

Anormalidades de las proteínas de membrana de los eritrocitos en la esferocitosis hereditaria

José Domingo Torres · Medellín, Claudia Lucía Sossa · Bucaramanga,
Alvaro Camacho · Bogotá

Introducción: la esferocitosis hereditaria es un trastorno hereditario común caracterizado por anemia hemolítica de severidad variable, esferocitosis en el extendido de sangre periférica, incremento en la fragilidad osmótica del eritrocito y una respuesta clínica favorable a la esplenectomía.

La destrucción acelerada de los eritrocitos en la esferocitosis hereditaria se debe a la deficiencia heredada o a la disfunción de una de las proteínas de la membrana del eritrocito.

Objetivo: el objetivo de este estudio fue establecer las características clínicas y la distribución del tipo de proteína de membrana eritrocitaria deficiente en la población con esferocitosis hereditaria que asiste a la consulta de hematología del Hospital San Juan de Dios y el Hospital de La Misericordia de Bogotá.

Diseño y métodos: estudio descriptivo de corte transversal. Se estudiaron las características clínicas y de laboratorio de 29 pacientes afectados de esferocitosis hereditaria entre 1995 y 1997. Además se les practicó electroforesis de proteínas de membrana de eritrocitos en gel de poliacrilamida solubilizada en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE).

Resultados: encontramos que las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron anemia, ictericia y esplenomegalia, con un patrón de herencia familiar claramente definido. Desde el punto de vista del laboratorio se registra además de la anemia, la presencia de policromatofilia, reticulocitosis, microesferocitosis, hiperbilirrubinemia, prueba de Coombs negativa y curva de resistencia osmótica disminuida siendo los tipos I y II los más comunes. Al contrario de lo que se ha informado en la literatura, la deficiencia de banda 3 fue más frecuente que la deficiencia de espectrina.

Conclusión: nuestros datos confirman la variabilidad clínica de la esferocitosis hereditaria pero al contrario de lo informado en la literatura, hay una mayor frecuencia de deficiencia de la proteína banda 3. Estos datos deben ser confirmados por biología molecular (*Acta Med Colomb* 2001; 26: 158-162).

Palabras clave: esferocitosis hereditaria, proteínas de membrana, deficiencia de espectrina, deficiencia de proteína de banda 3.

Introducción

La esferocitosis hereditaria (EH) es una enfermedad hemolítica familiar que se manifiesta con anemia, ictericia intermitente, esplenomegalia y respuesta a la esplenectomía. Es la anemia hemolítica hereditaria más común entre los descendientes de europeos del norte, se produce por déficit en la síntesis de diversas proteínas que conforman la membrana del eritrocito (1-3).

Este trastorno es heterogéneo en términos de la severidad clínica, las bases moleculares y la herencia.

Alrededor de 75% de las familias afectadas exhiben un patrón autosómico dominante mientras que las restantes pueden tener formas autosómicas recesivas, formas

autosómicas dominantes con baja penetración o una mutación espontánea *de novo* (4).

Aunque los individuos afectados dentro de un grupo familiar en general experimentan un grado similar de hemólisis, los individuos pertenecientes a familias diferentes pueden presentar una gran heterogeneidad clínica.

El mismo fenotipo de EH puede ser producido por mutaciones en genes que codifican diferentes proteínas de mem-

Dr. José Domingo Torres Hernández: Profesor Asistente, Sección de Hematología, Universidad de Antioquia, Medellín; Dra. Claudia Lucía Sossa M.: Profesor Asociado de Hematología, Universidad Industrial de Santander. Miembro Centro de Cáncer, Clínica Carlos Ardila Lülle, Bucaramanga; Dr. Alvaro Camacho: Profesor Titular, Unidad de Hematología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

brana: α o β espectrina, anquirina, banda 3 o proteína 4.2 (5-12).

Las pocas descripciones de la caracterización bioquímica de las proteínas de membrana en la EH se refieren a poblaciones estadounidenses o europeas y hay una sola publicación latinoamericana en el Brasil.

En este informe presentamos las características clínicas, de laboratorio y los resultados de cuantificaciones densitométricas de las proteínas de membrana de los glóbulos rojos en pacientes con EH en Colombia.

Material y métodos

Entre julio de 1995 y enero de 1997 se evaluaron los pacientes con diagnóstico nuevo o en seguimiento de EH por los Servicios de Hematología del Hospital San Juan de Dios y del Hospital de La Misericordia. El diagnóstico fue realizado con base en las características clínicas, la presencia de esferocitos en el extendido de sangre periférica, una prueba de Coombs negativa y una prueba de resistencia osmótica disminuida (1, 2, 4).

Después de obtener el consentimiento de los pacientes o de sus padres, se recogieron 10 cc de sangre venosa por paciente, en tubos con citrato al 3.8% como anticoagulante. Los fantasmas de eritrocitos se prepararon el mismo día de la toma de la muestra: una fracción de la sangre se centrifugó a 1500 g y se lavó el pellet de glóbulos rojos con buffer salino de fosfato (PBS-PH 7.4) en tres ocasiones. Cien millones de hematíes se trataron con buffer de lisis (Tris-HCl 5mM PH 8, NaCl 7 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.1 mM) durante 10 minutos a 4°C. Las membranas se centrifugaron a 14.000g durante 10 minutos a 4°C y luego se lavaron tres veces con buffer de lisis. A las muestras se les adicionó buffer de Laemmli y se calentaron durante 3 minutos a 7°C, luego se almacenaron a -70°C hasta que se corrieron las electroforesis en SDS-PAGE en geles de gradiente de 33.5 a 17%. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie (13, 14).

La cantidad de espectrina más anquirina, banda 4.1 más banda 4.2, fueron expresadas como la relación con la banda 3 y fueron cuantificadas por densitometría de los geles teñidos a 540 nM (BIO-RAD model G700), el área bajo los picos fue determinada por el programa de computadora Molecular Analyst (BIO-RAD). Los resultados fueron basados en dos o más muestras del mismo paciente.

Se consideró portador asintomático al paciente con niveles de hemoglobina ≥ 14 g/dL con curva de resistencia osmótica disminuida; paciente con esferocitosis leve, aquél con hemoglobina ≥ 12 g/dL y curva de resistencia osmótica disminuida; con esferocitosis moderada cuando los niveles de hemoglobina estuvieron en el rango entre 7.1 y 11.9 g/dL, no dependiente de transfusión y con resistencia osmótica disminuida; con esferocitosis severa aquél con niveles de hemoglobina ≤ 7 g/dL, dependiente de transfusión y con resistencia osmótica disminuida.

Se consideró que la resistencia osmótica estaba disminuida cuando existía evidencia de hemolisis en concentraciones de solución salina ≥ 0.55 g/dL. Se clasificó de acuerdo con la curva de resistencia osmótica en tipo I si había desplazamiento de la curva hacia la derecha con hemolisis que inició en concentraciones de solución salina de 0.55 g/dL; curva de resistencia osmótica disminuida tipo II cuando hubo desplazamiento de la curva hacia la derecha con inicio de hemolisis en concentraciones de solución salina de 0.6 g/dL y curva de resistencia osmótica disminuida tipo III si había desplazamiento de la curva hacia la derecha con inicio de hemolisis en concentraciones de solución salina de 0.85 g/dL.

Con el fin de establecer los rangos normales de las concentraciones de las proteínas de membranas de los eritrocitos se estudió paralelamente un grupo de 30 individuos normales sanos a quienes se les efectuó electroforesis de proteínas de membrana de eritrocitos en SDS-PAGE. Este grupo de individuos normales tenía un cuadro hemático normal, bilirrubinas normales, prueba de Coombs negativa y fragilidad osmótica normal.

Se catalogó como déficit de espectrina más anquirina cuando la relación entre la banda electroforética correspondiente a espectrina más anquirina y la banda electroforética correspondiente a la banda 3 fue menor que la misma relación medida en los individuos normales. El diagnóstico de déficit de banda 4.1 más banda 4.2 fue hecho cuando la relación entre la banda electroforética correspondiente a banda 4.1 más banda 4.2 y la banda 3 fue menor que la misma relación medida en el grupo de individuos normales. El diagnóstico de déficit de banda 3 fue realizado cuando la relación entre la banda electroforética correspondiente a espectrina más anquirina y la banda 3 fue mayor que la misma relación en los individuos normales.

Análisis estadístico

Los datos fueron recolectados en los formularios diseñados para tal fin y fueron introducidos en una base de datos creada en Foxpro. Para el análisis de los resultados se contó con la ayuda de Epiinfo 6.03.

Se realizó una descripción de los pacientes con esferocitosis mediante análisis simple de proporciones y medidas de tendencia central según el tipo de variable por analizar. Luego se observó la relación entre diversas variables de interés en el grupo de pacientes, para lo cual se usaron pruebas de *t de student*, análisis de varianza (ANOVA), regresión lineal simple y prueba de chi cuadrado. El nivel de significancia usado fue de 0.05.

Se efectuó una comparación entre el grupo de pacientes con esferocitosis hereditaria y el grupo de individuos normales en cuanto a los índices de espectrina más anquirina y banda 3, banda 4.1 más banda 4.2 y banda 3, mediante pruebas de *t de student*; además se calculó un rango de normalidad para estos índices a través del grupo de individuos normales; este rango se usó para comparar la

variabilidad respecto a cada paciente con esferocitosis hereditaria .

Se aplicaron medianas y proporciones en los pacientes con esferocitosis hereditaria con relación a la biometría hemática, la resistencia osmótica disminuida y la relación de cada una de las proteínas ya mencionadas con respecto a la banda 3.

Resultados

Entre julio de 1995 y enero de 1997 se enrolaron en el estudio 29 pacientes con diagnóstico de EH.

El promedio de edad fue de 23 años con un rango de 1-79 años; 65.2% correspondió al sexo femenino y 34.8% al sexo masculino.

Características clínicas

Los antecedentes personales de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Cinco pacientes tenían al padre afectado con esferocitosis hereditaria, dos a la madre, ocho a un hijo, diez a varios familiares y 4 pacientes no tenían historia familiar.

Al examen físico, 60% de los pacientes exhibieron ictericia, 66% esplenomegalia entre los que no habían sido esplenectomizados, siendo el promedio del tamaño de la esplenomegalia de 3.5 cm por debajo de la reja costal izquierda con un rango entre 1 y 7 cm.

Hallazgos de laboratorio

Cuadro hemático. La Tabla 2 describe las características del hemograma entre los pacientes sin antecedentes de esplenectomía. Según la gravedad del cuadro clínico se clasificó en leve en 38% de pacientes, moderada en 50% y severa en 12% de los pacientes.

El promedio de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) estuvo en valores normales altos, el ancho de distribución eritrocitaria (ADE) fue superior a 14% en 83.3% de los pacientes.

Los valores de bilirrubina total en los pacientes sin antecedentes de esplenectomía se pudieron establecer en 12 pacientes con un promedio de 3.09 mg/dL (rango 1.5-5.6), 9 (75%) de los cuales tenían bilirrubinas mayores a 2 mg/dL.

En 20 pacientes sin esplenectomía se obtuvo información respecto a la prueba de resistencia osmótica eritrocitaria: curva de hemólisis tipo I en siete pacientes (35%), curva tipo II en cuatro pacientes (20%). El promedio de la concentración de solución salina hipotónica en la cual se inició la hemólisis fue 0.67 g/dL (rango: 0.56-0.85); la hemólisis de 50% se obtuvo de una concentración de 0.57 g/dL (rango: 0.47-0.82) y la hemólisis de 100% a una concentración de 0.37 g/dL (rango: 0.2-0.45).

Aunque a todos los pacientes se les practicó electroforesis de proteínas de membrana de glóbulo rojo corridas por triplicado, sólo a 18 se les pudieron cuantificar en forma adecuada las bandas de proteínas de membrana.

Tabla 1. Antecedentes personales de los pacientes con esferocitosis hereditaria

Antecedentes personales	Pacientes (%) (N= 29)
Ictericia neonatal	5 (17)
Ictericia	19 (65.5)
Anemia	18 (62.1)
Cólico biliar	2 (6.8)
Colecistectomía	2 (6.8)
Ulceras en las piernas	1 (3.4)
Transfusiones	11 (37.9)
Esplenectomía	7 (24.3)

Tabla 2. Características del cuadro hemático

Parámetro	Valor promedio	Rango
Hemoglobina	10.45 g/dL.	4.1-16.3
Hematocrito	30	14-32
VCM	83±9.9 fl/eritrocito	63-100
HCM	29.17pg/eritrocito	23.3-34.7
CHCM	35.15±1.6 gr/dL	32-40.1
ADE	24.07%	12.5-40.6
Leucocitos	8.926 x 10 ³ /µl	4.3-17
Neutrófilos	5.105 x 10 ³ /µl	2.064-11.560
Linfocitos	3.261 x 10 ³ /µl	1.118-7.124
Plaquetas	322 x 10 ³ /µl	140-840
Reticulocitos corregidos	7.5%	1-16
Esferocitos sangre periférica	25%	5-50%

VCM=volumen corpuscular medio
 HCM=hemoglobina corpuscular media
 CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media
 ADE= ancho de distribución eritrocitaria

A pesar de efectuarse varios ensayos a diferentes concentraciones de poliacrilamida y bisacrilamida no fue posible separar en una forma óptima la banda 2.1 que corresponde a la anquirina de la banda b espectrina, por lo tanto se tomó en conjunto el área de las espectrinas más la anquirina; lo mismo aconteció con las bandas 4.1 y 4.2.

Se obtuvieron los siguientes resultados, respecto a la proteína de membrana alterada: déficit de espectrina más anquirina: tres pacientes (16.7%); déficit de banda 3: nueve pacientes (50%); déficit de banda 4.1 más banda 4.2: ningún paciente; déficit combinado de espectrina más anquirina y banda 4.1 más 4.2: dos pacientes (11.11%); patrón electroforético normal: cuatro pacientes (22%).

Discusión

Las manifestaciones clínicas más comunes de la EH son la anemia, la ictericia y la esplenomegalia, cada una de las cuales estuvo presente en las dos terceras partes de nuestros pacientes. La esplenomegalia palpable se detectó en 66.7%, siendo en su gran mayoría leve a moderada con un promedio de 3.5 cm por debajo del reborde costal izquierdo. No se encontró relación entre la esplenomegalia y la severidad del cuadro clínico.

Si bien el antecedente de ictericia neonatal es referido en 30-50% de los casos, en nuestro estudio 22.7% de los

pacientes tuvieron este antecedente, aunque en muchos casos es desconocido este dato durante un interrogatorio a adultos. La ictericia neonatal puede ser de tal magnitud como para requerir exanguinotransfusión, fototerapia o ambas tal como sucedió en cinco de nuestros pacientes.

Al igual de lo que se describe en la literatura, la edad de los pacientes con EH en el momento de la primera consulta es muy variable; en nuestra serie el rango de edad osciló entre los extremos de la vida (rango 1-79 años).

Llama la atención el predominio del sexo femenino (65.2%) aunque consideramos que este hallazgo es incidental puesto que se sabe que la herencia es autosómica y no ligada al sexo y no existen factores hormonales referidos que influyan en su expresión.

Debido a que no era un objetivo principal del trabajo la detección de coleditiasis, no se utilizaron métodos diagnósticos sensibles como la ecografía a todos los pacientes para determinar su presencia. Por lo tanto la incidencia de coleditiasis (6.8%) en esta serie es baja comparada con las referidas de 43% en los niños y hasta de 85% en los adultos.

La presencia de úlceras crónicas en miembros inferiores es inusual y sólo un paciente refirió este antecedente que mejoró después de la esplenectomía.

En algunas regiones del mundo la EH es la anemia hemolítica hereditaria más común. En general se detecta en varias generaciones de familias afectadas, su patrón de herencia más frecuente es autosómico dominante y con menor frecuencia autosómico recesivo pero hasta en 25% de los casos no hay antecedentes familiares atribuyéndose a mutaciones espontáneas *de novo* o a penetración incompleta de los genes anormales. En nuestra serie, 93% de los pacientes tenían antecedentes familiares de EH; este porcentaje es tan alto debido a un sesgo en la selección de los pacientes ya que se efectuó una búsqueda dirigida de casos entre los familiares y aquéllos con EH fueron a su vez incluidos en el estudio como pacientes.

Respecto a la severidad de la enfermedad según el grado de anemia, la gran mayoría de nuestros pacientes exhibieron formas leves o moderadas. Los pacientes con cuadros de EH severa presentaron con mayor frecuencia antecedentes transfusionales, ictericia neonatal o aun antecedentes de ictericia intermitente durante un período diferente al neonatal.

La CHCM se encontró aumentada en promedio con valores tan altos como 40.1 g/dL, lo que refleja deshidratación intracelular. El volumen corpuscular medio (VCM) promedio estuvo cerca del límite inferior del rango normal (83.9 fl), con valores que oscilan entre 63 y 100 fl, sugiriendo otros factores adicionales como deficiencia de hierro o folatos, o simplemente reflejando la variación en el recuento de reticulocitos. El ADE alto de nuestros pacientes refleja la prominente anisocitosis con reticulocitos y microesferocitos. El promedio de esferocitos en el extendido de sangre periférica entre los pacientes no esplenectomizados fue de 25% fluctuando entre 5 y 50%. Si bien la morfología de los glóbulos

rojos (esferocitos) es distintiva y orienta al diagnóstico, no es exclusiva de esta enfermedad. También pueden observarse en la anemia hemolítica autoinmune, el déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, los síndromes de fragmentación eritrocitaria y la lesión térmica o química de los eritrocitos (4).

El valor promedio de la hemoglobina fue normal así como los índices eritrocitarios en el grupo de pacientes a quienes se les había efectuado esplenectomía (datos no mostrados).

Las curvas tipo I y tipo II fueron las curvas de resistencia osmótica que con mayor frecuencia se encontraron. No hubo relación entre el tipo de curva y el grado de severidad de la EH. La curva tipo III se asoció con un mayor porcentaje de esferocitos y la curva tipo I con un menor porcentaje.

Se ha postulado que la EH puede ser dividida en dos grupos principales: deficiencia de espectrina aislada o combinada con anquirina y deficiencia de banda 3, ya que la deficiencia del área de superficie del eritrocito podría ser consecuencia de vías moleculares distintas en cada uno de los dos grupos (9, 10).

En nuestros pacientes encontramos que el grupo con déficit de banda 3 fue el más frecuente (50%) y el grupo con déficit de espectrina sola o combinada constituyó 27.8%; 22.2% no mostraron alteración en el patrón electroforético. Llama la atención la alta frecuencia de pacientes con déficit de banda 3, contrario a lo informado en otras series como la de Boston, publicada por Palek y Jarolim, en 47 pacientes estudiados, donde hallaron más frecuentemente el déficit de espectrina sola o combinada con anquirina (61% de los casos), el déficit de banda 3 en 22% y no encontraron anomalía detectable en la electroforesis de proteínas de membrana del glóbulo rojo en 12% de los pacientes (15).

En la serie brasileña realizada en 36 pacientes con diagnóstico de EH, informada por Saad y colaboradores (16), se detectó deficiencia de espectrina sola o combinada con anquirina en 52% de los pacientes, deficiencia de banda 3 en 13% y patrón electroforético normal en 30% de los casos (16).

Nuestros hallazgos acerca del déficit de la banda 3 como la proteína de membrana más frecuentemente alterada en pacientes con EH, constituyen el primer informe conocido en nuestro medio.

Merece resaltarse que el déficit de banda 4.1 y banda 4.2 es escaso: fue informado por los norteamericanos en 3% de los casos y estuvo ausente entre los brasileños. Nosotros encontramos 11% de los pacientes con esta alteración pero asociada con déficit de espectrina y anquirina. Se han encontrado deficiencias combinadas de las diferentes proteínas de membrana además de la ya conocida deficiencia combinada de espectrina y anquirina, como el déficit combinado de banda 3 y banda 4.2 y el déficit combinado de espectrina y banda 4.1. Muchas veces no se determina cuál es la proteína deficiente requiriendo para tal fin estudios moleculares del gen de la proteína afectada.

La estimación densitométrica del contenido de espectrina mediante la medición de la relación de los picos de espectrina y banda 3, aunque muy útil en el tamizaje inicial, es probablemente insensible para detectar deficiencias leves de espectrina. Más aun, la pérdida de lípidos de la membrana del eritrocito en los pacientes está acompañada de pérdida de la proteína banda 3, en particular en los pacientes que no han sido esplenectomizados, llevando a una falsa normalización de la relación espectrina / banda 3. Este fue quizás el caso en uno de nuestros pacientes con patrón electroforético normal antes de la esplenectomía y en quien sí se detectó el déficit de espectrina más anquirina después de la esplenectomía.

Cuando se comparan los resultados de la electroforesis de proteínas de membrana en gel con el radioinmunoensayo se encuentra que el primer método puede sobreestimar el contenido de espectrina, o subestimar el contenido de anquirina. Por lo tanto es conveniente complementar ambos métodos para una adecuada cuantificación de las proteínas de membrana del eritrocito.

Las alteraciones cualitativas en las proteínas de membrana del glóbulo rojo, sin que exista un déficit cuantitativo, pueden constituir otra de las explicaciones del patrón de electroforesis normal que se ha encontrado en las diferentes series citadas incluida la nuestra. En estas situaciones son necesarios estudios de biología molecular.

En conclusión, en este estudio de pacientes con EH encontramos que la anemia, la ictericia y la esplenomegalia son las características clínicas más frecuentes, con un patrón de herencia familiar claramente definido. Desde el punto de vista del laboratorio se registra además de la anemia la presencia de policromatofilia, reticulocitosis, microesferocitosis, hiperbilirrubinemia, prueba de Coombs negativa y curva de resistencia osmótica disminuida siendo los tipos I y II los más frecuentes. Al contrario de lo que se ha informado en la literatura, la deficiencia de banda 3 fue más frecuente que la deficiencia de espectrina, hallazgo que debe confirmarse con técnicas de biología molecular.

Agradecimientos

Lic. Viviana Marin (Bióloga), Luis Eduardo Caminos (Bioquímico) y Dr. Manuel Elkin Patarroyo - Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios.

Lic. Giovanni Rodríguez (Biólogo), Dr. Héctor Posso (Médico Epidemiólogo) y Dr. Oscar Orozco - Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Alberto Martínez - Hospital La Misericordia

Summary

Introduction: hereditary spherocytosis is a common hereditary disorder characterized by hemolytic anemia of varying severity, spherocytosis on the blood smear, increased red cell osmotic fragility, and an adequate response to splenectomy. The accelerated red cell destruction is a the result of an inherited deficiency or dysfunction of one of the proteins of the erythrocyte membrane.

Objective: to establish the clinical features and the electrophoretical types of deficiency of the proteins of the

erythrocyte membrane in Colombian patients with hereditary spherocytosis.

Design and methods: this was a descriptive and transverse study. Clinical records were available from 29 patients diagnosed between 1995 and 1997. Signs, symptoms and laboratory features were analyzed. An additional polyacrylamide gel electrophoresis of sodium dodecyl sulfate solubilized red cell membrane proteins (SDS-PAGE) was done.

Results: the most frequent clinical features were anemia, jaundice and splenomegaly, with a well defined hereditary pattern. From the point of view of laboratory there is anemia, polychromasia, increased reticulocyte count, spherocytes on blood film, increased unconjugated bilirubin, direct antiglobulin test (Coombs) negative and osmotic fragility curve increased with type I and II the most common. In contrast with literature reports, partial deficiency of band 3 protein was more frequent than spectrin deficiency.

Conclusion: the Colombian data confirm the variable severity of hereditary spherocytosis but in contrast with literature, there is increased frequency of deficiency of band 3 protein. This data must be confirmed by molecular biology.

Key words: hereditary spherocytosis, membrane proteins, spectrin deficiency, band 3 protein deficiency.

Referencias

1. Palek J, Jarolim P. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis and related disorders. In: Beutler E, Lichtman M, Coller B, et al, eds. Williams Hematology. New York: Mc Graw Hill; 1995: 536-557.
2. Lukens SN. Hereditary spherocytosis and others hemolytic anemias associated with abnormalities of the red cell membrane and cytoskeleton. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, et al, eds. Wintrobe Clinical Hematology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993: 840-861.
3. Palek J, Jarolim P. The red cell membrane. In: Beutler E, Lichtman M, Coller B, et al, eds Williams Hematology. New York: Mc Graw Hill; 1995: 406-417.
4. Sáenz G. Cuadros de esferocitosis: síndromes y aspectos diagnósticos. *Sangre* 1993; **28**: 330-340.
5. Gallagher PG, Forget BG. Spectrin genes in health and disease. *Seminars in Hematology* 1993; **30**: 4-21.
6. Bass EB. Further evidence for location of the spherocytosis gene on chromosome 8. *Ann Intern Med* 1983; 192-196.
7. Coetzer TL. Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary spherocytosis. *N Engl J Med* 1988; **318**: 230-234.
8. Savides P, Shalev O, John K, et al. Combined spectrin and ankyrin deficiency is common in autosomal dominant hereditary spherocytosis. *Blood* 1993; **82**:2953-2960.
9. Agre P, Asimos A, Casella J, et al. Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. *N Engl J Med* 1986; **315**: 1579-1583.
10. Agre P. Deficient red cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med* 1982; 1135-1139.
11. Peters L. Ankirins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytosis. *Seminars in Hematology* 1993; **30**: 85-118.
12. Wolfe L. A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. *N Engl J Med* 1982: 1367-1370.
13. Dodge JT, Mitchell C, et al. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1963;**100**:119-130.
14. Dzandu K, Mercy E. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same Polyacrylamide gel using a double-staining technique. *Proc Natl Acad sci USA* 1984; **81**:1733-1737.
15. Palek J, Jarolim P. Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Seminars in Hematology* 1993: 249-256.
16. Saad S, Costa F, et al. Red cell membrane protein abnormalities in hereditary spherocytosis in Brazil. *Br J Haematol* 1994; **88**: 295-299.