

Clasificación y métodos de diagnóstico de las membranopatías

Classification and diagnostic methods of membranopathies

Yadira Tamayo Rodríguez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2416-809X>

Olga Margarita Agramonte Llánes¹ <https://orcid.org/0000-0003-0880-9149>

Maydelin Miguel Morales¹ <https://orcid.org/0000-0003-2992-1447>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: rchematología@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: Las membranopatías son anemias hemolíticas hereditarias debidas a anomalías cualitativas o deficiencias cuantitativas de las proteínas del citoesqueleto del glóbulo rojo.

Objetivo: Actualizar el diagnóstico de las membranopatías con la inclusión de las últimas recomendaciones del comité de grupos de expertos a nivel nacional e internacional.

Métodos: Se realizó una revisión de la literatura en inglés y español, a través del sitio web PubMed y el motor de búsqueda Google académico, de artículos publicados en los últimos cinco años.

Análisis y síntesis de la información: Las enfermedades de mayor interés clínico son: la esferocitosis, la eliptocitosis y la estomatocitosis hereditaria. Estas en general se heredan con carácter autosómico dominante pero existen formas que se transmiten con carácter recesivo, sin descartar posible mutación de novo. Para su diagnóstico se utilizan pruebas que incluyen el estudio de la morfología de los glóbulos rojos, la fragilidad osmótica, la lisis de glicerol acidificado, la criohemólisis hipertónica, la prueba de unión a la eosina-5'-maleimida por citometría de flujo, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y la ectacitometría.

Conclusiones: Las membranopatías pueden sospecharse de manera preliminar teniendo en cuenta algunas alteraciones de la morfología eritrocitaria, aunque el diagnóstico se basa en estudios familiares y otros de carácter confirmatorio de la

enfermedad, como los estudios moleculares. Los profesionales de la salud que atienden a pacientes jóvenes con anemia deben considerar la posibilidad de una anemia hemolítica por trastornos de la membrana eritrocitaria.

Palabras clave: membranopatías; anemia hemolítica; métodos diagnósticos; esferocitosis; eliptocitosis; estomatocitosis

ABSTRACT

Introduction: Membranopathies are inherited hemolytic anemias due to qualitative abnormalities or quantitative deficiencies of red blood cell cytoskeletal proteins.

Objective: to update the diagnosis of membranopathies with the inclusion of the latest recommendations from the committee of expert groups at the national and international level.

Methods: A review of the literature in English and Spanish was carried out, through the PubMed website and the academic search engine Google, in articles published in the last five years.

Analysis and synthesis of information: The diseases of greatest clinical interest are: spherocytosis, elliptocytosis and hereditary stomatocytosis. These are generally inherited with an autosomal dominant character but there are forms that are transmitted recessively, without ruling out a possible de novo mutation. For its diagnosis, tests are used that include the study of red blood cell morphology, osmotic fragility, acidified glycerol lysis, hypertonic cryohemolysis, eosin-5'-maleimide binding test by flow cytometry, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and ectacytometry.

Conclusions: Membranopathies can be preliminarily suspected taking into account some alterations in erythrocyte morphology, although the diagnosis is based on family studies and others confirming the disease, such as molecular studies. Healthcare professionals caring for young patients with anemia should consider the possibility of hemolytic anemia due to red cell membrane disorders.

Keywords: membranopathies; hemolytic anemia; diagnostic methods; spherocytosis, elliptocytosis; stomatocytosis.

Recibido: 24/03/2021

Aceptado: 14/09/2021

Introducción

Las membranopatías son anemias hemolíticas hereditarias debido a trastornos cualitativos o cuantitativos de las proteínas del citoesqueleto de los glóbulos rojos (GR).

La membrana eritrocitaria mantiene la homeostasis celular a través de varios mecanismos, que incluyen retención de los componentes vitales, excreción de desechos metabólicos, regulación del metabolismo y del pH eritrocitario e importación del hierro para la síntesis de hemoglobina. El GR normal tiene forma de disco bicóncavo. En estas condiciones, la membrana no se encuentra tensionada, es altamente deformable y mantiene un estado de mínima energía, que proporciona una relación superficie/volumen máxima.⁽¹⁾

La membrana es el componente estructural responsable de las características mecánicas, del transporte iónico y de la diversidad antigénica del hematíe. Su estructura está formada por una capa lipídica y proteínas divididas en proteínas integrales (banda 3, complejo Rh) y estructurales o periféricas (α -espectrina, β -espectrina, anquirina, proteína 4.1 y 4.2). Esta estructura aporta al hematíe sus dos propiedades específicas: deformabilidad reversible y la permeabilidad que mantiene en el eritrocito un alto contenido en K^+ y bajo en Na^+ . Las alteraciones en los diferentes genes que codifican estas proteínas son la base etiológica de las anemias secundarias a membranopatías, que presentan típicamente un patrón hereditario autosómico dominante en la mayoría de los casos; sin embargo, pueden ocurrir formas “de novo” o recesivas.⁽²⁾

El presente trabajo pretende actualizar el diagnóstico de las membranopatías con la inclusión de las últimas recomendaciones del comité de grupos de expertos a nivel nacional e internacional.

Métodos

Se realizó una revisión de la literatura en inglés y español, a través del sitio web PubMed y el motor de búsqueda Google académico, de artículos publicados en los últimos cinco años. Se utilizaron como términos de búsqueda: membranopatías,

anemia hemolítica y métodos diagnósticos. Se hizo un análisis de la bibliografía revisadas teniendo en cuenta los aspectos más relevantes al tema.

Análisis y síntesis de la información

Clasificación y definición de las membranopatías

Las membranopatías obedecen a defectos estructurales o funcionales de las proteínas de la membrana eritrocitaria. Las de mayor interés clínico son: la esferocitosis hereditaria (EH), la eliptocitosis hereditaria (ElH) y la estomatocitosis hereditarias (EstH).⁽³⁾

Esferocitosis hereditaria

Los defectos en la espectrina, la anquirina, la banda de proteína 3 y la banda 4.2 debilitan la cohesión entre la bicapa lipídica de membrana y el citoesqueleto, lo que conduce a la liberación de microvesículas, pérdida de superficie y transformación del discocito en un esferocito.⁽⁴⁾ La EH es una de las causas más comunes de anemia hemolítica. Resulta de la deficiencia o disfunción de las proteínas de la membrana de los GR;⁽⁵⁾ estas llevan a la formación de hematíes de forma esférica, osmóticamente frágiles, que son selectivamente atrapados y destruidos en el bazo.⁽¹⁾ Se caracteriza por la triada: anemia, ictericia y esplenomegalia. Aunque la mayoría de los pacientes presenta anemia hemolítica compensada, la severidad clínica es variable: algunos pacientes son asintomáticos y otros presentan anemia hemolítica severa.^(6,7)

La clasificación tradicional se basa en los niveles de hemoglobina, bilirrubina, reticulocitos, contenido de espectrina y otros parámetros.

Otra clasificación reciente⁽⁸⁾ considera exclusivamente los niveles de hemoglobina.

- Leve (hemoglobina > 10 g/dL). En 20-30 % de los pacientes, la hemólisis está generalmente compensada por la producción eritrocitaria, la anemia es muy leve o inexistente. No presentan ictericia ni esplenomegalia, y solo en el 60 %, se observan esferocitos en cantidad significativa. Muchas veces, la enfermedad se hace evidente durante enfermedades virales, embarazo o ejercicio. Por lo general,

estas formas se diagnostican durante la realización de estudios familiares o por la aparición de esplenomegalia o litiasis biliar.

- Moderada (hemoglobina entre 8-10 g/dL). Estos pacientes tienen recuentos reticulocitarios cercanos al 10 % y bilirrubinemia de 2-3 mg/dL. Se ve tanto en formas dominantes como en recesivas.
- Grave (hemoglobina <8 g/dL). La anemia es grave y puede implicar compromiso para la vida, por lo que los pacientes son dependientes de la transfusión. La morfología eritrocitaria suele mostrar, además de los característicos esferocitos, esferocitos con contornos irregulares y/o poiquilocitos. Esta forma se ve principalmente en pacientes con herencia recesiva.

Portador sano: Se diagnostica sobre todo en padres de pacientes, en quienes no se puede demostrar una transmisión autosómica dominante. No presentan anemia, ictericia ni esplenomegalia, y no se observan esferocitos. La enfermedad se evidencia solo por ligera reticulocitosis, fragilidad osmótica ligeramente aumentada y auto hemólisis aumentada. A veces, la única alteración se detecta en el análisis de proteínas de membrana.⁽⁸⁾

El diagnóstico de EH se basa en antecedentes familiares positivos, hallazgos del examen físico, datos de laboratorio indicativos de hemólisis extravascular, visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica y prueba de Coombs directa negativa. Aunque en algunos pacientes, la confirmación diagnóstica puede ser más difícil, por lo que se recomiendan los estudios confirmatorios de la enfermedad, así como la evaluación de la bilirrubina sérica total, directa e indirecta.^(9,10,11)

El pronóstico general para los pacientes con EH es favorable. Sin embargo, puede variar dependiendo de la gravedad de la enfermedad.⁽¹²⁾ Otros estudios han demostrado que la gravedad clínica varía considerablemente incluso dentro de una sola familia, lo que refleja la heterogeneidad genética del trastorno.⁽¹³⁾

Eliptocitosis hereditaria (ElH)

La eliptocitosis hereditaria es un trastorno clínicamente más leve que la EH. En la ElH es característica la presencia de numerosos eliptocitos circulantes en sangre periférica. Al igual que la EH, la ElH obedece a un defecto de proteínas del esqueleto (principalmente Banda 4,1) que alteran la elasticidad de la membrana impidiendo su recuperación después de un alargamiento. No existe pérdida de membrana y por ello, la resistencia osmótica eritrocitaria y la concentración promedio de la hemoglobina contenida en los hematíes son normales.^(3,14)

La eliptocitosis hereditaria se debe a defectos en las conexiones horizontales de proteínas de la red esquelética de la membrana de los GR, incluida la interacción dímero-dímero de la espectrina o el complejo de unión espectrina-actina-proteína 4.1R. Los genes mutados en la ElH son, α -espectrina, β -espectrina o proteína 4.1R, (un déficit adquirido en 4.1R se reporta en los síndromes mielodisplásicos y en el diagnóstico de ElH en adultos, sin antecedentes de anemia hemolítica durante la infancia, se debe considerar esta posibilidad en el diagnóstico diferencial).⁽¹⁵⁾ También es importante destacar que otras afecciones hereditarias, como la anemia de células falciformes, las talasemias y la deficiencia de piruvato quinasa pueden tener como característica eliptocitos en la sangre periférica. La eliptocitosis adquirida a veces se observa en neoplasias mieloides, así como en la anemia por deficiencia de hierro, las anemias megaloblásticas, la policitemia y la mielofibrosis.⁽¹⁶⁾

La eliptocitosis hereditaria es una enfermedad hemolítica con presentaciones clínicas variables. La mayoría de los individuos afectados por esta enfermedad son asintomáticos mientras que algunos pacientes presentan anemia hemolítica con ictericia y esplenomegalia. Tiene una alta prevalencia en zonas endémicas de paludismo (1 - 2 % portadores en África Ecuatorial). El fenotipo y el genotipo son heterogéneos con herencia autosómica dominante, a excepción de la piropoiquilocitosis (PPH).⁽¹⁵⁾

Piropoiquilocitosis hereditaria

La piropoiquilocitosis hereditaria supone la expresión más severa de eliptocitosis hereditaria con una afectación bialélica de α espectrina y por tanto transmisión autosómica recesiva. Se presenta como una anemia hemolítica severa al nacer,

habitualmente en población africana. En estos casos el citoesqueleto de la membrana es tan inestable que la esplenectomía solo corrige parcialmente la hemólisis.^(17,18) El volumen corpuscular medio se encuentra disminuido (25 a 75 fL) debido a los glóbulos rojos fragmentados, la fragilidad osmótica suele ser normal y la prueba de unión a la eosina-5'-maleimida (EMA) muy positiva.⁽¹⁹⁾

El diagnóstico clínico de ELH y PPH se basa en la identificación de la morfología anormal del hematíe en el frotis de sangre periférica y en la identificación de las propiedades biomecánicas de la membrana mediante la ectacitometría de gradiente osmótico.⁽²⁰⁾

La piropoiquilocitosis generalmente se diagnostica en pacientes con antecedentes familiares de ELH, pero se presenta con mayor gravedad, esplenomegalia variable, con frecuencia con requerimientos transfusionales en la infancia o de manera rara con dependencia de transfusión a largo plazo.⁽²¹⁾

Ovalocitosis del sudeste asiático (OSA)

El primer informe de ovalocitosis del Sudeste Asiático se realizó hace más de cinco décadas en regiones endémicas de malaria de Papua Nueva Guinea y Laos. Sin embargo se ha descrito en otras poblaciones del sudeste asiático y en afroamericanos. La condición se hereda de manera dominante y los estudios genéticos generalmente muestran un patrón heterocigótico. No se ha encontrado homocigotidad para este defecto por lo que se plantea que sea letal in útero.

La lesión genética está relacionada con una mutación en la banda 3 que da como resultado la eliminación de ocho residuos de aminoácidos en la misma, lo que resulta un plegamiento incorrecto del primer dominio transmembrana. La mayoría de los pacientes presentan hemólisis mínima, aunque se describe la hiperbilirrubinemia neonatal. La morfología de los eritrocitos es típicamente oval acompañados algunas veces con estomas y bandas transversas.^(22,23) Los pacientes tendrán eliptocitos estomatocíticos, que son patognomónicos de OSA. Los estudios de ectacitometría muestran glóbulos rojos completamente indeformables o sin deformabilidad

perceptible a través de un amplio gradiente osmótico, lo que resulta en una curva característica casi plana.

La prueba de unión a la eosina-5'-maleimida (EMA), presenta una forma única, ya que la eliminación de 8 aminoácidos en el primer bucle de trans-membrana de la proteína AE1 hace que la lisina 430 sea inaccesible para la unión con EMA, el contenido de la banda 3 en sí no disminuye. Esto indica que la EMA se puede usar como método de detección de OSA, aunque la ectacitometría es más específica.⁽²³⁾

Estomatocitosis hereditaria (EstH)

Este raro trastorno de glóbulos rojos se divide en dos entidades diferentes: la xerocitosis o la estomatocitosis hereditaria deshidratada (EstHD) y la estomatocitosis hereditaria hiperhidratada (EstHH).⁽¹⁵⁾

Estomatocitosis deshidratada (xerocitosis).

El trastorno primario se debe a un incremento de permeabilidad que favorece la salida del K⁺, disminuyendo el contenido neto de cationes y consecuentemente de agua en el interior del hematíe. La xerocitosis se hereda de forma autosómica dominante y se manifiesta como una hemólisis crónica que puede ser severa incluso en periodo perinatal. Se considera un síndrome pleiotrópico porque además de la morfología anormal y la hemólisis crónica puede acompañarse de hiperpotasemia familiar.⁽²⁴⁾

Se pueden utilizar pruebas especializadas para documentar el contenido reducido de potasio en los glóbulos rojos y el contenido total de cationes monovalentes. La ectacitometría de gradiente osmótico es la prueba de diagnóstico ya que el perfil se desplaza a la izquierda hacia osmolalidades más bajas en el brazo hipertónico del perfil de deformabilidad.⁽²⁵⁾

Estomatocitosis hiperhidratada

El trastorno primario es un aumento de permeabilidad a la entrada del Na⁺. La forma clásica es muy infrecuente se han publicado no más de 20 casos. Se hereda de forma autosómica dominante y se comporta como una anemia moderada o severa con marcada macrocitosis y frecuente presencia de estomatocitos de un 40 - 60%. En la

estomatocitosis hiperhidratada no se han encontrado alteraciones genéticas responsables, aunque se ha observado variantes en el gen RHAG, que codifica a la glicoproteína asociada al Rh.⁽²⁴⁾

Las mutaciones en la Banda 3 se asocian con estomatocitosis hereditaria (EstH). La Banda 3 mutante se expresa aunque no tiene actividad de intercambio aniónico pero induce una fuga de cationes conductora en los glóbulos rojos afectados. La fuga está bloqueada por inhibidores clásicos del transporte de aniones, lo que sugiere que la banda 3 mutada proporciona un paso transmembrana para los cationes.⁽²⁶⁾

La hidratación celular se refleja en el aumento del volumen celular medio y la disminución de la hemoglobina corpuscular media (HCM). Como consecuencia, los glóbulos rojos son osmóticamente frágiles. Se pueden utilizar pruebas especializadas para documentar el aumento del contenido de sodio en los glóbulos rojos y el contenido total de cationes monovalentes. La ectacitometría de gradiente osmótico se utiliza como diagnóstico ya que el perfil se desplaza a la derecha hacia osmolalidades más altas en el brazo hipertónico del perfil de deformabilidad.⁽²⁵⁾

Diagnóstico diferencial

Las anemias hemolíticas (AH) causadas por defectos de la membrana de los glóbulos rojos a menudo pueden diagnosticarse erróneamente. La AH autoinmune y la EH presentan síntomas similares y muestran la presencia de esferocitos en el frotis de sangre periférica (SP), por lo que es necesario un diagnóstico diferencial, como la prueba de Coombs para distinguir entre estas afecciones.⁽²⁷⁾

Otras enfermedades en las que se puede encontrar con la presencia de esferocitos en el frotis de SP son la disfunción hepática,⁽²⁸⁾ lesión térmica, anemias hemolíticas micro y macroangiopáticas, reacción a la transfusión con hemólisis, hipofosfatemia severa, incompatibilidad ABO. Además, los defectos de la membrana pueden diagnosticarse erróneamente con defectos enzimáticos, en particular con deficiencias de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y piruvato quinasa (PK). En los casos en los que se sospeche deficiencia de enzimas de glóbulos rojos, el diagnóstico debe confirmarse realizando los ensayos de enzimas de glóbulos rojos más comunes y analizando la

herencia de la enfermedad ligada al cromosoma X para la deficiencia de G6PD y autosómica recesiva para el defecto PK.⁽²⁶⁾ El diagnóstico de estomatocitosis hereditaria requiere pruebas funcionales de permeabilidad catiónica.⁽²⁹⁾

Métodos de diagnóstico

El diagnóstico se basa en la historia clínica y familiar, la exploración física y los hallazgos de las pruebas de laboratorio. Éstas incluyen la morfología de los glóbulos rojos, la prueba de fragilidad osmótica, la prueba de lisis de glicerol acidificado, la prueba de criohemólisis hipertónica, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, citometría de flujo (la fragilidad osmótica de citometría de flujo y la prueba de unión a la eosina-5'-maleimida), y la ectacitometría. Las pruebas de genética molecular podrían usarse para confirmar el diagnóstico.

Fragilidad osmótica (FO)

El método más tradicional para el diagnóstico de la esferocitosis hereditaria (EH) es la prueba de fragilidad osmótica (FO). Esta prueba evalúa el nivel de hemólisis cuando el glóbulo rojo se expone a diferentes soluciones hipotónicas de cloruro de sodio (NaCl). Los esferocitos tienen menos resistencia a la lisis en cada concentración de NaCl que los eritrocitos normales. Esta prueba es laboriosa y requiere mucho tiempo para realizarla, presenta una sensibilidad y especificidad bajas. No detecta los casos atípicos y leves de EH y se ve afectado por factores no relacionados con los defectos de la membrana de los glóbulos rojos. Además, esta prueba no diferencia la EH de la esferocitosis asociada con otras afecciones, como las anemias hemolíticas autoinmunes o la anemia hemolítica aloinmune por incompatibilidad ABO en neonatos.^(30,31) De manera similar en el recién nacido esta prueba puede dar falsos resultados debido a las altas concentraciones de hemoglobina fetal (HbF), ya que la HbF le proporciona mayor resistencia a los glóbulos rojos.

La prueba también puede producir resultados normales en la presencia de deficiencia de hierro, ictericia obstructiva y durante la fase de recuperación de una crisis aplásica, afectada por un recuento elevado de reticulocitos. Lo ideal es utilizar sangre fresca e incubar la muestra. La incubación previa de toda la muestra de sangre durante

24 horas a 37 °C mejora el grado de lisis celular. En muchos casos, los resultados positivos se obtienen solo después de la incubación.⁽³¹⁾

Lisis en glicerol acidificado (LGA)

La prueba de lisis de glicerol acidificado es otro método para confirmar la fragilidad osmótica aumentada, consiste en que los glóbulos rojos se transfieren a solución salina tamponada con fosfato a un pH de 6.85 (el pH es crucial para el rendimiento adecuado de la prueba) y se colocan en la cubeta del espectrofotómetro. Luego, se agrega una solución de glicerol 0.3 M a la muestra de glóbulos rojos y la disminución de la turbidez de la muestra se mide con el tiempo. El valor normal de referencia es mayor de 1800 segundos; para el diagnóstico de la EH se requiere un rango de 25 - 240 segundos en los pacientes más severos, se han encontrado valores superiores cuando la enfermedad se encuentra en estado de leve a moderada. Esta técnica se debe realizar siempre con un control que tenga la resistencia osmótica normal. A pesar de la sensibilidad satisfactoria, la prueba de lisis en glicerol acidificado tiene una especificidad limitada y consume mucho tiempo.⁽²⁸⁾

Crioheólisis hipertónica (CH)

Evalúa la hemólisis de los eritrocitos suspendidos en un medio hipertónico, a los que se somete a un brusco cambio de temperatura. En estas condiciones, los esferocitos son más susceptibles a la hemólisis que los eritrocitos normales. La prueba no depende de la relación superficie/volumen, sino de la integridad de las proteínas de membrana, que repercute notablemente en su plasticidad. Esta prueba presenta la ventaja de dar como resultados normales cuando la presencia de esferocitos se relaciona con anemia hemolítica autoinmune.⁽¹⁾ Sin embargo, la utilidad de la CH es discutible, ya que las sensibilidades y especificidades obtenidas en varios estudios difieren significativamente, lo que hace que este ensayo sea poco confiable.⁽²⁸⁾

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Consiste en fraccionar las proteínas de la membrana eritrocitaria por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y cuantificarlas por densitometría, lo que permite certificar la disminución de una o más de las proteínas. Es una técnica muy laboriosa

que arroja resultados positivos en poco más del 70 % de los pacientes. Por lo tanto, su realización queda restringida a aquellos casos con fuerte presunción diagnóstica que no han podido ser confirmados mediante las pruebas habituales. Estudios recientes sugieren que la cuantificación relativa de las proteínas podría ser de utilidad como valor predictivo de la evolución de la enfermedad.⁽¹⁾

Esta técnica también está disponible solo en centros de diagnóstico altamente especializados, mientras que la disponibilidad de la prueba EMA o la evaluación de fragilidad osmótica están mucho más extendidas. Para mejorar la precisión de la cuantificación de la proteína de la membrana plasmática, el método electroforético se adaptó a la electroforesis capilar (electroforesis en gel capilar de dodecilsulfato de sodio, SDS-CGE). Desafortunadamente, SDS-CGE muestra un menor grado de resolución que SDS-PAGE. Por lo tanto, a pesar de consumir menos tiempo, es probable que no encuentre una gran utilidad para este propósito.⁽²⁸⁾

Citometría de flujo

Hay dos tipos de pruebas que utilizan citometría de flujo: la fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo (FOE-CF) y la prueba de unión a la eosina-5'-maleimida (5'EMA-CF).⁽³⁰⁾

El resultado del test se expresa en unidades de fluorescencia. La prueba FOE-CF se basa en la susceptibilidad o resistencia de los glóbulos rojos a la lisis cuando se exponen al agua desionizada (AD). Un glóbulo rojo suspendido en solución salina isotónica normal se somete a hemólisis cuando se expone al AD, un agente inductor de hemólisis. Luego, el conteo de glóbulos rojos se mide secuencialmente por la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) en tiempo real antes y después del aumento de agua desionizada. Las ventajas de la prueba son las siguientes: ahorro de tiempo y mano de obra, rentabilidad sin necesidad de pre-incubación de muestras de sangre y una alta tasa de eficiencia de la prueba. El método de diagnóstico puede lograr hasta un 85,7% de sensibilidad y un 97,2% de especificidad.

La prueba FOE-CF se puede utilizar para indicar la gravedad clínica en pacientes con EH ya que esta se refleja en los resultados de laboratorio y se asocia con el grado de

hemólisis, hemoglobina y concentración de bilirrubina sérica, así como los recuentos de reticulocitos y esferocitos.⁽³¹⁾

Entre las pruebas de detección descritas para EH, el ensayo de unión de eosina-5'-maleimida (EMA) es el más específico. Esta prueba de citometría de flujo con colorante EMA fluorescente permite la detección de eritrocitos con deficiencia de membrana plasmática con alta sensibilidad y especificidad (\downarrow fluorescencia) que sin embargo es normal en los esferocitos “adquiridos” de origen inmune. La eosina-5'-maleimida se une a la proteína de la banda 3, pero también a la glicoproteína asociada a CD47 y Rh. Su fluorescencia corresponde al contenido de proteínas de la membrana plasmática en la superficie de los GR. Al realizar la prueba EMA, se deben analizar 5 - 6 muestras de control sanas en paralelo para comparar la fluorescencia de EMA. Con respecto a los resultados, el diagnóstico de EH es altamente probable cuando los glóbulos rojos del paciente presentan aproximadamente 85 % o menos de fluorescencia que las muestras de control unidas a EMA. Todavía hay estudios en curso que intentan mejorar la utilidad de la prueba EMA. Es importante destacar que los resultados de esta prueba no se ven afectados por la esplenectomía.⁽²⁸⁾

La citometría de flujo es una prueba sensible, específica y económica en comparación con los métodos convencionales, que se puede usar como una prueba simple y práctica para la detección de EH.⁽³¹⁾

Ectacitometría

La ectacitometría es una técnica de referencia objetiva, es un difractor láser que mide el potencial de deformación de una población del eritrocito en un gradiente osmótico y permite la caracterización de muchas de las membranopatías más comunes. Los GR experimentan un cambio de forma de la configuración discoide a los eliptocitos a medida que atraviesan los capilares y los microporos en las sinusoides esplénicos. Este fenómeno in vivo se imita en la ectacitometría. Las células están expuestas a un gradiente osmótico creciente, y la deformabilidad celular (cambio de forma discoide a elíptica) se mide por la forma en que la luz se dispersa a medida que la célula responde a las fuerzas de corte. El resultado de esta prueba es un gráfico

característico, que muestra la cantidad de deformabilidad en el eje y, y la osmolalidad en el eje x.⁽²³⁾

La curva de ectacitometría resultante refleja las propiedades biomecánicas de los glóbulos rojos, incluida la fragilidad osmótica, la relación superficie-volumen, la flexibilidad del citoesqueleto y la viscosidad citoplasmática. La curva de ectacitometría en la ElH típica es trapezoidal con una menor deformabilidad del hematíe, mientras que en PPH se observa una mayor disminución de la deformabilidad.⁽²¹⁾

La ectacitometría se recomienda como el siguiente paso después de la electroforesis de hemoglobina en el diagnóstico de anemia hemolítica no inmune. Un perfil de ectacitometría anormal confirma un trastorno de la membrana de los glóbulos rojos y ayuda con el diagnóstico diferencial entre EH versus ElH / piropoiquilocitosis versus xerocitosis. Esto es particularmente importante en la xerocitosis donde la esplenectomía está contraindicada porque aumenta precipitadamente el riesgo de trombofilia potencialmente mortal.

La ectacitometría en un paciente con anemia hemolítica no dependiente de transfusiones puede evitar la necesidad de realizar un panel genético de anemia hemolítica hereditaria. También puede ayudar a enfocar el trabajo genético en un panel de membrana de GR si la ectacitometría es positiva o en un panel de enzimas de GR si la ectacitometría es negativa.⁽³²⁾

Existen diferencias muy notables y clave en la capacidad de diagnóstico de la prueba EMA y la ectacitometría. La prueba EMA proporciona una medición estática y cuantificable de la cantidad de proteína de la banda 3, mientras que la ectacitometría proporciona una prueba fluida, fisiológicamente simulada, que evalúa la deformabilidad de los GR de manera activa. Al interpretar la prueba EMA, se debe prestar atención no solo al valor de fluorescencia de canal medio, sino también a la pendiente de la curva a cada lado, que en conjunto reflejan la heterogeneidad del tamaño de la celda. Uno es una medida de deformabilidad bajo esfuerzo que miden función y el otro una estimación de una proteína estructural de membrana crítica.

La prueba de eosina-5-maleimida y la ectacitometría son complementarios y la información combinada puede conducir a un mejor diagnóstico de los trastornos de la membrana de los GR. En los trastornos del volumen de eritrocitos, las pruebas de EMA pueden ser normales, pero los cambios en la hidratación celular pueden sospecharse mejor con la ectacitometría.⁽²³⁾

Otras pruebas de confirmación

La secuenciación de múltiples genes que codifican proteínas de membrana de los hematíes es un método de diagnóstico factible y confiable para detectar mutaciones en pacientes afectados por diversos trastornos de la membrana eritrocitaria. En particular, las pruebas genéticas son importantes en niños pequeños con anemia congénita, pacientes dependientes de transfusiones y en familias con expresión clínica variable o patrones de herencia complejos.

Además, la prueba molecular sería un método eficaz para los recién nacidos o las personas transfundidas, ya que el resultado de la FO y los esferocitos en SP puede ser poco confiable, especialmente cuando los pacientes se transfunden. Se considera que la prueba molecular debe integrarse a los criterios de diagnóstico de las membranopatías⁽¹⁰⁾ ya que permite la identificación de la mutación dentro de los genes que codifican para las proteínas de la membrana plasmática.⁽²⁸⁾

En resumen, la fragilidad osmótica, la prueba de lisis de glicerol acidificado y la prueba de criohemólisis hipertónica se pueden utilizar como pruebas de laboratorio clínico de primera línea, aunque la sensibilidad de estas pruebas para el diagnóstico es baja. La medición basada en citometría de flujo de la fluorescencia media de los eritrocitos con el colorante eosina-5 'maleimida (EMA), es un método de elección para detectar la pérdida de superficie para el diagnóstico de EH, sin embargo, esta prueba basada en EMA no identifica algunos casos de EH asociados con defectos de anquirina y no es tan confiable para otros trastornos de la membrana de los GR. La ectacitometría de gradiente osmótico, llena este vacío, por tanto, se ha considerado una técnica de referencia y la prueba diagnóstica de todos los trastornos de la membrana eritrocitaria. Sin embargo, hasta ahora, el uso de la ectacitometría no ha

estado muy extendido en los laboratorios de hematología de rutina debido a la escasa disponibilidad del ectacitómetro, originalmente diseñado en los años setenta.

El ectacitómetro de nueva generación es la técnica de referencia para el diagnóstico de trastornos de la membrana de los eritrocitos, así como análisis moleculares y análisis diseñados específicamente para discriminar otras causas de anemia hemolítica.⁽³²⁾

Las membranopatías son en general fácilmente sospechables por la morfología eritrocitaria. Los trastornos de la membrana de los eritrocitos deben diagnosticarse después de realizar un panel de análisis complementarios que incluyan las pruebas de diagnóstico antes mencionadas y una discusión de los resultados por equipos multidisciplinarios.

La mayoría de los pacientes que padecen anemias hemolíticas hereditarias o congénitas por defectos en los componentes estructurales de la membrana de los eritrocitos, tienen antecedentes familiares positivos. Los profesionales de la salud, incluidos los médicos, que atienden a pacientes jóvenes con anemia deben considerar la posibilidad de una anemia hemolítica por membranopatía y remitirlos a un hematólogo para su diagnóstico. Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos para la detección y el diagnóstico de las membranopatías y estos aún están experimentando mejoras. Ninguna de las pruebas de detección puede identificar a todos los pacientes, porque los fenotipos clínicos son muy variables, desde pacientes asintomáticos hasta pacientes gravemente afectados. Con frecuencia se necesita más de una prueba. La sensibilidad y especificidad de las pruebas descritas varían según los distintos autores.

Las instrucciones futuras deben apuntar a confirmar los hallazgos presentados en los laboratorios y aplicarlos para investigar patologías con membrana eritrocitaria deteriorada.

Referencias bibliográficas

1. Donatoa H, Crispb RL, Rapettia MC, García E, Attief A. Esferocitosis hereditaria. Revisión. Parte I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico. Arch Argent Pediatr. 2015;113(1):69-80.
2. Del Orbe Barreto RA, García-Orad A, Arrizabalaga B. Implementación de la Next Generation Sequencing en el diagnóstico de las Anemias Hemolíticas Congénitas. (Tesis doctoral). España: Universidad del País Vasco; 2016.
3. Vives Corrons JL, Mañú Pereira M del M, Trujillo JP, Surrallés J, Sevilla J. Anemias raras y fallos medulares hereditarios. Arbor [Internet]. Sep 2018. [acceso 25/01/2021];194(789):a463. Disponible en: <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2276>
4. Zaninoni A, Fermo E, Vercellati C, Consonni D, Marcello AP, Zanella A, *et al.* Use of Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LoRRca MaxSis) in the Diagnosis of RBC Membrane Disorders, Enzyme Defects, and Congenital Dyserythropoietic Anemias: A Monocentric Study on 202 Patients. Front Physiol. 2018 Apr 27;9:451. DOI: <https://10.3389/fphys.2018.00451>
5. Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. Blood Res. Jun 2017;52(2):84-94. DOI: <https://10.5045/br.2017.52.2.84>
6. Flores Delgado C, Herrera FP. Esferocitosis hereditaria, con anemia hemolítica compensada. Reporte de caso. Rev Médica Carriónica. [Internet] 2017[acceso 25/01/2021];4(1):103-8. Disponible en: <http://cuerpomedico.hdosdemayo.gob.pe/index.php/revistamedicacarrionica/article/download/157/109>.
7. Manciu S, Matei E, Trandafir B. Hereditary Spherocytosis - Diagnosis, Surgical Treatment and Outcomes. A Literature Review. Chirurgia (Bucur). Mar-Apr 2017;112(2):110-6. DOI: <https://10.21614/chirurgia.112.2.110>
8. Donatoa H, Crisp RL, Rapettia MC, García E, Attief M. Esferocitosis hereditaria. Revisión. Parte II. Manifestaciones clínicas, evolución, complicaciones y tratamiento. Arch Argent Pediatr. 2015;113(2):168-76.
9. Deng Z, Liao L, Yang W, Lin F. Misdiagnosis of two cases of hereditary spherocytosis in a family and review of published reports. Clin Chim Acta. 2015 Feb;441:6-9. DOI: <https://10.1016/j.cca.2014.12.002>

10. Choi HS, Choi Q, Kim JA, Im KO, Park SN, Park Y, et al. Hereditary Hemolytic Anemia Working Party of the Korean Society of Hematology. Molecular diagnosis of hereditary spherocytosis by multi-gene target sequencing in Korea: matching with osmotic fragility test and presence of spherocyte. *Orphanet J Rare Dis.* May 23 2019;14(1):114. DOI: <https://10.1186/s13023-019-1070-0>
11. Crisp RL, García E, Solari L, Rapetti MC, Nesse A, Donato H. Esferocitosis hereditaria: experiencia clínica y diagnóstica en Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2017;51(3):307-18.
12. Zamora EA, Schaefer CA. Hereditary Spherocytosis. [acceso 20/07/2021];In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Sep 2021 - Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539797/>
13. Svidnicki M, Zanetta GK, Congrains-Castillo A, Costa FF, Saad STO. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations associated with hereditary anemias in Brazil. *Ann Hematol.* May 2020;99(5):955- 62. DOI: <https://10.1007/s00277-020-03986-8>
14. Charoenkwan P, Natesirinikul R, Choeprasert W, Kulsumritpon N, Sangiamporn O. Coinheritance of Hereditary Elliptocytosis and Deletional Hemoglobin H Disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* Mar 2017; 39(2):e69-e70. DOI: <https://10.1097/MPH.0000000000000750>
15. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Reviews.* 2013;27(4):167-78.
16. Kjelland JD, Dwyre DM, Jonas BA. Acquired Elliptocytosis as a Manifestation of Myelodysplastic Syndrome with Ring Sideroblasts and Multilineage Dysplasia. *Case Rep Hematol.* 2017;2017:3625946. DOI: <https://10.1155/2017/3625946>
17. Terry-Leonard N, Mendoza-Hernández C. Valor del frotis de sangre periférica como orientación diagnóstica en las anemias hemolíticas. *Medisur* [Internet]. 2019 [acceso 18/11/2020]; 17(5):[aprox. 12 p.] Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4407>
18. Chiappe G. Anemias hemolíticas. Revisión de algoritmos diagnósticos de anemias hemolíticas no autoinmunes en nuestro país. *Hematología.* Oct 2015 [acceso 18/12/2020];19(Número Extraordinario. XXII Congreso):20-4. Disponible en: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/05diagnostico-vol%2019-extra.pdf>.

19. Bayhan T, Ünal Ş, Gümrük F. Hereditary Elliptocytosis with Pyropoikilocytosis. Turk J Haematol. Mar 2016;33(1):86-7. DOI: <https://10.4274/tjh.2015.0054>
20. Niss O, Chonat S, Dagaonkar N, Almansoori MO, Kerr K, Rogers ZR, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. Blood Cells Mol Dis. 2016 Oct;61:4-9. DOI: <https://10.1016/j.bcmd.2016.07.003>
21. Naoum FA, Naoum PC. Coinheritance of beta-thalassemia minor and hereditary pyropoikilocytosis: case report. Hematol Transfus Cell Ther. Jan-Mar 2020;42(1):87-89. DOI: <https://10.1016/j.htct.2019.01.005>
22. Soler Noda G, Peña Leyva K, Forrellat Barrios M. Anemias hemolíticas hereditarias por defectos en la membrana de los eritrocitos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [Internet].2020 [acceso 25/01/2021];36(2):e1102. Disponible en: <http://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1098>
23. Zaidi AU, Buck S, Gadgeel M, Herrera-Martinez M, Mohan A, Johnson K, et al. Clinical Diagnosis of Red Cell Membrane Disorders: Comparison of Osmotic Gradient Ektacytometry and Eosin Maleimide (EMA) Fluorescence Test for Red Cell Band 3 (AE1, SLC4A1) Content for Clinical Diagnosis. Front Physiol. Jun 2020;11:636. DOI: <https://10.3389/fphys.2020.00636>
24. Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz Rastrollo AB, García-Orad A, Gonzalez Vallejo I, Bento C, et al. Hereditary xerocytosis, a misleading anemia. Ann Hematol. Sep 2016; 95(9):1545-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2716-9>
25. Mohandas N. Inherited hemolytic anemia: a possessive beginner's guide. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. Nov 2018;2018(1):377-81. DOI: <https://10.1182/asheducation-2018.1.377>
26. Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, Sansom MS, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. Biochim Biophys Acta. Jul 2016;1858(7 Pt A):1507-32. DOI: <https://10.1016/j.bbamem.2016.03.030>
27. Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. Haematologica. Nov 2016;101(11):1284-94. DOI: <https://10.3324/haematol.2016.142463>
28. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. Ann Transl Med. 2018 Sep;6(17):339. DOI: <https://10.21037/atm.2018.07.35>

29. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. International Council for Standardization in Haematology ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* Jun 2015;37(3):304-25. DOI: <https://10.1111/ijlh.12335>
30. Chari PS, Prasad S. Flow Cytometric Eosin-5'-Maleimide Test is a Sensitive Screen for Hereditary Spherocytosis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* Jul 2018;34(3):491-4. DOI: <https://10.1007/s12288-017-0907-8>
31. Farias MG. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med.* Jun 2017;55(7):944-8. DOI: <https://10.1515/cclm-2016-0738>
32. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, et al. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis.* Jan 2016;56(1):9-22. DOI: <https://10.1016/j.bcmed.2015.09.001>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

Contribuciones de los autores

Yadira Tamayo Rodríguez: Realizó aportaciones importantes a la concepción del artículo, redacción del borrador, diseño del trabajo y la revisión crítica de su contenido y la aprobación final de la versión que va a publicarse.

Olga Margarita Agramonte Llánes: Hizo aportaciones importantes en la redacción del borrador del artículo, revisión crítica de su contenido y aprobación final de la versión que va a publicarse.

Maydelin Miguel Morales: Realizó sugerencias para la creación del artículo, redacción del borrador. Aprobó la versión final presentada.