por la falta de reporte de los casos, por desconocimiento del cuadro y por carecer de pruebas lo suficientemente sensibles para su determinación. De ahí deriva la importancia de brindar un diagnóstico certero, preciso y rápido frente a dicho padecimiento, ya que se ha visto que los cuadros de anemia crónica, aunque leves, pueden afectar el desarrollo cognoscitivo y retrasar el crecimiento en algunas personas.

Además esta enfermedad provoca un impacto social y laboral pues se han asociado gran número de incapacidades en algunos sectores productivos del país a raíz de causas como la fatiga y crisis colelitiásicas entre otras repercusiones médicas que son consecuencias de la enfermedad hematológica. Así mismo contar con otra prueba diagnóstica confiable y más eficiente ayudaría en el diagnóstico diferencial de otras afecciones que requieren urgente intervención médica, como la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN.).

La información generada en esta investigación será de gran ayuda para los profesionales en salud y a su vez dará información útil a los pacientes y sus familiares, así

como a la población en general acerca de esta patología, su impacto social y un mejor abordaje de la misma.

Hipótesis

La técnica conocida como criohemólisis es una prueba eficiente y rápida en la confirmación del diagnóstico de individuos con Esferocitosis Hereditaria, en comparación con la prueba de FO y el PT utilizados actualmente en los hospitales del país.

Objetivo General

Realizar un estudio exploratorio de casos y controles para la técnica bioquímica de Criohemólisis como posible método diagnóstico para la Esferocitosis Hereditaria en nuestro país.

Objetivos Específicos

- Reproducir la técnica de criohemólisis en el laboratorio del Centro de Investigación en Hematologías y Trastornos Afines (CIHATA).
- Actualizar la base de datos en el CIHATA de individuos diagnosticados con esferocitosis Hereditaria.
- Comparar los datos obtenidos de individuos previamente diagnosticados con la enfermedad, sus familiares y un grupo de controles, por la técnica de criohemólisis, Fragilidad Osmótica y Prueba Rosada de Glicerólisis.

ANTECEDENTES

La forma de disco bicóncavo característica del glóbulo rojo se debe a que su membrana presenta mayor área superficial, con respecto a su volumen, es decir su superficie es mayor a la que ocupa el contenido del eritrocito. Esta mayor área superficial le permite al GR ser deformado por fuerzas mecánicas al pasar por los capilares sanguíneos y le facilitan el intercambio gaseoso. Esta condición de deformación le confiere a las células rojas estabilidad y a la vez contribuye al balance osmótico y metabolismo de las mismas, ya que durante su recorrido es común que atraviesen compartimientos con diferentes tonicidades. Ejemplo de esto sucede en el riñón, donde por la hiperosmolaridad del medio los eritrocitos se encojen por la pérdida de agua regresando posteriormente a su forma normal (Smith *et al*, 2006; Lichtman, 2007).

La membrana del eritrocito es una de las más estudiadas, y cumple con el patrón del mosaico fluido según lo describen los autores Singer y Nicolson en una publicación en 1972, en donde hacen hincapié en que la membrana eritrocitaria logra un ambiente dinámico gracias a sus componentes lipídicos y protéicos y a la distribución de los mismos. En este mismo artículo se resalta el papel metabólico de la membrana eritrocítica al estar implicada en el paso selectivo de sustancias, la inactivación de enzimas glucolíticas, retención de fosfatos orgánicos y otros compuestos vitales, además de regular la salida de desechos metabólicos, secuestro de los reductores necesarios para evitar daños por el oxígeno, entre otros procesos (Lichtman, 2007; Singer *et al*, 1972).

En la doble capa lipídica de la membrana se encuentran cantidades considerables y casi equivalentes de colesterol y fosfolípidos. En condiciones fisiológicas la bicapa lipídica se encuentra en un estado líquido, permitiendo que las proteínas transmembrana y las moléculas de la superficie celular se muevan en el plano de la monocapa. Esta fluidez de la bicapa está influenciada por varios factores físicos como la temperatura, el contenido de colesterol libre y el grado de saturación de fosfolípidos de ácidos grasos, entre otros (Lichtman, 2007).

Los principales fosfolípidos son la fosfatidil serina, la fosfatidil etanolamina y el fosfatidil inositol, estos ubicados en la capa interna; mientras que otros como la fosfatidilcolina y la esfingomielina se orientan principalmente en la monocapa externa (Lichtman, 2007).

La distribución asimétrica de los lípidos es relevante ya que la fosfatidil serina y el fosfatidil inositol en mayor parte interaccionan con proteínas del esqueleto proteico como la espectrina y la proteína 4.1R para generar un anclaje con este y la bicapa lipídica. Así mismo, se presume que tal distribución está implicada en la regulación de la hemostasis pues el “flipping” de los lípidos contribuye en la señalización para activar la cascada de la coagulación, fenómeno que además se asocia con señales apoptóticas. (Daleke, 2008).

Estas proteínas tienen diversas funciones, algunas son donadoras de cationes, transportadores de agua y otras actúan en la adhesión de células sanguíneas. De las más destacadas se debe mencionar a la espectrina, la cuál es una de las proteínas más abundantes, abarca aproximadamente más del 70% del eritrocito. Es un tetrámero compuesto de cadenas alfa y beta que se enrollan una alrededor de la otra; específicamente la espectrina se une a la bicapa lipídica con ayuda de la ankirina estableciendo un enrejado que sufre reordenamientos cuando el GR se somete a un estrés mecánico. Esto permite que permite que la célula cambie de forma pero que no modifique su área superficial. La alteración en cualquiera de estas uniones afecta la estabilidad de la membrana; y se ha asociado que las mutaciones en la ankirina son el principal defecto en los individuos con Esferocitosis Hereditaria clásica (Eber *et al.*, 2004; Lichtman, 2007).

Otro grupo de proteínas de membrana importantes que suelen estar implicadas en las membranopatías, son un conjunto de intercambiadores aniónicos asociados a diversas actividades fisiológicas como el mantenimiento del equilibrio osmótico y del volumen celular, pues se encargan del intercambio $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, la unión de IgG, la remoción celular y el mantenimiento de la integridad estructural de la célula (Arce *et al.*, 2005; Dorin *et al.*, 2009). A esto también contribuyen la banda 4,1 y 4,2. La primera se encarga de la estabilización de interacciones entre la espectrina y la actina con la bicapa lipídica y

permite la formación de complejos entre las fibras de las mismas (Smith *et al*, 2006; Lichtman, 2007).

Las proteínas de la membrana del eritrocito no son exclusivas de éste. Por el contrario son componentes de la mayoría de las células e incluso desempeñan las mismas funciones. La mayor parte de estas proteínas están relacionadas estructuralmente pero difieren bastante de su patrón genético. Esta diversidad genética podría explicar por qué la expresión clínica de muchas de las mutaciones de las proteínas de membrana se limita al linaje eritroide. Dentro de los mecanismos implicados en este fenómeno se encuentra el “splicing alternativo” en etapas de desarrollo específico y el uso de codones de iniciación alternativos o de diferentes promotores que crean múltiples isoformas de estas proteínas. Las mutaciones dentro de una región de la proteína pueden dar lugar a diferencias marcadas en las anomalías de la función y el fenotipo clínico (Lichtman, 2007).

Bandas en gel PAGE-SDS	Proteína	Localización cromosómica	Tamaño del gen (Kb)	Número de exones	Número de aminoácidos	Peso molecular (aprox/deducido)	Símbolo del gen	Periférica (P) o Integral (I)
1	α espectrina	1q22-q25	80	52	2 429	240/281	SPTA1	P
2	β espectrina	14q23-q24.2	>100	32	2 137	220/246	SPTB	P
2.1	Ankirina	8q11.2	\approx 160	42	1 880	210/206	ANK1	P
2.9	α aducina	4p16.3	-	-	-	103/81	-	P
	β aducina	2?	-	-	-	97/80	-	P
3	AE1	17q12-q21	17	20	911	90-100/102	EPB3	I
4.1	Proteína 4.1	1p33-p34.2	>250	23	588	88+78/66	EL1	P
4.2	Palidina	15q15-q21	20	13	691	72/77	ELB42	P
4.9	Dematina	-	-	-	-	48/52/43+46	-	P
	p55	Xq28	> 4	6	466	55/53	MPP1	P
5	β actina	7pter-q22	-	-	-	43/42	ACTB	P
	Tropomodulina	9q22	-	-	-	43/41	TMOD	P
6	G3PD	12p13	-	-	-	35/36	G3PD	P
7	Estomatina	9q34.1	40	7	287	31/32	EPB72	I
	Tropomiosina	1q31	-	-	-	27+29/28	TPM3	P
8	Proteína 8	-	-	-	-	23/-	-	P
PAS-1	Glicoforina A	4q31	-	7	131	36/14	GYPA	I
PAS-2	Glicoforina C	2q14-q21	14	4	128	32/14	GYPC	I
PAS-3	Glicoforina B	4q31	-	5	72	20/8	GYPB	I
	Glicoforina D	2q14-q21	14	4	106	23/11	GYPD	I

Figura 1. Clasificación de proteínas de membrana según su corrida electroforética (SDS-PAGE) (Estrada *et al.*, 2002)

Las principales proteínas que conforman la red del citoesqueleto y que están inmersas en la membrana del GR son alfa espectrina, actina, proteína 4,1 R y aducina, entre otros. Sin embargo las que tienen mayor importancia en la integridad de la estructura celular son la ankirina que une la bicapa lipídica a la espectrina y la banda 3 que hace uniones a través de sus dominios citoplasmáticos (Lichtman, 2007).

Según su movilidad electroforética en SDS-PAGE las proteínas de membrana eritrocítica se han clasificado en 8 grupos o bandas tal como se aprecia en la figura 1. Dentro de las mutaciones más importantes en la membrana del eritrocito, se tienen aquellas implicadas con la banda 1 y 2 correspondientes a α y β espectrina respectivamente. La banda 2.1 también llamada Ankirina, la banda 3 o intercambiador iónico y las bandas 4.1 y 4.2 ya que estas proteínas forman asociaciones que son el pilar de la organización de la membrana eritrocítica, y por ello fallos en cualquiera de estos componentes o cambios en la misma membrana son causa de diferentes enfermedades. En el presente trabajo sólo se concentrará en la Esferocitosis Hereditaria donde existe una reducción en el área superficial y el volumen del GR, dando así la morfología esferocítica característica de la patología (Estrada *et al.*, 2009 y Hoffbrand *et al.*, 2005).

Como se puede apreciar en la figura 2, la espectrina se une con la bicapa lipídica a través de la ankirina la cual a su vez interactúa con la banda 3. El objetivo de la banda 4.2 es estabilizar la unión entre la ankirina y el intercambiador aniónico banda 3. La banda 4.1 y la aducina se encargan de estabilizar la asociación de la espectrina con la actina. Esta última forma microfilamentos con la tropomiosina, a los que se asocia la proteína tropomodulina (Lichtman, 2007).

La banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de estos microfilamentos de actina. La estructura de la doble capa lipídica y esta compleja interacción proteica resultan fundamentales en la organización del citoesqueleto (Arce *et al.*, 2005; Dorin *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, todas las proteínas del citoesqueleto en conjunto contribuyen en el buen funcionamiento del eritrocito, conservando su forma bicóncava y

confiriéndole la resistencia necesaria para que alcance su vida media recorriendo toda la microvasculatura del cuerpo

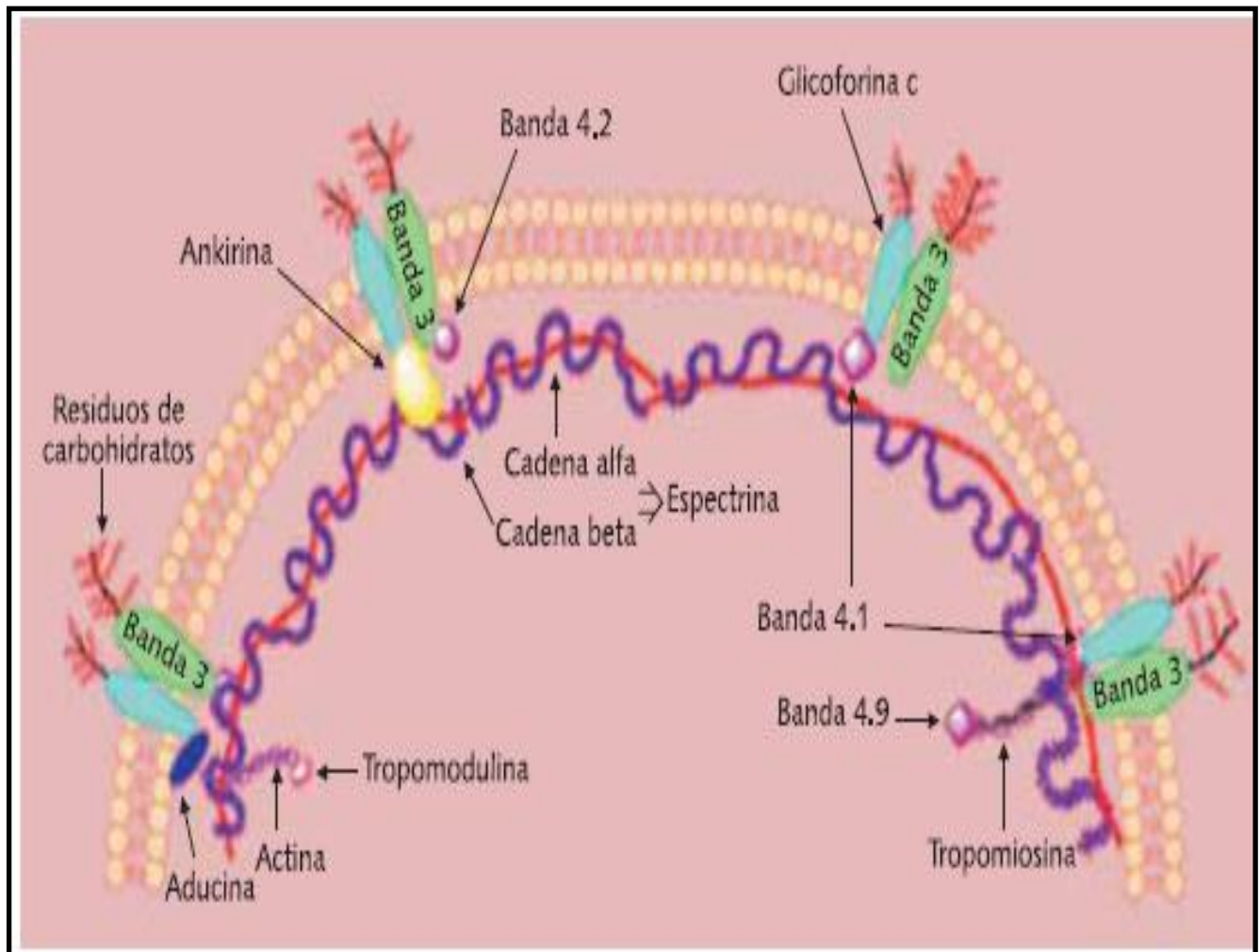


Figura 2. Estructura de la membrana del eritrocito. (Dorin et al., 2009)

Esferocitosis Hereditaria (EH)

Es una enfermedad que representa uno de los desórdenes hemolíticos más frecuentes, en donde los signos clínicos son muy heterogéneos. En la EH clásica es característico encontrar hemólisis extravascular, esplenomegalia, cálculos biliares, hiperbilirrubinemia, fatiga, anemia; entre otros. Esta patología posee un patrón hereditario autosómico dominante en el 75% de los casos (Sáenz *et al.*, 2008). Este trastorno se puede presentar en todos los grupos étnicos, sin embargo, es frecuente en individuos con ancestros del norte de Europa en donde se estima una prevalencia de una persona afectada por cada 2500. (Estrada *et al.*, 2009).

Para la población occidental se ha mencionado una frecuencia de 1:5000 casos de EH. No obstante, se puede estar ante un subregistro del número real de casos debido a que es un padecimiento con clínica diversa y con un diagnóstico basado principalmente en pruebas bioquímicas que se alteran hasta que exista una relación superficie/volumen notablemente disminuida y en donde muchas veces los pacientes cursan asintomáticos por gran tiempo. (Perrotta *et al.*, 2008).

Pese a su diverso comportamiento la EH se suele clasificar en cuatro tipos, en donde los dos primeros son los más importantes y numerosos (Sáenz *et al.*, 2008 y Ricard, 1993), los mismos se detallan a continuación:

- **Clásica o típica:** En este cuadro es común encontrar signos de hemólisis leve o moderada en donde se observa esplenomegalia e ictericia con niveles de hemoglobina disminuidos o normales compensados con reticulocitosis. El cuadro puede complicarse con colelitiasis y crisis anémicas.
- **Leve o asintomática:** en este tipo se encuentran hasta un 30% de los individuos, estos suelen detectarse mediante estudios familiares, o posterior a esfuerzos físicos intensos en donde se manifiestan ciertas dolencias.

- **Atípica con hemólisis grave:** se remite a menos de un 5% de los casos, los cuales se relacionan con patrones de herencia autosómicos recesivos y la mayoría tienen dependencia transfusional.
- **Neonatal:** es de difícil diagnóstico, pues los síntomas se confunden comúnmente con la EHRN. Los estudios familiares positivos correlacionan hasta en un 75% de los casos con EH, por lo que resultan de suma importancia en el establecimiento de diagnósticos diferenciales.

Diagnóstico

Esta membranopatía da como resultado una pérdida de la membrana a través del paso esplénico, lo que desestabiliza la forma eritrocítica y produce células redondas con una relación superficie/volumen disminuida que se refleja en un incremento en la vulnerabilidad del GR frente a la lisis hipotónica en comparación con los GR normal. Además se puede cursar con compute de reticulocitos aumentado al igual que la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), esto como parte de un mecanismo que compensa la destrucción rápida de GR por parte del bazo (Sáenz *et al*, 2008).

Es por lo anterior que en el laboratorio puede encontrarse una resistencia osmótica disminuida que se evidencia mediante el desplazamiento hacia la derecha de la Curva de Fragilidad Osmótica incubada en la mayoría de los casos. Esta técnica es una medida de la susceptibilidad de las células al estrés osmótico, que en el caso de los GR normales debido a su forma bicóncava y al exceso de área superficial según su volumen, le permite aceptar agua hasta 1,8 veces su tamaño. Aunado a esto surge la técnica de la Prueba Rosada de Glicerólisis o “Pink Test”, en donde se pone en práctica el mismo fundamento que para la FO, con la variante de que el glicerol retarda la entrada de agua a los GR lo que permite una mejor determinación del tiempo que tarda en darse la lisis osmótica (Rodríguez *et al*, 1989).

A partir de 1990 surge una prueba bioquímica alternativa conocida como criohemólisis la cual, según Streichman y colaboradores (Streichman *et al*, 1990;

Streichman y Gescheid, 1998) no depende necesariamente de la relación área/volumen sino que han observado que los GR defectuosos suspendidos en soluciones hipertónicas son más susceptibles a cambios de temperatura que las células normales. Ésta al no basarse netamente en la forma del eritrocito, permite identificar todos los casos de Esferocitosis Hereditaria incluyendo a los portadores asintomáticos (parientes de los pacientes con diagnóstico) quienes todavía no presentan gran cantidad de células esféricas como tal, aunque si tienen GR con cierto daño en la membrana. La criohemólisis posee además ventajas como bajo costo, procedimiento simple y resultados en corto tiempo (Streichman *et al*, 1990; Streichman y Gescheid, 1998).

Tratamiento

Se ha observado que los individuos con Esferocitosis Hereditaria pueden mejorar el cuadro de hemólisis mediante la esplenectomía completa, la cuál disminuye el grado de anemia e hiperbilirrubinemia en la mayoría de individuos con EH. Pero al ser un procedimiento quirúrgico involucra riesgos de infecciones postoperatorios, así como las contraindicaciones que conlleva el uso de anestesia en ciertos casos. Por lo que esta decisión se deja al criterio del médico quién evalúa la situación específica de cada paciente (Lichtman *et al*, 2007 y Richard, 1993). Sin embargo, desde la década de los 90 se ha practicado la esplenectomía parcial con resultados satisfactorios en la mejoría hematológica y generalmente sin complicaciones postquirúrgicas (Estrada *et al.*, 2009). Se recomienda suplemento de ácido fólico de igual manera que en el caso de otras anemias hemolíticas (Sáenz *et al*, 2008).

METODOLOGÍA

Contacto de familias diagnosticadas con Esferocitosis Hereditaria.

Se utilizó una base de datos existente en el CIHATA perteneciente a estudios previos en la población de interés. Dicha base de datos se actualizó primeramente pues esta se originó a partir de un estudio en 1989, y muchos de los individuos ya no estaban disponibles. De los que si estaban, se convocó a los individuos previamente diagnosticados y sus familias a una reunión en donde se les explicó detalladamente sobre el proyecto y la importancia del mismo en nuestro país; esto se hizo en los domicilios familiares, en donde fueron entrevistados personalmente utilizando un cuestionario elaborado con el fin de obtener datos personales, clínicos y culturales. (anexos) Esta visita se realizó con fondos económicos personales ya que la presente investigación corresponde a una parte de un proyecto de investigación, el cual está pendiente de aprobación en Vicerrectoría de la Universidad de Costa Rica.

Bajo la anuencia de cada persona se procedió a la entrega del consentimiento informado para su lectura y firma, posterior a esto, se les hizo partícipes del estudio (Ver Anexo 1 y 2).

La base de datos se originó de un proyecto realizado con anterioridad, tal como ya se mencionó. En ese estudio de 1989 se utilizaron igualmente técnicas bioquímicas para el diagnóstico de Esferocitosis. En la base de datos se cuenta con la siguiente información de las personas: el nombre completo, la cédula, el teléfono y localidad. El tamaño de la muestra utilizado comprendió 3 familias, que suman en total 10 individuos con Esferocitosis Hereditaria ya diagnosticada, además de 15 familiares que pueden comportarse como posibles portadores de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 1989). Este número de muestras no representa un número significativo, simplemente son el totalidad de muestras que se obtuvieron al visitar los domicilios familiares de los contactos disponibles a participar en la investigación los cuáles fueron analizados como casos en este estudio exploratorio de casos y controles.

Los criterios de inclusión para los participantes son: miembros de familias dentro de las cuales se hayan dado uno o más diagnósticos de Esferocitosis, según la base de datos del CIHATA. Los criterios de exclusión son: familias sin diagnósticos de Esferocitosis.

Adicionalmente se buscó un grupo control de 34 personas, para el cual se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: sexo y edad similar al grupo en estudio, y que no hayan tenido diagnóstico de ningún problema a nivel del glóbulo rojo. Los criterios de exclusión fueron: personas o sus familiares cercanos que hayan sido diagnosticadas con alguna hemoglobinopatía o anemia hemolítica así como aquellos que presenten anomalías en el hemograma.

Posteriormente se procedió a la obtención de las muestras de sangre total anticoaguladas con EDTA. Se extrajeron 1 ó 2 tubos con 5 mL cada uno mediante venopunción. Las muestras fueron procesadas en menos de 6 horas lo cuál corresponde a la denominación de muestra fresca, mientras que las muestras con la característica de incubada, fueron aquellas que posterior a la obtención de la misma se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Evaluación de la presencia de Esferocitosis Hereditaria a cada participante en estudio a partir de parámetros hematológicos.

Se realizó un hemograma completo en el equipo del Departamento de Análisis Clínico de la Facultad de Microbiología Sysmex SF-3000, o en la sección de Hematología del Hospital San Juan de Dios (HSJD) Sysmex 2000, en donde se tomó en cuenta los parámetros de Hb, hematocrito (Hto), CHCM, VCM y conteo de reticulocitos.

Realización de técnicas bioquímicas para la estandarización del método de Criohemólisis Hipertónica.

Se procesaron los controles negativos por la técnica de criohemólisis con el fin de establecer el punto de referencia negativo aportado por los controles sanos, y comparado con la literatura. Con esto se trató de clasificar los resultados.

Posteriormente se compararon los datos obtenidos con las técnicas de Curva de Fragilidad Osmótica, Prueba Rosada de la Glicerólisis Ácida y el método de Criohemólisis Hipertónica para valorar la efectividad de este último. Esto con el fin de aportar resultados que correlacionen con la clínica de los pacientes diagnosticados, así como valorar la posibilidad de detectar portadores de la enfermedad. A continuación las metodologías para cada una de las pruebas.

-Curva de Fragilidad Osmótica según el método de Dacie y Lewis (Sáenz et al tomo II, 2008).

En tubos de 5 mL se colocaron cada una de las diferentes soluciones de NaCl desde 0,10%, 0,30%, 0,40%,0,45%,50%, 0,55%, 0,60%, 0,65%, 0,70%, 0,75%,0,80%,0,85%; y se agregó a cada tubo 20 µL de la muestra total fresca obtenida con EDTA. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, seguidamente se centrifugó por 1 minuto a 3000 rpm y se leyó el sobrenadante a una longitud de onda de 540 nanómetros (nm).

El porcentaje de hemólisis corresponde a:

$\% \text{ Hemólisis} = (\text{DO del tubo de cada paciente} / \text{DO del tubo con } 0.10\% \text{ de NaCl}) \times 100.$

- Prueba Rosada de la Glicerólisis ácida según Vettore et al (Sáenz et al, 2008).

Se tomaron 10 µL de sangre total fresca y se mezclaron con 3 mL de una solución amortiguadora de bis-tris, se agitaron y luego se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm.

$\% \text{ de hemolisis} = (\text{DO del tubo de paciente} / \text{DO tubo patrón}) \times 100$

Los pacientes con Esferocitosis suelen presentar un porcentaje de hemólisis mayor a 28.5%.

- Prueba de Criohemólisis hipertónica según Streichman et al. (Streichman et al, 1990; Streichman y Gescheidt,1998):

La muestra fresca se centrifugó a 3500 rpm por 5 min para separar el plasma del botón eritrocitario, posteriormente se lavaron los glóbulos rojos en solución salina fría y se hizo una suspensión final entre el 50-70% de las células en frío.

Se tomaron 2 ml de amortiguador de sacarosa 0.7 M pH 7,4 y se mantuvo en baño a 37 ° C, luego se depositaron 50 uL del paquete de glóbulos rojos provenientes de cada paciente a cada tubo con el amortiguador y se incubó por 10 minutos a 37°C. Seguidamente, se colocaron las muestras 10 minutos exactos en un baño con agua a 0°C. Se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm y se leyó el sobrenadante de cada tubo centrifugado a 540 nm en un espectrofotómetro. El patrón de referencia de 100% de hemólisis se preparó con 50 uL de la muestra en estudio y 2 mL de agua destilada, se centrifugó por 10 min a 3000 rpm. Esta solución se lee a 540 nm. Tanto la solución al 100% de hemólisis como las muestras se trabajaron por duplicado. El porcentaje de criohemólisis es igual a:

$$\% \text{ criohemólisis} = (\text{Densidad óptica } 540\text{nm paciente} / \text{DO } 100\% \text{ hemólisis } 540\text{nm}) \times 100.$$

Según estudios realizados por Streichman y colaboradores en 1998, el intervalo de referencia está entre 3-15% y se determina que existe Esferocitosis Hereditaria cuando el porcentaje de criohemólisis es mayor al 20%.

Análisis de los datos.

Para el análisis de los datos se utilizó la estadística descriptiva para los parámetros hematológicos de rutina en donde se trabajó con promedios, estos parámetros hematológicos fueron realizados con el fin de evaluar los criterios de inclusión y exclusión anteriormente expuestos Además, para la comparación de las pruebas bioquímicas se realizó una comparación de las similitudes entre los resultados de las tres pruebas. Para ello se utilizó una tabla de contingencia (Cuadro 2) en donde se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada una de las

pruebas, para observar de esta manera cuales presentan valores más cercanos a uno, número ideal para pruebas diagnósticas, esta tabla de contingencia se deriva de la teoría o de la estadística natural también conocida como estadística bayesiana.

Cuadro 1. Cuadro de contingencia para analizar datos por la estadística descriptiva bayesiana.

	<u>Enfermo</u>	<u>Sano</u>	
<u>Positivo</u>	<u>VP</u>	<u>FP</u>	<u>Total positivos</u>
<u>Negativo</u>	<u>FN</u>	<u>VN</u>	<u>Total negativos</u>
	<u>Total enfermos</u>	<u>Total sanos</u>	

RESULTADOS

Para este estudio se trabajó con tres diferentes poblaciones, la primera comprendida por un grupo de 10 individuos designados como afectados, quienes contaban con un diagnóstico previo de Esferocitosis Hereditaria. La siguiente población compuesta por 15 familiares directos o de primera y segunda línea de consanguineidad con respecto a los ya diagnosticados. Por último se completó un número de 34 controles negativos, es decir individuos que nunca habían sido diagnosticados con EH ni con otra enfermedad hematológica y que además presentaron valores en el hemograma dentro de los intervalos de referencia.

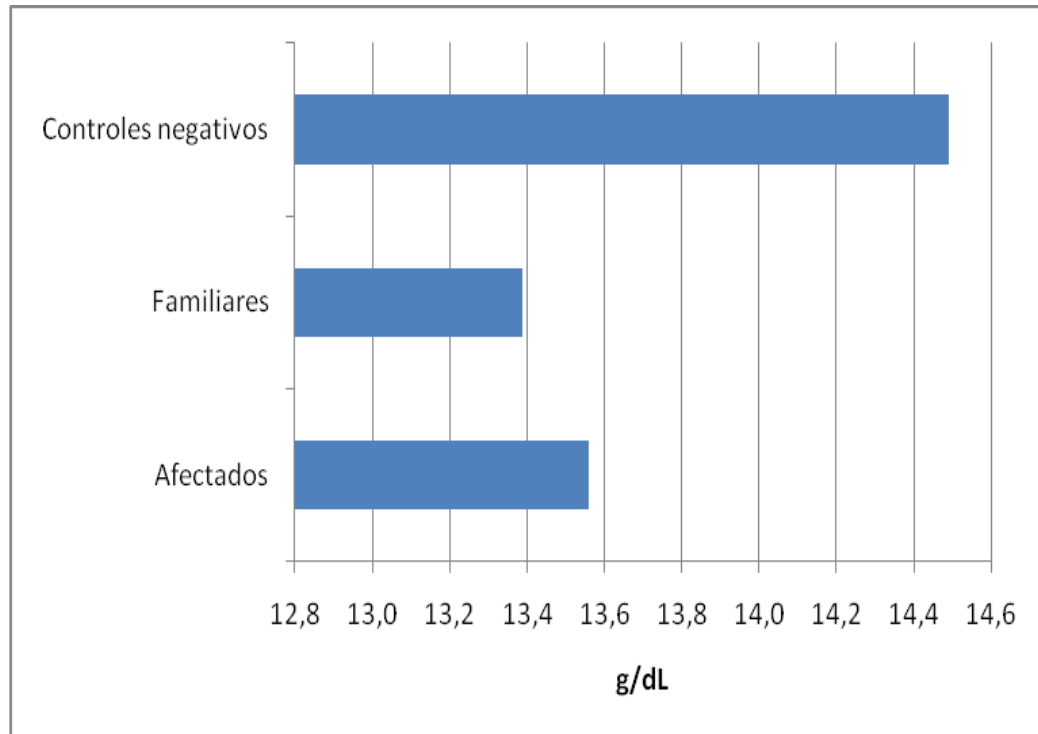
A estas tres poblaciones se les realizó un hemograma completo, en un equipo automatizado de la marca Sysmex del cual se lograron extraer valores promedios de algunos parámetros descriptivos, datos que se muestran en el cuadro 1. Alteraciones en dichos parámetros hematológicos se han relacionado como marcadores de daños en la membrana del eritrocito.

Para cada uno de estos valores descriptivos se logró graficar el comportamiento de cada parámetro en las tres poblaciones. Se tiene así, como para la hemoglobina, el grupo control fue el que presentó los valores más altos, alcanzando un promedio de 14,5 g/dL, mientras que los familiares y afectados muestran valores aproximadamente unos 2 g/dL más bajos con respecto a los controles, sin embargo ambos valores se mantienen dentro de los intervalos de referencia normales establecidos.

Cuadro 2. Resumen de los niveles medios de los parámetros hematológicos según la población en estudio.

Parametro	Afectados	Familiares	Controles negativos
hemoglobina (g/dL)	13,56 ±1,30	13,36±1,06	14,49 ±1,29
CHCM(g/dL)	35,4±0,84	32,74±1,32	34,4 ±1,5
% reticulocitos	0,955 ±0,53	0,70 ±0,35	0,59±0,03
VCM (fL)	89,43 ±9,49	88,27 ±5,70	87,30 ±4,03
pks (103µL)	406,6 ±137,12	293,27 ±54,11	270,48 ±52,22
% esplenectomizados	70,0	-	-
Edad	31,0	28,7	28,7
% RDW	14,65±1,44	13,73 ±0,81	13,00 ±0,75

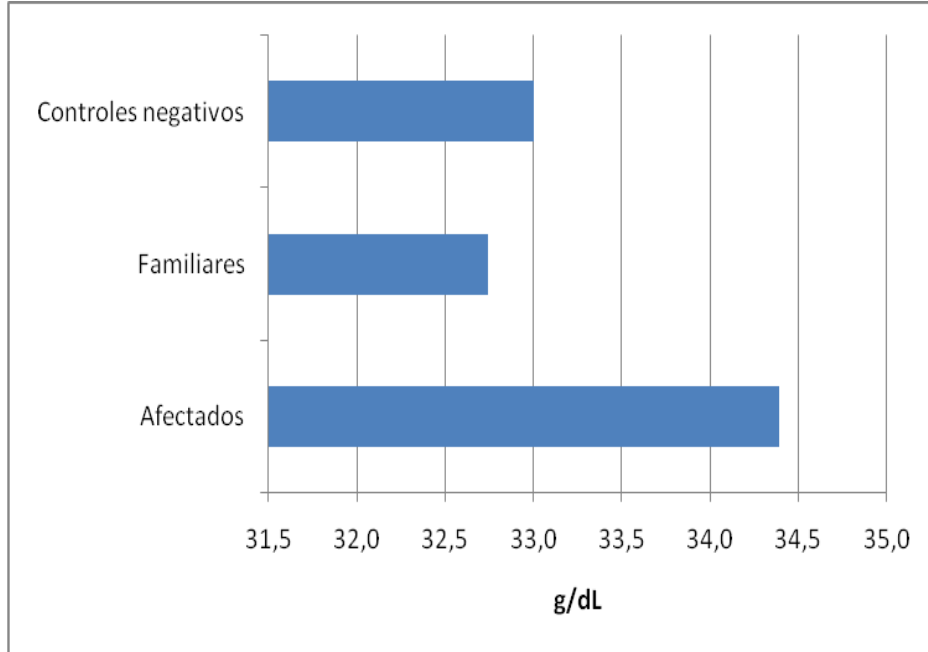
Fuente: Elaboración propia con base en hemograma realizado en equipo Sysmex a casos de estudio



Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro 2.

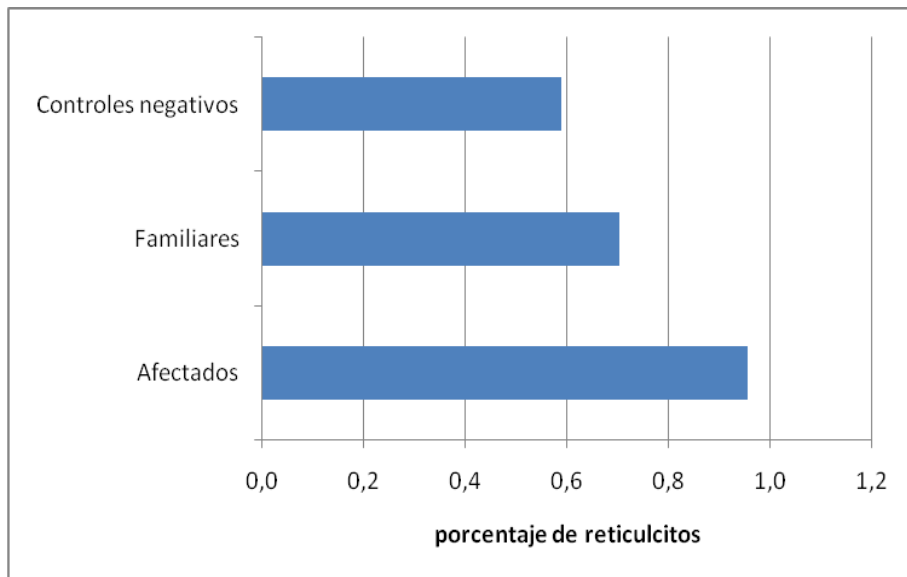
Figura 3. Nivel medio de hemoglobina según población en estudio.

En el caso de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, se observó en la figura 4 cómo el grupo de afectados presentó un incremento de este parámetro con respecto a las otras dos poblaciones, quienes mantuvieron valores más cercanos entre ellas y por debajo de los 33 g/dL. Algo similar ocurre en la figura 5, figura 6 y figura 7, en dónde se demuestra un porcentaje de reticulocitosis, RDW y conteo plaquetario respectivamente, mayor en la población designada como afectados, con respecto a las poblaciones de familiares y controles. En la última figura mostrada, cabe mencionar que la población de afectados en su mayoría son pacientes esplenectomizados.



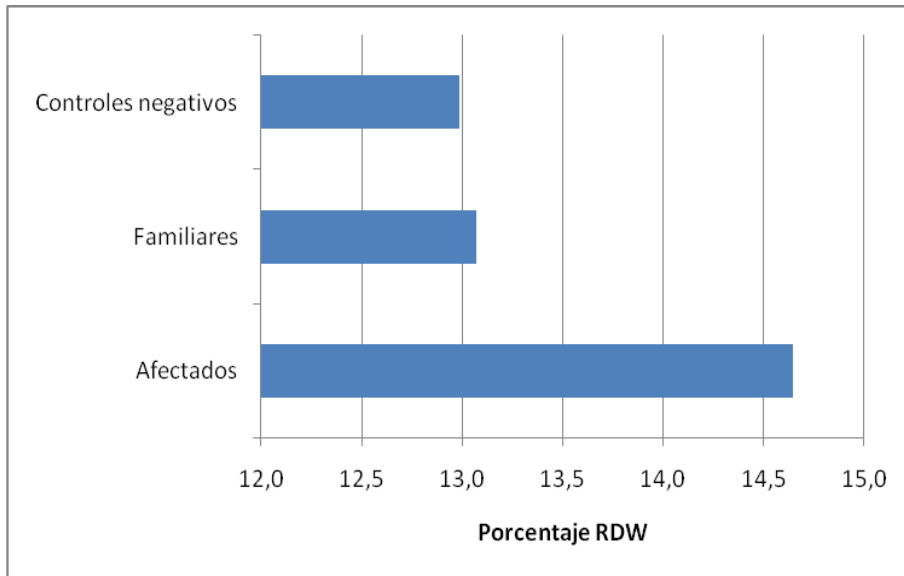
Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro 2.

Figura 4. Nivel medio de CHCM según población en estudio



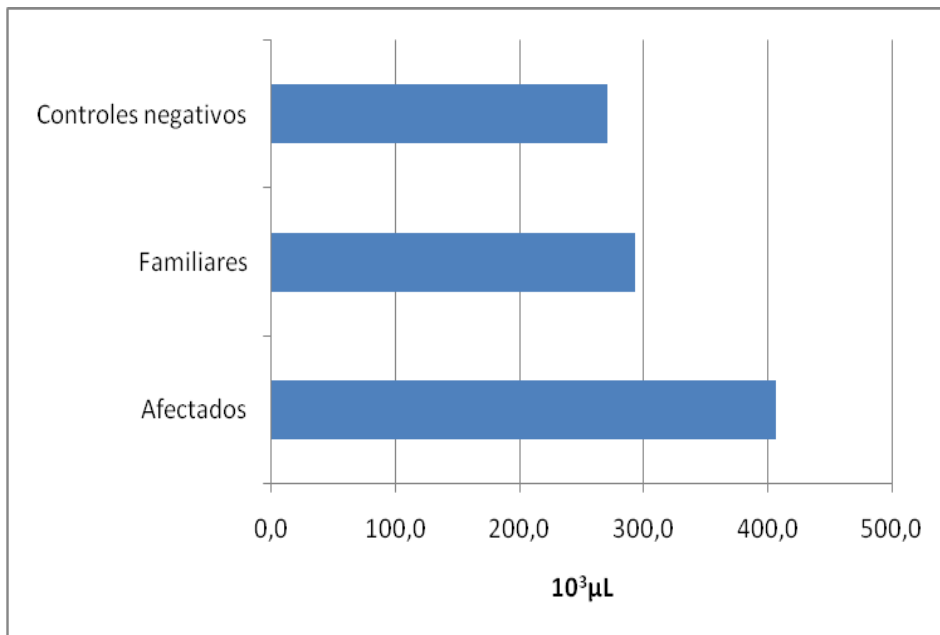
Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro 2.

Figura 5. Porcentaje de reticulocitos según población en estudio



Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro 1.

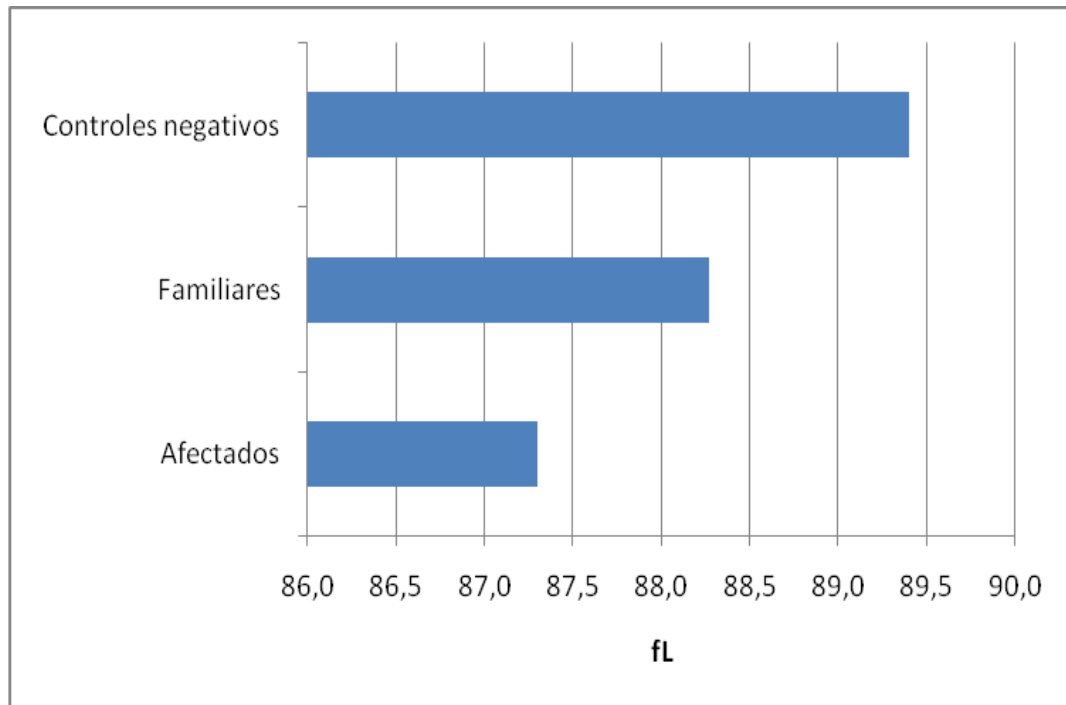
Figura 6. Porcentaje de RDW según población en estudio



Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro .2

Figura 7. Nivel medio de plaquetas según población en estudio.

En el caso del Volumen Corpuscular Medio, se obtuvo que las tres poblaciones se encuentran dentro de un rango de los 85 a los aproximadamente 90 fL, valores que se encuentran dentro del intervalo de referencia normal.

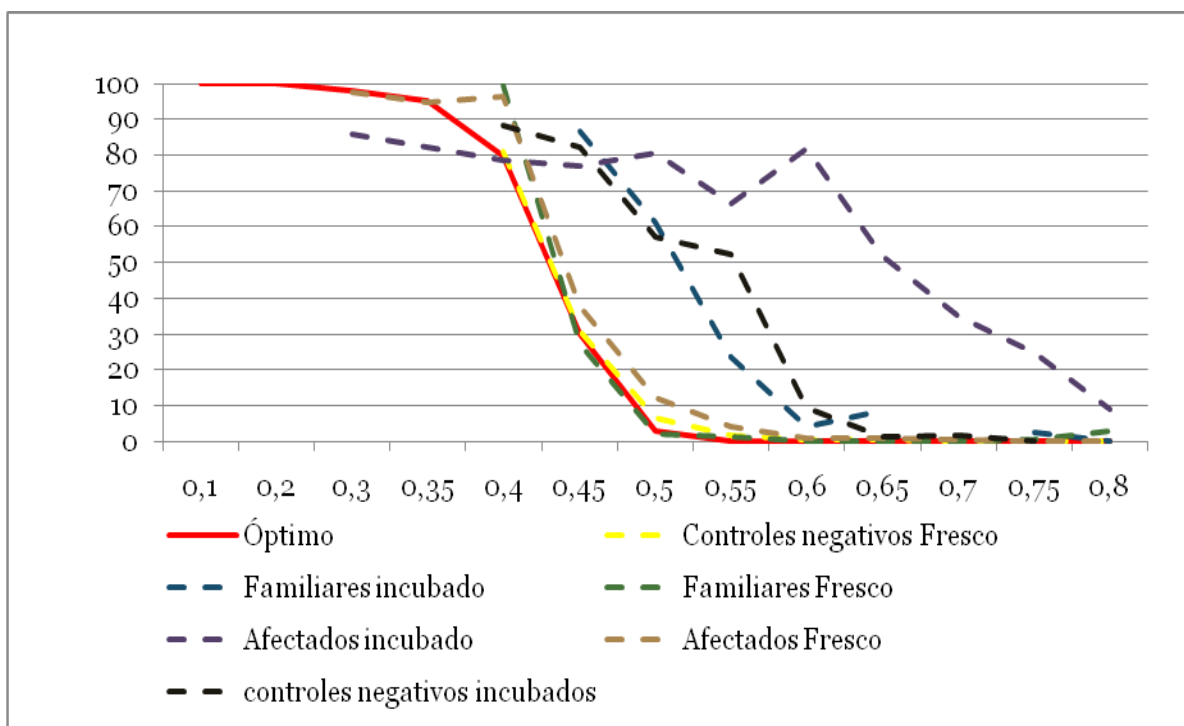


Fuente: Elaboración propia con base en Cuadro 2.

Figura 8. Nivel medio de VCM según población en estudio

En la figura 9, se comparan el valor medio de las curvas de Fragilidad osmótica con respecto a la curva de referencia (color rojo), en la cuál el porcentaje de hemólisis empieza a incrementarse a partir de la solución de 0,50% de NaCl. Se aprecia como la curva promedio de la población de controles negativos (color amarillo) y la curva representante de los familiares en condiciones de la muestra fresca (color morado) sigue un patrón similar a la curva de referencia e incluso en ciertos casos se encuentran superpuestas. Estas muestras frescas fueron procesadas en menos de las 6 horas después de extraídas. En el caso de las otras poblaciones, el comportamiento anterior no se mantiene pues los afectados

en condición de muestra fresca (color anaranjado) siguen el mismo patrón pero desplazados levemente hacia la derecha. Para el caso de las poblaciones de afectados y familiares en condiciones incubadas, es decir analizadas en las 24 horas siguientes posterior, las curvas están totalmente desplazadas hacia la derecha, es decir el porcentaje de hemólisis se empieza a incrementar desde valores de porcentaje de NaCl ligeramente hipotónicos, y además se suele perderse el patrón sigmoideo con respecto a la curva de referencia.



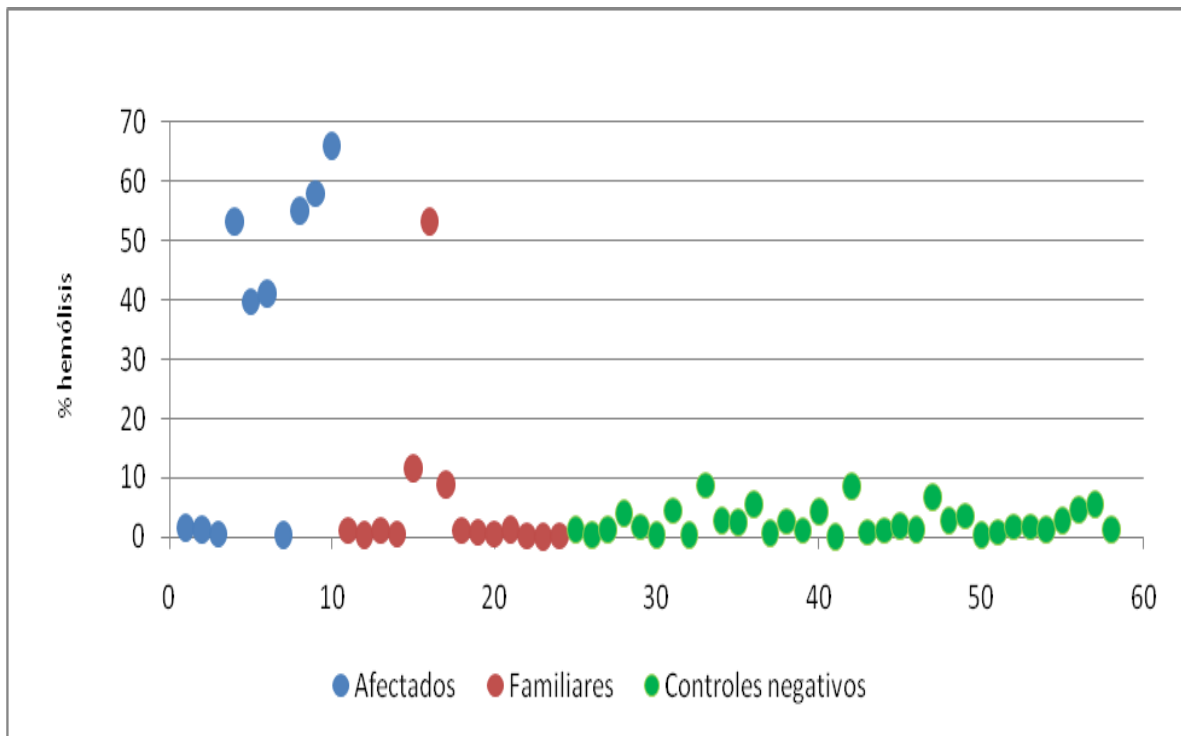
Fuente: elaboración propia con base en prueba de fragilidad osmótica realizada en el CIHATA.

¹ (Saénz et al., 2008)

Figura 9. Porcentaje de hemólisis por concentraciones de NaCl según población en estudio con relación al nivel referencia¹

En la figura 10 se aprecia el comportamiento de las tres poblaciones en estudio al enfrentar las muestras a una solución de glicerol. Se denota como los controles negativos no superan el porcentaje de hemólisis ni al 15%, esto siendo un patrón homogéneo, pues ningún dato sobrepasa este valor. En el caso de los familiares se tiene el mismo patrón anterior, excepto por tres datos que se alejan de la mayoría de muestras.

La población de afectados tiene un comportamiento particular en donde la mayoría de sus datos se ubican en porcentajes de hemólisis superiores aproximadamente al 40 %, sin embargo 4 individuos mantienen un patrón similar al observado para la mayoría de los familiares y totalidad de los controles negativos.

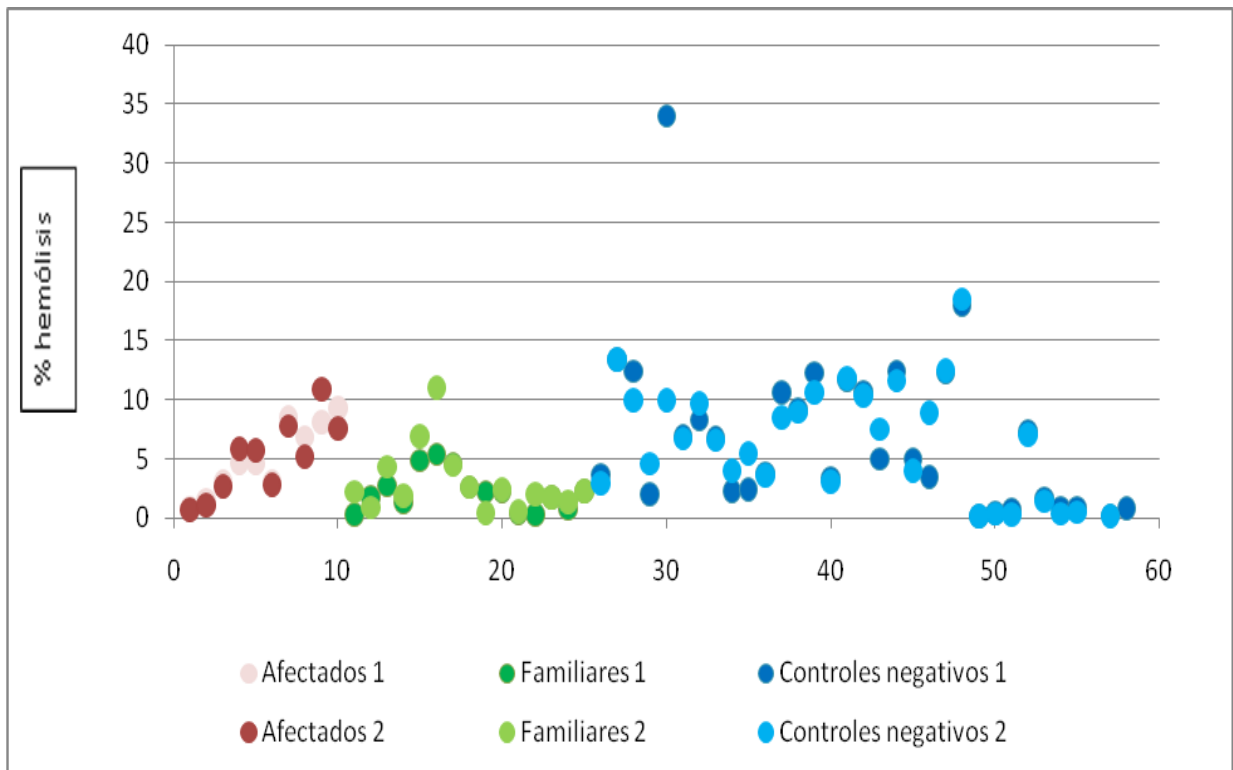


Fuente: elaboración propia con base en prueba rosada de glicerólisis realizada en el CIHATA.

Figura 10. Porcentaje de hemólisis en la Prueba Rosada de lisis con Glicerol o Pink test según población en estudio

La figura 11, muestra el comportamiento de las poblaciones en estudio, pero cada dato posee dos réplicas, esto porque la prueba de criohemólisis es una técnica en un proceso de estandarización en el cuál se deseaba analizar no sólo el valor de porcentaje de hemólisis, sino también la repetibilidad de las réplicas. Esta población de controles presentó valores elevados de porcentaje de hemólisis al contrario de lo que se observa en la población de individuos afectados.

El patrón común en esta técnica es que se aprecia una baja repetibilidad en cada una de los resultados, en donde las réplicas de cada individuo se alejan entre sí, esto se evidencia especialmente en la población de controles negativos.



Fuente: elaboración propia con base en prueba de criohemólisis.

Figura 11. Niveles de hemólisis por réplica en la técnica de criohemólisis según población en estudio.

Cuadro 3. Comparación descriptiva de las técnicas usadas para el diagnóstico de la EH

	Sensibilidad	Especificidad	Valor P Positivo	Valor P Negativo
Fragilidad Osmótica	0,80	1	1	0,83
Pink Test	0,60	1	1	0,71
Criohemólisis	0,60	0,50	0,55	0,56

En este cuadro 3 se nota como los parámetros estadísticos descriptivos calculados para la FO son lo más cercanos a uno, valor ideal en este tipo de análisis. Algo similar ocurre con la prueba del PT. Esta tendencia no se aprecia para el método de criohemólisis, la cual presentó los valores predictivos más bajos con respecto a las técnicas de FO y PT.

DISCUSIÓN

Al analizar los individuos de las poblaciones seleccionadas: afectados con un diagnóstico previo de Esferocitosis Hereditaria, sus familiares y un grupo de controles negativos; se logró comparar la aplicación de las tres técnicas sobre dichas poblaciones. Se pudo notar (figura 9) como la FO logra de desplazarse hacia la derecha en de los casos de los afectados, lo que correlaciona con el diagnóstico que se les había realizado con anterioridad de Esferocitosis Hereditaria (Rodríguez *et al.*, 1989).

Este desplazamiento de la curva se debe a que la FO es una medida de la capacidad de los GR para soportar un incremento en su contenido acuoso. Los esferocitos al presentar una reducción de la superficie de la membrana en comparación con el volumen celular, se vuelven susceptibles a la lisis osmótica en soluciones ligeramente hipotónicas (Saenz *et al.*, 1981). Cabe mencionar que esta tendencia se incrementó en la condición de las muestras incubadas por 24 horas a 37 °C, en contraste con la misma técnica pero utilizando las muestras frescas. Esto es de esperarse ya que la incubación es un estímulo al efecto intrínseco de los eritrocitos y se intensifica así la disminución de la resistencia de las células para soportar un estrés osmótico como el que se da, al enfrentar las muestras a los gradientes de soluciones salinas hipotónicas. Siendo así la curva claramente desplazada hacia la derecha en la población de afectados en condiciones incubadas.

En el caso de las muestras de los familiares, en condiciones incubadas se nota que la curva tiende a desplazarse hacia la derecha, en menor grado que la curva de la población afectada (Rodríguez *et al.*, 1989; Bolton *et al.*, 2004). Para estos familiares es recomendable repetir las pruebas para controlar los valores de la curva, además se debe correlacionar los hallazgos de las pruebas bioquímicas alteradas con los parámetros hematológicos descriptivos y otros marcadores de un posible caso de Esferocitosis Hereditaria. En esta técnica, tres de los familiares son los que presentan este patrón desviado hacia la derecha y sólo dos de ellos tienen uno o más marcadores sospechosos,

uno de estos posee una hemoglobina ligeramente baja según su sexo y está levemente elevado la CHCM. El otro caso tiene una hemoglobina igualmente muy cercana al rango inferior permitido y además muestra un porcentaje aproximadamente de 15 % en el RDW lo que es indicativo de anisocitosis en la muestra; el tercer caso no parece evidenciar ningún otro signo clínico compatible con el diagnóstico de EH,(Iolascon *et al.*,2010)

Respecto a la técnica Rosada de Lisis con Glicerol es de esperarse un comportamiento similar al obtenido por la FO para las poblaciones en estudio, puesto que el principio de la técnica es igualmente enfrentar a las muestras a un estrés osmótico. La variante en el caso del PT es el glicerol, el cual retarda la entrada de agua a los eritrocitos lo que permite medir el tiempo que toma la lisis osmótica. Los esferocitos al tener la razón entre área superficial/volumen disminuida, resisten por menos tiempo la lisis con respecto a los eritrocitos normales (Rodriguez *et al.*, 1989).

En la figura 10 se observó como esta técnica presentó una detección de seis casos de los individuos estudiados dentro de la población de afectados, y tres de ellos se comportaron con un patrón similar al de los controles negativos, que en el caso de la FO si fueron confirmados con patrón compatible con EH.

Importante recalcar que en el caso de la población de familiares, en esta misma figura 10 se aprecia un valor por encima del intervalo de referencia, resultado repetitivo para este mismo individuo en la prueba de FO, la cuál se presenta desviada hacia la derecha.

La figura 11 por su parte denota la técnica bioquímica que se presentó como alternativa innovadora para la confirmación de casos y para la detección de nuevos portadores, aunque estos fueran asintomáticos Esta técnica rige bajo el principio de que los glóbulos rojos al ser expuestos a cambios bruscos de temperatura en un medio hipertónico tienden a presentar cierto grado de fragilidad y por ende se hemolizan, ya que se ha visto que bajo estas condiciones la bicapa lipídica de los eritrocitos pasa a una fase de transición del estado fluido a un estado más rígido. Por lo que si la membrana y el citoesqueleto no puede reacomodarse ante este estrés al que se somete, resultará en el rompimiento de la membrana que desencadena el proceso hemolítico. El resultado al utilizar esta técnica no es

esperado según la literatura donde se reportan valores de sensibilidad y especificidad del 100%, mientras que en los resultados obtenidos se obtiene una sensibilidad del 60% y especificidad del 50%. Esto pese a seguir las indicaciones de los autores Streichman y colaboradores quienes describen el método en 1990. Se revisaron las variables de la técnica, las cuáles constaban básicamente del amortiguador y la temperatura. En el caso del amortiguador en un principio si se presentaron problemas en donde los resultados eran inconsistentes en todas las muestras procesadas en una primera etapa de prueba de reactivos, etapa que se dio previo al contacto de las familias participantes. Se logró cambiar el reactivo de sacarosa se preparó con éste el amortiguador, el cuál cabe recalcar debe prepararse antes de usar y no debe permanecer más de 8 días entre cada uso, pues constantemente se contaminaba con hongos por el enriquecimiento de sacarosa que está solución posee. Posterior a esta modificación, las siguientes muestras procesadas arrojaban valores muy cercanos o caían dentro del intervalo de referencia reportado en la literatura como normal, por lo que se decidió proseguir con las poblaciones a estudiar.

Otro variante que se realizó en la investigación, al ver que no se tenían datos como los reportados en la literatura, fue someter tres muestras de controles en un baño a 56°C por 15 minutos con el fin de inducir por un estrés mecánico los esferocitos en sangre. Con estas muestras se realizó la criohemólisis en donde los resultados sufren un incremento de la hemólisis reportado como el de la literatura, lo que hace pensar que se necesita un alto grado de esferocitos en sangre para observar un comportamiento consecuente al reportado para esta prueba.

Es importante recordar que esta investigación es un estudio exploratorio en donde se trabajó con un número de muestras reducido debido al subregistro de casos por la baja tasa de reporte de la enfermedad, y la carencia de una base de datos actualizada, entre otros. Por lo tanto se debe destacar que bajo el modelo de esta investigación sólo se pueden observar tendencias de los comportamientos de las diferentes poblaciones al analizarlas con las tres pruebas bioquímicas. Estas tendencias no se pueden establecer en este estudio si son significativas o no, pues no es pertinente este tipo de afirmaciones con un número de 10 muestras, por lo que la corroboración de la significancia de estas muestras queda pendiente

para estudios próximos en donde se considere un muestreo estadístico a partir de datos conocidos de prevalencia de la enfermedad, que ojala sean brindados por los centros de salud de la CCSS.

Por ser esta técnica nueva en el país se procedió a montar cada determinación por duplicado para corroborar precisión entre los datos, esta precisión fue casi nula, en donde en la figura 11 se observa que no hay reproducibilidad de los datos de las muestras.

El principio de la técnica propone que a diferencia de otras técnicas bioquímicas en donde el estrés osmótico hace que se lisen aquellas células con razones de superficie/volumen disminuidas. La criohemólisis induce de cierta manera un estrés mecánico que pone de manifiesto que los GR de los individuos con EH exhiben un patrón hemolítico característico ante los cambios de temperatura cuando están suspendidos en soluciones hipertónicas, este mecanismo no está bien aclarado pero proponen que este comportamiento es debido a la modificación de la membrana eritrocítica a causa de los defectos primarios que se pueden presentar en la EH. (Streichman et al., 1998; Ricard., 1993)

En el cuadro 3 se aprecia que el valor absoluto de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que involucran este método son sumamente bajos no siendo así al comparar las técnicas ya consolidadas de FO y PT, las cuáles tienen porcentajes más cercanos a 1; valor ideal. Sin embargo esta diferencia no se puede establecer si es significativa o no, debido a que no era pertinente realizar una prueba estadística de comparación cuantitativa entre los métodos, pues se contó con una limitante de muestras, y se trabajó con una población pequeña. Es aquí donde resulta importante tener esto en cuenta en próximos estudios, en donde se debe procurar aumentar la muestra, tal como se mencionó anteriormente.

Es necesario retomar el concepto de la EH como un síndrome en donde la expresión del padecimiento generalmente suele ser heterogéneo desde el punto de vista clínico y de las pruebas bioquímicas usadas hasta el momento. Se ha propuesto que esta variabilidad se debe a una penetrancia incompleta o a la expresión de genes modificadores, además de que

se debe tomar en cuenta que no exista otro defecto intrínseco del eritrocito que pueda afectar el fenotipo de la EH (Estrada *et al.*, 2009).

Ante estas complicaciones se debe considerar la implementación de técnicas de biología molecular que permitan precisar las alteraciones más frecuentes de las proteínas de membrana en pacientes ya diagnosticados, además valorar nuevamente familiares quienes por la baja sensibilidad de los métodos utilizados hasta el momento o por algún otro factor propio del síndrome esferocítico explicado anteriormente, no han podido tener un diagnóstico certero de su condición.

CONCLUSIONES

En el estudio exploratorio se percibió el desconocimiento de la enfermedad en la población costarricense incluso entre las mismas familias afectadas; situación con la cual este proyecto colaboró pues en los diferentes sitios visitados se aclaró la mayor cantidad de dudas por parte de los individuos participantes. Además se trató de concientizar a la población en general y al sistema de salud que la falta de claridad diagnóstica aunada a la escasa información de la enfermedad, pueden significar en un subregistro importante de los casos de Esferocitosis Hereditaria.

Otro aporte importante del estudio es que logró actualizar la base de datos con la que se inició el proyecto la cuál en un inicio estaba compuesta de muchas personas que ya habían fallecido, se contactó a familiares pese a que muchas de las nuevas generaciones no tenían conocimiento de la presencia o de la posibilidad de padecer esta patología; esta falta de concientización acerca de la enfermedad fue una de las limitaciones en el desarrollo del trabajo, por la cuál no se logró extender el número de muestras para el presente estudio.

Resultó claro que si bien cierto las técnicas bioquímicas son baratas y relativamente rápidas, estas herramientas no resultan específicas para la detección de casos, pues se basan netamente en el supuesto de la presencia de esferocitos en sangre periférica. Cabe destacar que la presencia de esta morfología está lejos de ser específica para la enfermedad en

estudio, por el contrario en muchos casos los esferocitos resultan como proceso secundario a otro tipo de enfermedades del sistema reticuloendotelial o de carácter metabólico.

En el caso de la prueba de criohemólisis, esta se reprodujo en el CIHATA, y se probó con población costarricense, sin embargo no se logró establecer un tipo de relación diagnóstica, por lo que se prefiere seguir trabajando con los métodos de FO y PT para el diagnóstico de los pacientes referidos al Centro.

Ante la limitante de muestra por problemas propios del proyecto, además de las limitaciones de prevalencia y reporte de la enfermedad que se justifican por la posibilidad de tener patrones de enfermedades hematológicas hereditarias combinadas; no se logra establecer una comparación estadísticamente significativa en donde se puedan hacer inferencias, sino que se hace una descripción de las tendencias obtenidas. Por esto es que se muestra la necesidad de realizar más estudios como este, en dónde se recomienda aumentar la muestra a partir de un modelo estadístico que permita correlacionar de manera adecuada y certera cada uno de los métodos diagnósticos.

Resulta importante el introducir técnicas moleculares en los próximos estudios que puedan mejorar el diagnóstico que permita una mejor descripción al cuerpo médico de la situación de los afectados y sus familiares, esto en beneficio de la atención que se pueda brindar en el sistema de salud del país.

Es necesario el seguimiento de investigaciones de esta índole en dónde se despierta la necesidad de mejorar las pruebas diagnósticas para estas poblaciones afectadas, sin embargo no se debe dejar de lado las investigaciones que vayan de la mano también con la búsqueda de nuevos tratamientos, que no incurran en procedimientos invasivos y que traten de mantener a los individuos estables y con calidad de vida (Moreira *et al.*, 2011).

Limitaciones

Las limitaciones se han ido mencionando a lo largo del presente trabajo, sin embargo se quiere puntualizar en ellas para tenerlas en cuenta en la realización de próximos estudio:

- Diseño experimental no responde a un modelo estadístico inferencial, esto por la naturaleza del estudio. En las investigaciones exploratorias se procede de una manera observacional solamente, es una preparación para investigaciones posteriores.
- Disponibilidad de los individuos quienes están en todo su derecho de negarse a participar en el estudio, esto muchas veces consecuencia de la falta de información que hay de la sociedad.
- Número de muestras, lo cual va muy relacionado a los anteriores enunciados en donde no se procedió con un muestreo estadístico precisamente por esa falta de contactos o de disposición de los individuos de la base de datos con la que se trabajó.

Proyecciones.

Los estudios exploratorios tienen la capacidad de brindar información importante acerca de un tema que se quiere estudiar con más detalle, por lo que se propicia el continuar la investigación tomando las limitaciones anteriormente mencionada y además en enfocarse en varios puntos de vista, que para el caso de la Esferocitosis Hereditaria se pueden mencionar:

- Estudios similares comparativos con mayor número de muestras.
- Estudios para definir los valores de referencia en la técnica de criohemólisis.
- Actualizar la base de datos de los individuos con Esferocitosis Hereditaria a nivel nacional en donde se trabaje de una manera estrecha con la Caja Costarricense del Seguro Social
- Además incluir en los estudios familiares las técnicas moleculares que puedan ayudar a discernir entre resultados en donde las pruebas bioquímicas no logran hacerlo por su naturaleza analítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arce, A., Villaescusa, R. (2005). Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*: 25(3).
2. Arceci, R., Hann, I., Smith, O. (1996). *Pediatric hematology*. 3ed Blackwell publishing.
3. Bolton, M. (2004). Hereditary spherocytosis; new guidelines. *Arch Dis Child*: 89, 809-821
4. Daleke, D. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*; 15:191-195.
5. Dorin, Y., Hicks, J., Montoya, A. (2009). La disfunción del eritrocito en la Hipoxia Tisular en pacientes con EPOC y su relación con estrés oxidativo. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex*: 22(4). 356-365.
6. Eber, S., Lux, S. (2004). Hereditary spherocytosis defects in proteins that connect the membrane skeleton to lipid bilayer. *Sem hematol*, 41:118-159
7. Estrada, M., Herrera, M., Mayo de las Casas, C., et al. (2009). Estudio hematológico, bioquímico y clínico de pacientes y familiares con esferocitosis hereditaria. *Rev Cubana de Hematología y Hemoterapia*; 25(3), 29-44.
8. Hoffbrand, V. A., Catovsky, D., & Tuddenham, E. (2005). *Postgraduate haematology* (5th ed.). Malden, MA: Blackwell.
9. Iolascan, A., Avvisati, R., Piscopo, C. (2010) *Red Cell Membrane Disorder (HS)* Elsevier Masson. *Transfusion et Clinique biologique*: 17, 138-142.
10. Lichtman, M., Beutler, E., Kipps, T., et al. (2007). *Williams Hematology*. Mc Graw Hill, 7. Capítulo 44
11. Moreira, L., Días, T., Dias, L., et al. (2011). Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (HS) a first approach. *Food and Chemical toxicology*. 520-526.

12. Perrotta, S., Gallagher, P., Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet*; 372(9647):1411-1426.).
13. Ricard, M. (1993). La Esferocitosis Hereditaria y su diagnóstico en la práctica clínica. Universidad Complutense de Madrid.1-244.
14. Rodríguez, W., Sáenz, G.,Orlich,J.(1989). Diagnóstico de la Esferocitosis Hereditaria con pruebas de Glicerolisis. San Jose, Costa Rica. *Rev costa cienc med*:10(2) 57-67
15. Sáenz, G., Orlich, J., Chaves, M., Montero Gerardo., et al.(1981). Observación sobre una familia con Esferocitosis Hereditaria y Revisión de la literatura.. San José., Costa Rica: Caja Costarricense del Seguro Social.17-27).
16. Sáenz,G.,Rodríguez,W.,et al. , V ed. (San José., Costa Rica: Caja Costarricense del Seguro Social). pp.641-648.
17. Sáenz,G.,Rodríguez,W.,Salazar,L.,et al. (2008). Cap 49: Pruebas para detección de defectos de membrana y de autohemólisis. En *Hematología Analítica tomo II*,
18. Singer, S., Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*.175:720–731.
19. Smith,C., Marks, A., Lieberman, M. (2006).*Bioquímica Básica de Marks, Un Enfoque Clínico*. Mc graw Hill ,2. 663-680.
20. Specter, S., Hodinka, R., Wiedbrauk, D., y Young, S. (2008). Diagnosis of viral infections. En *Hematología Analítica*, Sáenz,G.,Rodríguez,W.,et al. , V ed. (San José., Costa Rica: Caja Costarricense del Seguro Social). pp. 257-263.
21. Streichman, S., Gescheidt,Y.,Tatarsky,I. (1990). Hypertonic Cryohemolysis: A Diagnostic Test for Hereditary Spherocytosis:. *Am J Hem*; 35:104-109.
22. Streichman, S.,Gescheidt,Y. (1998). Cryohemolysis for the detection of Hereditary Spherocytosis: Correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hem*;58:206-212.

ANEXOS



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA

1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estandarización de la técnica de criohemólisis, y comparación de esta con otras pruebas bioquímicas para el diagnóstico de Esferocitosis Hereditaria

Nombre de la estudiante: Mariela Solano Vargas

Nombre de la tutora: Sandra Boza Oreamuno

Nombre del participante: _____

- A. **PROPÓSITO DEL PROYECTO:** La esferocitosis hereditaria es una enfermedad que consiste en la falta total o parcial de una o varias proteínas en el glóbulo rojo. A causa de este trastorno en la sangre, se produce anemia, que es un descenso en la hemoglobina, generalmente por largo tiempo; además se puede presentar fatiga,

pedras en la vesícula, ictericia (piel, ojos amarillos) y aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia) que predispone a infecciones con cierta frecuencia.

Este trabajo final de graduación (TFG) pretende comparar tres técnicas diagnósticas utilizadas para esta enfermedad, con el fin de concluir si una de ellas es mejor sobre la otra.

Estos análisis serán realizados en el CIHATA (Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines) y en el DAC (Departamento de Análisis Clínicos) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Toda la información adquirida será confidencial y el estudio durará aproximadamente 6 meses, en los cuales se analizarán las muestras de los participantes diagnosticados con esta enfermedad y sus familiares.

- B. ¿QUÉ SE HARÁ?:** Si acepta participar en este estudio, tendrá que llenar un formulario donde se recolectarán algunos datos de información personal y de su historia clínica. Luego se le tomará una muestra correspondiente a dos tubos de sangre pequeños, realizando una punción en la vena con una especie de jeringa. A partir de esta muestra de sangre, se realizarán un hemograma o estudio de la sangre completo para evaluar la presencia o ausencia de anemia, así como el porcentaje de glóbulos rojos jóvenes. Posterior a esto, se realizarán pruebas bioquímicas específicas para el estudio de esferocitosis que permitirán confirmar el diagnóstico y poder implementar una nueva prueba de laboratorio (Crioheólisis o hemólisis en frío) que en la actualidad no se utiliza en el país para el diagnóstico de esta enfermedad.
- C. RIESGOS:** La participación en este estudio no le significará ningún daño grave, solamente podrá sentir una molestia general que implica la toma de sangre y, a veces, un morete en el sitio de la punción. Este proceso lo realizará la tutora o la estudiante, las cuales son personal experimentado y calificado para esta labor.
- D. BENEFICIOS:** Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio que obtendrá será el contar con información más completa de la enfermedad que padece y que puede ayudar a describir mejor los cuadros clínicos de la población costarricense y sus familias afectadas.
- E.** Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con la tutora del TFG, Dra. Sandra Boza o con la estudiante, Mariela Solano, y ellas deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información, puede obtenerla llamando a la Dra. Boza al teléfono 2511-8589 ó 2222-1581 en el horario de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m.

- F.** Recibiré una copia de esta fórmula para uso personal.
- G.** Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiera.
- H.** Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima, nunca se va a mencionar su identidad.
- I.** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.
- J.** He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del participante (niños mayores de 12 años y adultos)
fecha_____

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal (menores de edad)
fecha_____

Nombre, cédula y firma del testigo
fecha_____

Nombre, cédula y firma del Tutor del TFG
fecha_____



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA

2. CUESTIONARIO

Estandarización de la técnica de criohemólisis, y comparación de esta con otras pruebas bioquímicas para el diagnóstico de Esferocitosis Hereditaria

Nombre de la estudiante: Mariela Solano Vargas

Nombre de la tutora: Dra. Sandra Boza Oreamuno

- Nombre del participante: _____
- Número de Cédula: _____
- Teléfono(s): _____

Edad: _____ Género: (F) (M) Estado Civil: _____

Nombre de los Hijos y otros familiares

- Sufre usted de alguno(s) de los siguientes padecimientos

- Presión Alta ()
- Diabétes ()
- Piedras en la vesícula ()
- Anemia ()
- Dependencia de transfusiones de sangre ()
- Ictericia (piel, ojos que se tornan amarillos) ()
- Esplenomegalia (agrandamiento del bazo) ()

-Otro(s) _____

- ¿Ha sido diagnosticado(a) con Esferocitosis Hereditaria u otro problema hematológico o enfermedad en la sangre?

Sí _____ No _____

¿Desde hace cuánto fue diagnosticado?: _____

¿En qué Centro de Salud se le realizó dicho diagnóstico? _____

¿Presentó usted alguno de los siguientes signos y/o síntomas, por los que acudió al médico, previo al diagnóstico?:

Cansancio ()

Dolores ()
Anemia ()
Esplenomegalia (agrandamiento del bazo) ()

Otros:

- ¿Conoce usted sobre esta enfermedad?

Sí _____ No _____

¿Dónde obtuvo dicha información?: _____

- Si quisiera conocer un poco más acerca de este padecimiento, ¿cuál de los siguientes medios le es accesible?
 - Panfletos ()
 - Correo electrónico ()
 - Consultas por teléfono ()