

1991 - A

Reg. No. 083247223

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“ESTUDIO ELECTROFORÉTICO Y ESPECTROFOTOMÉTRICO  
DE LAS ESPECTRINAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO  
EN PACIENTES CON ESFEROCITOSIS HEREDITARIA”

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

MA. ESPERANZA GUTIERREZ CASTOLO

GUADALAJARA, JAL. ABRIL DE 1992



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección .....  
Expediente .....  
Número ..... 0641/91

C. SRITA. MA. ESPERANZA GUTIERREZ CASTOLO  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO ELECTROFORÉTICO Y ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LAS ESPECTRINAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO EN PACIENTES CON ESFEROCITOSIS HEREDITARIA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado -- como Directora de dicha tesis la M. en C. Bertha Ibarra Cortés.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara Jal., 22 de Agosto de 1991.

EL DIRECTOR

M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA

c.c.p.- La M. en C. Bertha Ibarra Cortés. Directora de Tesis.Pte.  
c.c.p.- El expediente del alumno

CBZ/MPTM/cg1r.\*



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE  
DIVISION DE GENETICA

Marzo 24, 1992.

M. en C. Carlos Beas Zárate  
Director de la Facultad de  
Ciencias Biológicas  
Universidad de Guadalajara  
P r e s e n t e .

En mi calidad de Director de la tesis "Estudio Electroforético y Espectrofotométrico de las Espectrinas de la Membrana del Eritrocito en Pacientes con Esferocitosis Hereditaria" que para optar el grado de Licenciado en Biología presentará el estudiante Ma. Esperanza Gutiérrez Castolo, manifiesto a usted mi conformidad para la impresión de la misma.

Atentamente,

M. en C. BERTHA IBARRA CORTES

Tesis para aspirar al Título de  
Licenciatura en Biología

T I T U L O

" ESTUDIO ELECTROFORÉTICO Y ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LAS  
ESPECTRINAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO EN  
PACIENTES CON ESFEROCITOSIS HEREDITARIA "

A U T O R

MA. ESPERANZA GUTIERREZ CASTOLO

D I R E C T O R:

M. en C. BERTHA IBARRA CORTES

DEDICATORIAS

A mis padres...

por darme la vida

A Juan Carlos...

gaviota

A Nora...

por su nobleza

**AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS HERMANOS:

Epigmenio, Eduardo, Rosario y Blanca: por brindarme su apoyo y fortaleza.

### A MIS AMIGOS:

Por darme su cariño siempre.

### A BERTHA IBARRA:

Por su paciencia y por haberme depositado su confianza.

### A JAVIER PEREA:

Por su enorme ayuda y amistad.

### A TODOS MIS COMPAÑEROS:

De la División, especialmente a MARU DE LA MORA, REBECA, ALMA, por que de una u otra forma todos me ayudaron a realizar una meta.

A todas las personas que me ofrecieron su amistad y apoyo durante mi formación.



I N D I C E

INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCION                         | 1  |
| II. ANTECEDENTES                        | 3  |
| 1. Definición e historia.               | 3  |
| 2. Características clínicas.            | 6  |
| 3. Prevalencia y morbilidad.            | 6  |
| 4. Estructura y membrana del eritrocito | 7  |
| 5. Organización                         | 16 |
| 6. Biogénesis                           | 17 |
| 7. Funciones                            | 17 |
| 8. Patofisiología                       | 18 |
| 9. Defensas de                          | 20 |
| III. Piel                               | 22 |
| IV. Vena                                | 25 |
| V. Vena                                 | 27 |
|   | 29 |
|   | 33 |
|   | 39 |
|   | 42 |
|   | 44 |

FE DE ERRATA  
LAS PAGINAS 5, 6, 7 ESTAN EN ESE ORDEN,  
PERO DEBE SER 7, 5, 6

**I N T R O D U C C I O N**

## I. INTRODUCCION

La anemia como enfermedad es un padecimiento incapacitante y en algunas ocasiones mortal. Se desarrolla por factores extrínsecos (anemias adquiridas) o intrínsecos (anemias hereditarias) que disminuyen la supervivencia de los eritrocitos.

Las anemias hemolíticas hereditarias son debidas a tres causas principales: 1) Alteraciones de la hemoglobina; 2) Defectos enzimáticos y 3) Alteraciones de la membrana del eritrocito. La clasificación actual de las anemias hereditarias por defecto de membrana se basa en la anormalidad morfológica del mismo: poiquilocitosis, eliptocitosis, acantocitosis y esferocitosis (1,2).

La Esferocitosis Hereditaria (EH) es una patología genética que se reconoce como una causa frecuente de anemias hemolíticas congénitas, se manifiesta en forma diversa desde el punto de vista clínico y bioquímico.

Desde el punto de vista bioquímico la EH puede originarse por alteraciones en las proteínas que forman el citoesqueleto de la membrana del eritrocito, en la que destaca la deficiencia de espectrina como causa principal (2,3).

Con el presente trabajo se pretende conocer el papel que juega la deficiencia de espectrina en el desarrollo de la enfermedad en la población de pacientes con EH captados en el Noroccidente de México, con el fin de contribuir en el conocimiento de esta entidad genética, ya que en nuestro país existe poca información acerca de este padecimiento.

**A N T E C E D E N T E S**

## II. ANTECEDENTES

### 1. DEFINICION E HISTORIA

La Esferocitosis Hereditaria (EH) es una enfermedad clínicamente heterogénea (2), que se caracteriza por anemia hemolítica de severidad variable, eritrocitos esféricos, incremento en la fragilidad osmótica (4), secuestro esplénico y respuesta favorable a la esplenectomía, con forma de herencia básicamente autosómica dominante (3).

La Esferocitosis Hereditaria (EH) fué morfológicamente descrita por primera vez hace más de 100 años por Vanlair y Masius. En este trabajo se predijeron correctamente dos factores principales de la patofisiología de la enfermedad: un acelerado envejecimiento de los eritrocitos (glóbulos atróficos), y su destrucción por el bazo. Veinte años después, la EH fué redescubierta por Wilson y Minkowsky quienes reportaron 8 casos en una familia con tres generaciones (3).

Posteriormente en esta patología se describió: Incremento en la fragilidad osmótica; corrección de la hemólisis con la esplenectomía y el papel del bazo en el desarrollo de la EH (5). Más tarde se encontró que las membranas de los eritrocitos de pacientes con EH presentan incremento en la permeabilidad al sodio, disminución de lípidos y pérdida del área de membrana, por lo que se sospechó de una anomalía del citoesqueleto, habiéndose identificado a la fecha distintos defectos moleculares de las proteínas que lo conforman (6). Fig. 1

DEFICIENCIA DE PROTEINAS DEL ESQUELETO O ALTERACION EN LA FUNCION

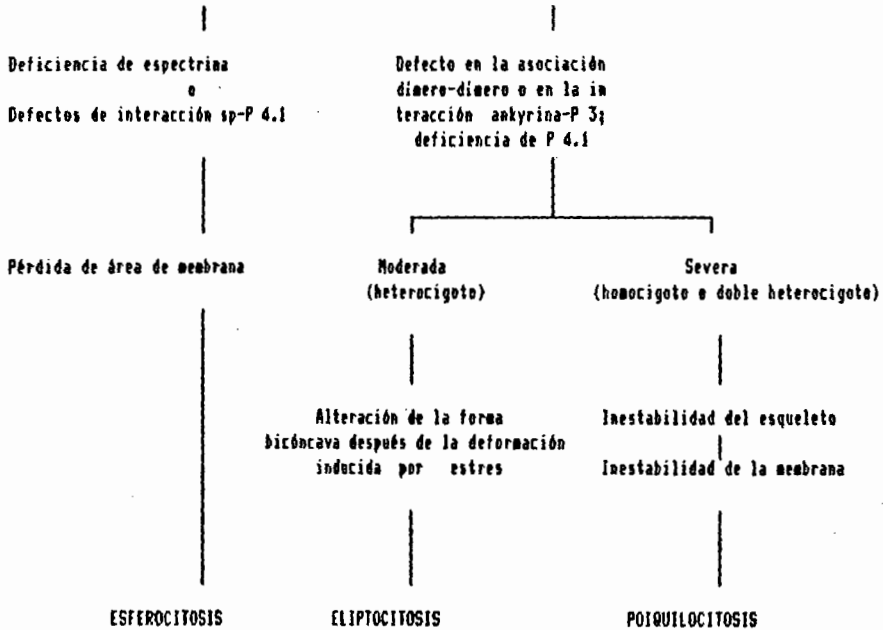


FIG. 1. ESQUEMA DE ALTERACIONES DE MEMBRANA QUE CONDUCE A ESFEROCITOSIS, ELIPTOCITOSIS Y POIQUILOCITOSIS.

La nomenclatura anterior es mundialmente aceptada, y fué hecha hecha en base a los estudios de separación electroforética realizados por Fairbanks y Cols. (9) Fig. 3

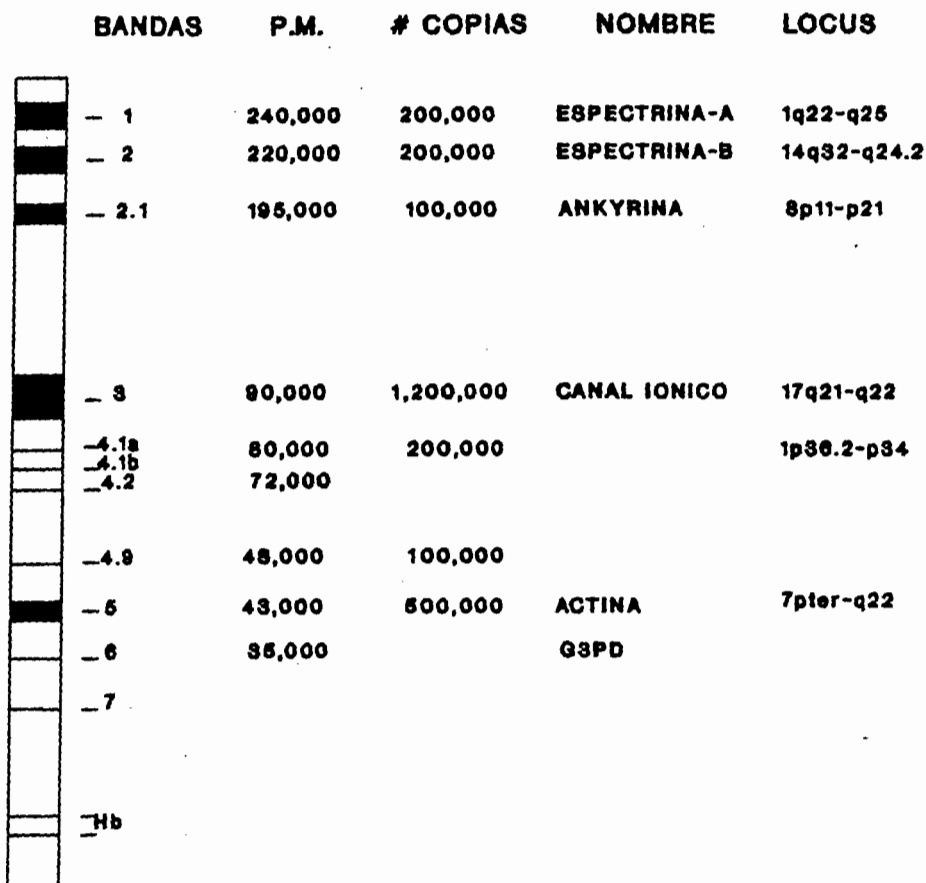


FIG. 3 ESQUEMA DE DISTRIBUCION DE LAS BANDAS DE LAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA EN GEL DE DSS/POLIACRILAMIDA



## 2. CARACTERISTICAS CLINICAS

Las características clínicas de la EH son palidez, ictericia y esplenomegalia. La enfermedad se presenta típicamente en la infancia; la mayoría de los pacientes desarrollan rápidamente hemólisis, anemia y esferocitos. En algunos casos es necesario transfundir en repetidas ocasiones.

La expresión clínica de la EH es altamente variable y va desde la condición asintomática hasta la forma severa de anemia hemolítica (5).

## 3. PREVALENCIA Y MODO DE HERENCIA

La EH se reconoce como una causa frecuente de anemias hemolíticas congénitas (6).

Existen reportes en la población occidental, donde la prevalencia de la enfermedad es de 0.02% (1:5,000); sin embargo, considerando los datos del estado de portador asintomático para el gen de la EH, y la alta frecuencia de individuos sanos con fragilidad osmótica incrementada (aprox. 1%), es posible que este dato esté subestimado (3,6).

La EH está presente en negros Sudafricanos y población japonesa, pero su prevalencia es desconocida (5).

Estudios recientes indican que aprox. el 75% de las familias muestran un patrón autosómico dominante, aunque se observan notables excepciones de EH con herencia recesiva y hemólisis severa.

El estado homocigoto para la forma típica dominante de EH parece ser letal (4).

#### 4. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO

Como en todas las células eucarióticas, la membrana del eritrocito está compuesta por lípidos y proteínas. Los lípidos dispuestos en forma de bicapa, son principalmente los fosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamida, fosfatidilserina y esfingomielina; colesterol y glucolípidos . (7).

Muchas de las proteínas de membrana están insertadas en la bicapa a modo de bloques de hielo flotantes, estas son llamadas proteínas ( P ) integrales y son la banda 3 o canal iónico y las glucoforinas. Otras más forman una red de fibras interconectadas, que constituyen el esqueleto de membrana, esencial para la forma y estabilidad del eritrocito, formado por las proteínas periféricas o extrínsecas: Espectrina ( P 1 y 2 ); ankyrina ( P 2.1 ); P 4.1 ; P 4.2 ; P 4.9 y actina ( P 5 ). (8) Fig. 2

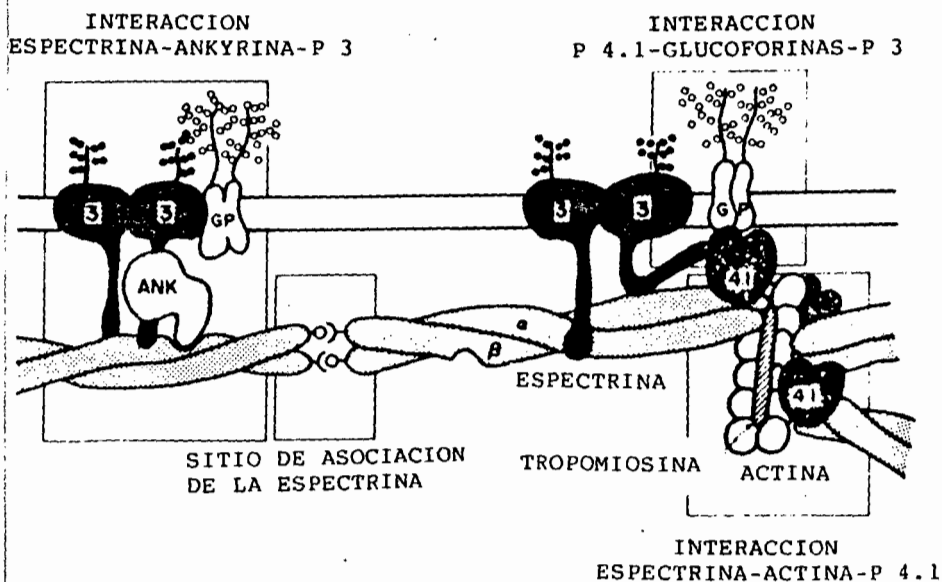


FIG. 2 MODELO DE ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO.

A continuación, se describen las proteínas de la membrana eritrocito:

#### ANKYRINA ( P 2.1 )

Participa en el anclaje del citoesqueleto a la membrana del eritrocito y juega un papel importante en sus funciones. Está localizada en la superficie del esqueleto y posee gran afinidad por los tetrámeros de la espectrina (5,6,8). Contiene dos dominios uno de 90 y otro de 72 Kd, este último, tiene una alta afinidad a la cadena  $\beta$  de la espectrina. La asociación de la ankyrina con la espectrina ha sido visualizada por microfotografía electrónica, la cual muestra que el sitio de unión ankyrina-espectrina se encuentra a 20 nm. de la cabeza del dímero de la espectrina. La fosforilación de este fragmento, anula la interacción preferencial de la ankyrina al tetrámero de la espectrina (8).

El fragmento de 90 Kd se une al dominio citoplasmático de la P 3 , permitiendo de esta manera la interacción entre la bicapa y el citoesqueleto.

#### PROTEINA 3 ( P 3 o Canal iónico )

Es una proteína transmembranal y la más abundante en la membrana del eritrocito en donde se encuentra como un tetrámero no covalente.

La proteína está dividida en dos dominios: el extremo carboxilo terminal de 52 Kd que forma el canal iónico y el dominio amino terminal de 43 Kd que contiene los sitios de unión para: P 4.1; P 4.2; Ankyrina; enzimas y hemoglobina.

La P 3 también puede interaccionar con Glucoforina A.

Por su alta afinidad a la ankyrina contribuye a la estabilidad mecánica del esqueleto de membrana y fortalece su unión a la bicapa de lípidos (5,10).

#### PROTEINA 4.1

Esta proteína constituye aprox. el 5 % del total de la masa del citoesqueleto. Cuando los estromas del eritrocito son sujetos a electroforesis en un sistema de geles continuos, la P 4.1 aparece como una sola banda; pero si se somete a un sistema de geles discontinuo migran dos bandas denominadas 4.1a y 4.1b. Ambas proteínas están fosforiladas y presentan secuencias similares. La molécula se polariza en un extremo ácido y otro básico; un fragmento central de 10 Kd contiene la región responsable de la unión espectrina-actina. Tiene dos funciones importantes: promover la unión espectrina-actina y unirse con la P 3, fosfatidilserina y glucoforina C y A (5,6).

#### PROTEINA 4.2

Esta proteína representa aprox. el 5% del total de las proteínas de membrana; se une a la ankyrina y a la P3; posiblemente su función es estabilizar la interacción entre las dos proteínas aunque este se ha cuestionado (5,11,12).

#### PROTEINA 4.9

Presenta una concentración equivalente a la de los tetrámeros de la espectrina. Se conoce poco acerca sus funciones pero puede estar involucrada en el mantenimiento de la estructura del esqueleto de membrana. El polipéptido 4.9 interactúa con filamentos de actina, lo que reduce su polimerización y estabiliza fragmentos cortos (8).

## ACTINA ( P 5 )

La actina del eritrocito es muy similar a otras actinas, en función y estructura. Está organizada en filamentos cortos de doble hélice denominados protofilamentos de 5 nm de diámetro que se estabilizan al interactuar con la espectrina y P 4.1 . Sin embargo, existen diferencias significativas entre las distintas actinas; por ejemplo la actina del eritrocito tiene la capacidad de activar la asociación de ATP-asa a la membrana, una cualidad que no está presente en la actina del músculo. El estado de polimerización de la actina es funcionalmente importante para el eritrocito.

La actina se une en un sitio cercano al extremo de la molécula de la espectrina; las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  contribuyen a esta unión. Otras proteínas asociadas con la actina son: P 4.9, Aducina y Tropomiosina (5.8).

## GLUCOFORINAS

La Glucoforina C es un miembro de una familia de sialoglucoproteínas junto con la Glucoforina A y B. Una asociación adicional del complejo del citoesqueleto con la membrana puede estar dada por una conexión entre espectrina y Glucoforina C o A, vía P 4.1. En el patrón de bandeo referido existe una región denominada PAS que por técnicas bioquímicas adicionales ha sido nombrada como PAS1, PAS2 y PAS3. La región de PAS1 incluye los monómeros de Glucoforina B (P.M 47 Kd), Glucoforina A (P.M 38 Kd) y Glucoforina C, también llamada Gluconectina (P.M 35 Kd); la región PAS2 contiene el monómero de la Glucoforina A y PAS3 el monómero de Glucoforina B (7).

### ADUCINA

Esta proteína es un heterodímero que contiene la subunidad  $\alpha$  de 103 Kd y  $\beta$  de 97 Kd. Existe una copia por protofilamento de actina. La aducina une la actina y la espectrina. La unión de la aducina al esqueleto es inhibida por la prot. 4.1 lo que sugiere que las dos proteínas pueden competir por los mismos sitios de unión. La aducina no interactúa directamente con la espectrina en ausencia de actina. Está fosforilada y es la proteína principal unida a la calmodulina del esqueleto (6).

### TROPOMIOSINA

Está compuesta de dos polipéptidos de 29 y 27 Kd.

Presenta propiedades de asociación con la actina, particularmente con su protofilamento, constituido por 12 monómeros. Existe en el eritrocito una copia por cada 6 monómeros de actina por lo que se requieren dos tropomiosinas por protofilamento de actina (6).

### ESPECTRINA

Es el componente más abundante y esencial del esqueleto de membrana; constituye aprox. el 25% del total de las proteínas de la membrana del eritrocito y cerca del 75% de la masa del citoesqueleto. Está formada por dos cadenas similares, la subunidad  $\alpha$  de 240 Kd (Banda 1) y la subunidad  $\beta$  de 220 Kd (Banda 2).

Por estudios de microscopía electrónica sabemos que se asocian entre sí formando un dímero y posteriormente un tetramero. Se argumenta que el tetramero es la forma predominante en la membrana (5,8).

Las cadenas se asocian de modo lineal para formar el dímero y en un arreglo antiparalelo, esto es, cabeza con cabeza, respecto a sus grupos amino terminal y carboxilo terminal para formar el tetrámero (5).

La proteína es altamente flexible y asume una variedad de conformaciones, propiedad crítica en la deformabilidad de la membrana.

#### A) Ultraestructura de la espectrina

El modelo de la molécula de la espectrina basado en estudios biofísicos sugiere la presencia de regiones globulares rígidas conteniendo enlaces iónicos y una estructura  $\alpha$ -helicoidal unida por enlaces hidrofóbicos, secciones flexibles en la cadena (5). Fig. 4

Se han identificado tres regiones funcionales mayores en la molécula (6):

- La región del heterodímero  $\alpha\beta$  que contiene sitios de contacto para ensamblarse en tetrámero.
- La región de unión con la ankyrina, que se encuentra en la cadena  $\beta$
- La región terminal de la espectrina que posee sitios de contacto para la actina y la P 4.1

Estudios recientes muestran que las dos subunidades están compuestas de múltiples segmentos conectados por regiones o sitios sensibles a proteasas. Por ejemplo, al digerir con tripsina encontramos nueve de tales dominios, cinco en la cadena  $\alpha$  designados de  $\alpha$ -I hasta  $\alpha$ -V y cuatro en la cadena  $\beta$ , designados de  $\beta$ -I hasta  $\beta$ -IV (13).

Yoshino y Cols. reportan que la alta afinidad de unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  puede verse afectada si existen modificaciones en estos dominios (14).

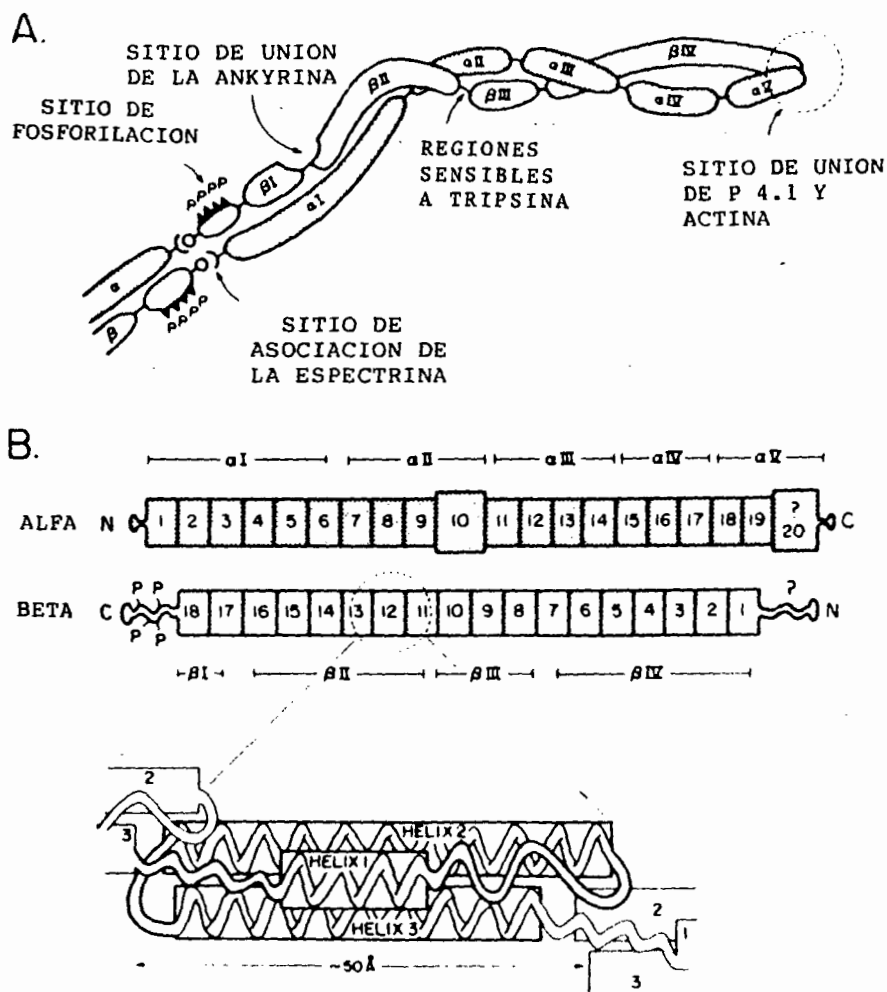


FIG. 4 MODELO DE ORGANIZACION EXTERNA (A), E INTERNA (B) DE LA MOLECULA DE LA ESPECTRINA CON SUS REGIONES FUNCIONALES.



Los dominios son nombrados del extremo proximal (cabeza) al extremo final de la molécula; éste último contiene los sitios de asociación para formar el dímero. El dominio  $\alpha$ -I amino terminal contiene uno de estos sitios. El sitio de unión a la ankyrina se encuentra entre el dominio  $\beta$ -I y  $\beta$ -II. Los sitios de unión para actina y P 4.1 están cerca del final de la molécula.

Las dos subunidades difieren significativamente una de otra.

Los dos péptidos tienen una composición similar de aminoácidos, pero con secuencias distintas.

Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  presentan 20 y 18 segmentos homólogos repetidos, formados por subunidades repetidas de 106 aminoácidos. En la cadena  $\alpha$  hay una variación cada 10 a 20 subunidades lo que nos da diferencias entre ambas cadenas. Además, la cadena  $\beta$  presenta su extremo carboxilo terminal fosforilado y posiblemente también el extremo amino terminal.

La secuencia de varias subunidades difiere considerablemente en las diversas escalas evolutivas, pero existen regiones altamente conservadas; cada subunidad contiene tres regiones helicoidales unidas por secuencias cortas no helicoidales (5). El modelo anterior, basado en la repetición de subunidades de 106 aminoácidos ha sido confirmado por datos de DNAC, y muestra la secuencia primaria completa de ambas, cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$  (15,16).

## B) Aspectos evolutivos de la espectrina

En los eritrocitos de la mayoría de los vertebrados y en algunos invertebrados se encuentra la espectrina, la cual aún cuando ha tenido cambios evolutivos, conserva su estructura general, lo que sugiere que alguna función de la espectrina es crítica para la sobrevivencia del eritrocito. Existe analogía estructural y funcional entre la espectrina del eritrocito y otras proteínas de estirpes celulares diferentes como la fodrina y la filamina (8.17).

## 5. ORGANIZACION DEL ESQUELETO DE MEMBRANA

En microfotografía electrónica por tinción negativa se observa una distribución hexagonal típica del esqueleto de membrana, con heptágonos y pentágonos ocasionales. Fig. 5

Los filamentos largos que forman los brazos de los hexágonos están constituidos por los tetrámeros de la espectrina junto con protofilamentos de actina; P 4.1; P 4.9; ankyrina y tropomiosina. Pequeñas áreas globulares representan a la ankyrina unida a la cabeza del tetrámero de la espectrina. Existen dos interacciones entre la bicapa de lípidos y el esqueleto de membrana. Por una parte, cerca del centro del tetrámero de la espectrina (aprox. a 20 nm del sitio de interacción del heterodímero) la ankyrina, conecta a la espectrina con la proteína transmembranal P 3 (18), mientras que en el extremo distal del tetrámero de espectrina, existe otra unión a través de la p 4.1 que se une a las Glucoforinas (proteínas integrales) y la P 3 (5). De ésta manera, el citoesqueleto queda anclado a la membrana.

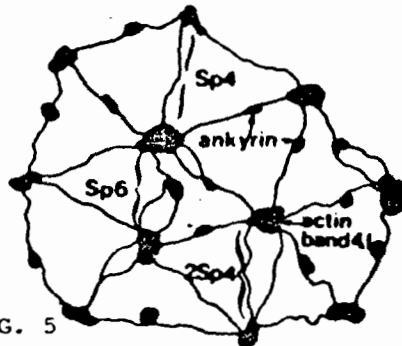


FIG. 5

MICROSCOPIA ELECTRONICA  
DEL ESQUELETO DE LA  
MEMBRANA DEL ERITROCITO.

## 6. BIOGENESIS DEL ESQUELETO DE MEMBRANA

La espectrina es sintetizada en las primeras etapas del desarrollo eritroide, y junto con ankyrina y P 4.1 que forman un esqueleto inestable. Posteriormente, se inicia la síntesis de la P 3 que se inserta en la membrana, dentro del citoesqueleto preformado, lo que confiere una estabilidad suficiente que le permite cumplir sus funciones.

La síntesis de espectrina, ankyrina y P 4.1 continúa en el estado de reticulocito. Sin embargo, la síntesis de espectrina cesa antes que la de las otras proteínas, lo que sugiere que estas últimas son importantes en la estabilidad definitiva del esqueleto de membrana (6).

## 7. FUNCIONES DEL ESQUELETO

El esqueleto de membrana es esencial para la forma y estabilidad del eritrocito. Las proteínas de membrana juegan un papel importante en este complejo: pueden restringir la movilidad de las proteínas integrales e influenciar además la distribución transmembranal de fosfolípidos y colesterol.

(7,8).

Entre las propiedades que le confieren el citoesqueleto al eritrocito se encuentran: su habilidad para deformarse al pasar en repetidas ocasiones por la microcirculación; la estabilidad que le confiere a la membrana, y la forma discoidal propia del eritrocito (19,20,21).

Por otra parte, si consideramos a la membrana del eritrocito entre sus funciones relevantes están el regular el flujo de electrolitos y metabolitos a la célula.

## 8. PATOFISIOLOGIA

Una deficiencia o disfunción de cualquiera de las proteínas del esqueleto de membrana, resulta en fragilidad celular, fragmentación y anemia hemolítica. Dependiendo del defecto molecular se observan distintas expresiones morfológicas que se traducen en patologías diversas.

Dentro de la lesión que sufre la membrana del eritrocito en la EH se observa que, a partir del defecto primario, se presenta un decremento en la densidad de la monocapa del esqueleto. Esto nos conduce a una desestabilización de la bicapa de lípidos y pérdida de los mismos en forma de microvesículas.

Fig. 6

Así, hay una pérdida de área de membrana, microesferocitosis, y decremento en la deformabilidad eritrocitaria, lo que conlleva a la fragilidad osmótica, hemólisis y retiro de estos eritrocitos de la circulación por el bazo (6).

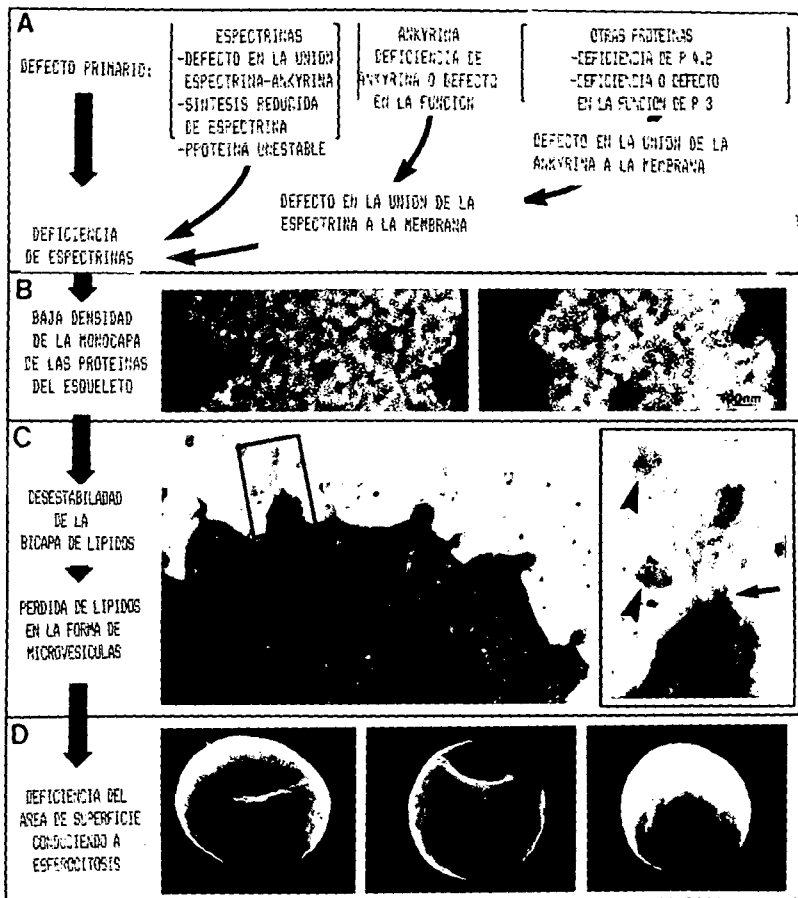


Fig. 6 PATOBILOGIA DE LA LESION DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO EN EH

9. DEFECTOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA QUE CONDUCE A ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.

| Defecto molecular  | Expresión clínica    | Herencia             | Prevalencia                  | Referencia |
|--|----------------------|----------------------|------------------------------|------------|
| <b>ESPECTRINA</b>  |                      |                      |                              |            |
| Def. moderada  | EH típica o moderada | Autosómica dominante | Común                        | 6          |
| Def. severa  | EH severa            | Autosómica recesiva  | Raro                         | 6,22       |
| Por defecto en unión espectrina/P 4.1 (espectrina $\beta$ inestable) | EH con acantocitosis | Autosómica dominante | Prob. el 10% del total de EH | 6          |
| <b>OTRAS PROTEINAS</b>   |                      |                      |                              |            |
| Def. moderada combinada Sp/Ank.                                      | EH moderada o típica | Autosómica dominante | Prob. común                  | 6,23,24    |
| Def. severa combinada Sp/Ank.  | EH severa o común    | Incierta             | Rara                         | 6,25       |
| Def. de P 4.2 (parcial o completa)                                   | EH no común          | Autosómica recesiva  | Rara                         | 6,11,12    |

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen reportes en la población occidental, en donde la prevalencia de la enfermedad es de 0.02% (1:5,000); sin embargo, considerando los datos de estado de portador asintomático para el gen de la EH, y la alta frecuencia de individuos con incremento en la fragilidad osmótica (aprox. del 1%) es posible que este dato esté subestimado (3).

En un estudio realizado por Hirono y Cols. (26) en 722 casos referidos con anemia se encontró a 182 con anemia hemolítica, 122 de tipo hereditaria y de ellos el 67.2% corresponden a eritroenzimopatías; 23.8% a EH; 4.9% a otras alteraciones en la membrana y 4.1% a hemoglobinopatías. La frecuencia elevada de eritroenzimopatías en esta población se debe a que es un laboratorio de referencia para estudios enzimáticos; no obstante destaca la alta incidencia de EH en esta casuística. La síntesis deficiente de espectrina es referida en varios trabajos como la causa principal de EH (5,6).

Los estudios electroforéticos de las proteínas de la membrana del eritrocito realizados en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (DSS/poliacrilamida), pueden ayudar a detectar defectos que conducen a EH. Este método permite la separación de las cadenas polipeptídicas de acuerdo a su peso molecular.

En México, es poca la información que se tiene sobre las causas y modo de herencia de la EH. Se sabe, que esta entidad es la causa más común de anemias hemolíticas hereditarias en el Hospital Infantil de México (27).

En una muestra de población del Nor-Occidente del país, se realizó un estudio de 10 propósitos, de los cuales 3 mostraron marcada deficiencia de espectrina, 3 deficiencia moderada y los 4 restantes fueron normales (28).

Considerando la escasa información que se tiene acerca de las causas, modo de herencia e incidencia de la EH en nuestra población se replantea la necesidad de ampliar las investigaciones en esta área.

En el presente trabajo se pretende confirmar que la deficiencia de espectrina es la causa más frecuente de la EH en nuestra población; analizar su modo de herencia mediante estudios familiares y buscar por medio de los patrones electroforéticos de las muestras otras causas de EH, utilizando el método de elución con piridina para la cuantificación de espectrinas y análisis individual de las bandas que corresponden a las diferentes proteínas de membrana.

**H I P O T E S I S**

**H I P O T E S I S**

**EN PACIENTES MEXICANOS DEL OCCIDENTE DEL PAIS.  
LA DEFICIENCIA DE ESPECTRINA ES LA CAUSA MAS  
COMUN DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.**

**O B J E T I V O S**

### O B J E T I V O S

1. DETERMINAR EL PAPEL QUE JUEGA LA DEFICIENCIA DE ESPECTRINA COMO CAUSA DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA EN EL NOROCCIDENTE DE MEXICO
2. CONOCER EL MODO DE HERENCIA DE LA EH CUANDO ESTA TENGA UNA CAUSA CONOCIDA.
3. COMPARAR LOS PATRONES ELECTROFORETICOS DE NUESTROS PACIENTES, CON LOS REPORTADOS EN OTROS TRABAJOS.
4. ESTANDARIZAR UN METODO PARA ESTUDIAR LOS NIVELES DE ESPECTRINA EN RELACION A LA BANDA 3.

## MATERIAL Y METODOS

## VI. MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 48 pacientes derivados de la consulta de hematología del Centro Médico de Occidente, IMSS; los cuales para su estudio se clasificaron en los siguientes grupos: Pacientes con diagnóstico de EH (EH); familiares de pacientes con EH (FEH); Pacientes con probable EH (PEH); familiares de pacientes con probable EH (FPEH). Como grupo control se tomaron muestras de individuos sanos obtenidas del personal de laboratorio, de alumnos de la Escuela Veterinaria y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara. En todos los casos la sangre fué obtenida con heparina.

Las membranas del eritrocito fueron obtenidas acorde al método de Dodge (29) con la excepción de que 0.1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (FFMS) fué añadido al buffer de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5mM, p.H 8.0). Previamente, los eritrocitos se lavaron tres veces con buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5mM + NaCl 150 mM p.H 8.0. Las membranas se conservaron en congelación resuspendidas en buffer de Lisis.

Antes de su aplicación al gel, se descongelan y se diluyen V/V en buffer de muestra constituido por 4 ml de agua; 1 ml de Tris 0.5M p.H 6.8; 0.8 ml de glicerol; 1.6 ml de DSS al 10 %; 0.4 ml de beta-mercaptoetanol y 0.2 ml de rojo de fenol al 0.5%. Se pasan por baño maría por minuto y medio, se dejan enfriar y se aplican 100  $\mu$ l de la muestra en la parte superior del gel.



La electroforesis se realizó en base al método de Laemli (30) con ciertas modificaciones, en un sistema electroforético vertical en geles cilíndricos de poliacrilamida/DSS con tres gradientes de acuerdo al esquema de preparación de geles.

ESQUEMA DE PREPARACION DE GELES

| REACTIVO                     | GRADIENTE   |             |             |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                              | 7%          | 10%         | 13%         |
| DSS 10%                      | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l |
| TRIS 1.5 M p.H 8.0           | 5 ml        | 5 ml        | 5 ml        |
| ACRIL/BISACRIL<br>(30%-1.5%) | 4.7 ml      | 6.7 ml      | 8.7 ml      |
| H <sub>2</sub> O DESTILADA   | 10 ml       | 8 ml        | 6 ml        |
| TEMED                        | 50 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l  |
| PERSULFATO 10%               | 50 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l  |

El sentido del corrimiento fué anódico a 130 V y 5 mA por gel, durante 6 hrs. aprox. Se utilizó como buffer de corrimiento una mezcla de Tris Base 25 mM, glycina 190 mM y DSS al 0.1% a p.H 8.3. Una vez terminado el corrimiento, los geles fueron extraídos por presión del tubo, teñidos con azul de Comassie al 0.5% en Ac. Acético/metanol (7-30%) y decolorados con Ac. Acético/metanol (7-30%). Después de la decoloración, las bandas 1, 2 y 3 se cortan, se colocan en tubos diferentes y se maceran, agregando una solución de piridina al 25% que eluye la proteína. De este concentrado, se mide su absorbancia a 600 nm. (31)

### FORMAS DE EVALUACION

La intensidad del color (incremento en absorbancia) es proporcional a la concentración de proteína. La sumatoria de las absorbancias de Banda 1 + 2 y 3 es del 100%. Sobre esta base se calcula el % correspondiente a las absorbancias de cada uno de los tubos.

$$\frac{\text{BANDA 1 + 2}}{3} = 1$$

## RESULTADOS

## VII. RESULTADOS

Se analizó la relación de bandas 1 + 2 de espectrinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y la banda 3 (P 3) y el patrón electroforético en geles DSS/Poliacrilamida, en las membranas aisladas de 4 grupos de pacientes: EH, FEH, PEH, FPEH y un grupo control.

En la FIG. 7 se muestra el patrón de bandeo típico obtenido en tres pacientes (1, 2 y 3) y un control (C), como puede apreciarse es muy similar en todos los casos; éste patrón pudo reproducirse en por lo menos tres experimentos para cada individuo y su análisis visual no mostró diferencias significativas con el referido por otros autores (9).

La Tabla I presenta los valores obtenidos en los cinco grupos estudiados para las bandas 1 + 2, banda 3 y Relación 1+2 /3; sólo el grupo EH muestra diferencias significativas con el grupo control para los tres parámetros analizados ( $p < 0.02$ ,  $p < 0.02$  y  $p < 0.05$  respectivamente).

En la FIG. 8 se representan los valores obtenidos para la banda 1 + 2 en cada uno de los individuos, indicando los valores promedio. La FIG. 9 representa los valores de la relación de las bandas 1+2 /3 de todos los grupos. Si incluimos el 97% de los individuos normales ( $\pm 2$  s del valor promedio) para los valores de espectrinas, el rango obtenido es de 46.1 a 61.4. Como puede verse en la FIG. 8 dos pacientes del grupo EH (25%) son deficientes (27.63% y 42.62%), mientras que un familiar del grupo FEH (mamá) muestra también una deficiencia marcada (35.7%), y otro (papá) muestra una deficiencia "moderada" ya que se encuentra en el límite inferior (46.6%).

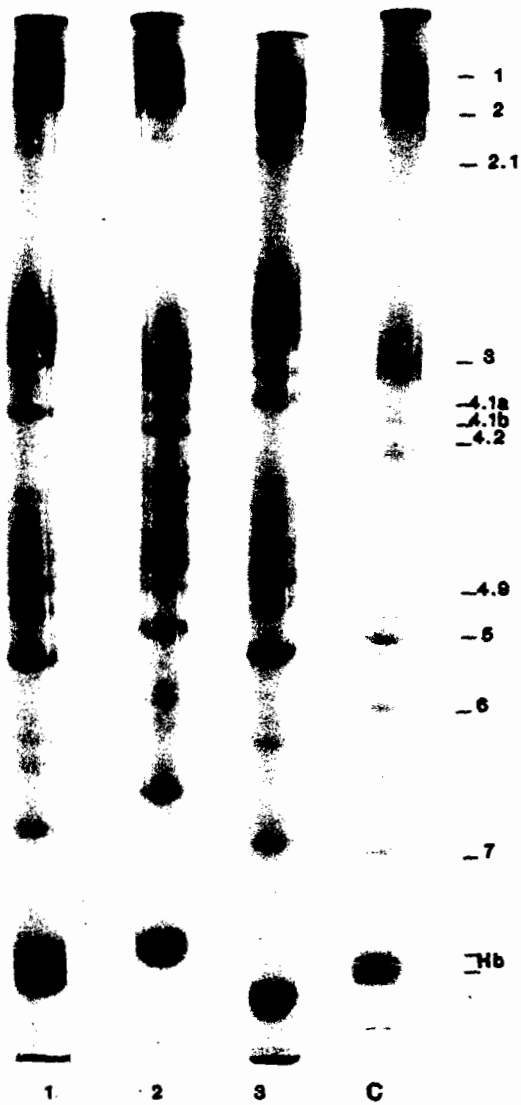


FIG. 7 PATRON DE BANDEO TIPICO OBSERVADO DE TRES PACIENTES Y UN CONTROL

TABLA I. Resultados de los valores obtenidos para las bandas 1 + 2, 3 y relación 1 + 2/ 3

| BANDAS              |           | EH    | FEH   | PEH   | FPEH  | CONTROL |
|---------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 1 + 2               | $\bar{X}$ | 47.86 | 52.41 | 53.92 | 54.88 | 53.79   |
|                     | s         | 9.06  | 7.37  | 3.71  | 4.60  | 3.82    |
|                     | n         | 8     | 10    | 15    | 15    | 27      |
| 3                   | $\bar{X}$ | 51.97 | 47.54 | 46.42 | 45.25 | 46.48   |
|                     | s         | 9.11  | 7.36  | 3.82  | 4.55  | 3.71    |
|                     | n         | 8     | 10    | 15    | 15    | 27      |
| Relación<br>1+2 / 3 | $\bar{X}$ | 0.98  | 1.17  | 1.20  | 1.25  | 1.19    |
|                     | s         | 0.29  | 0.30  | 0.18  | 0.23  | 0.19    |
|                     | n         | 8     | 10    | 15    | 15    | 27      |

FIGURA 8. BANDAS 1 + 2 DE ESPECTRINAS

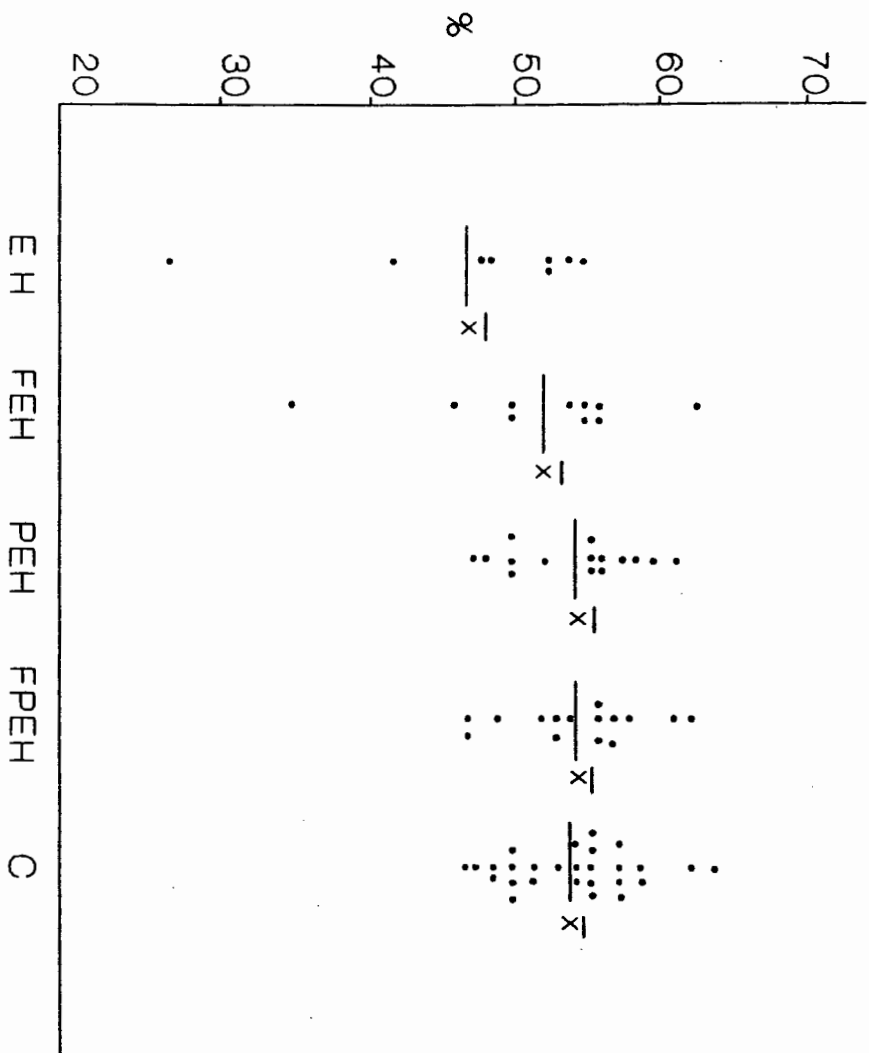
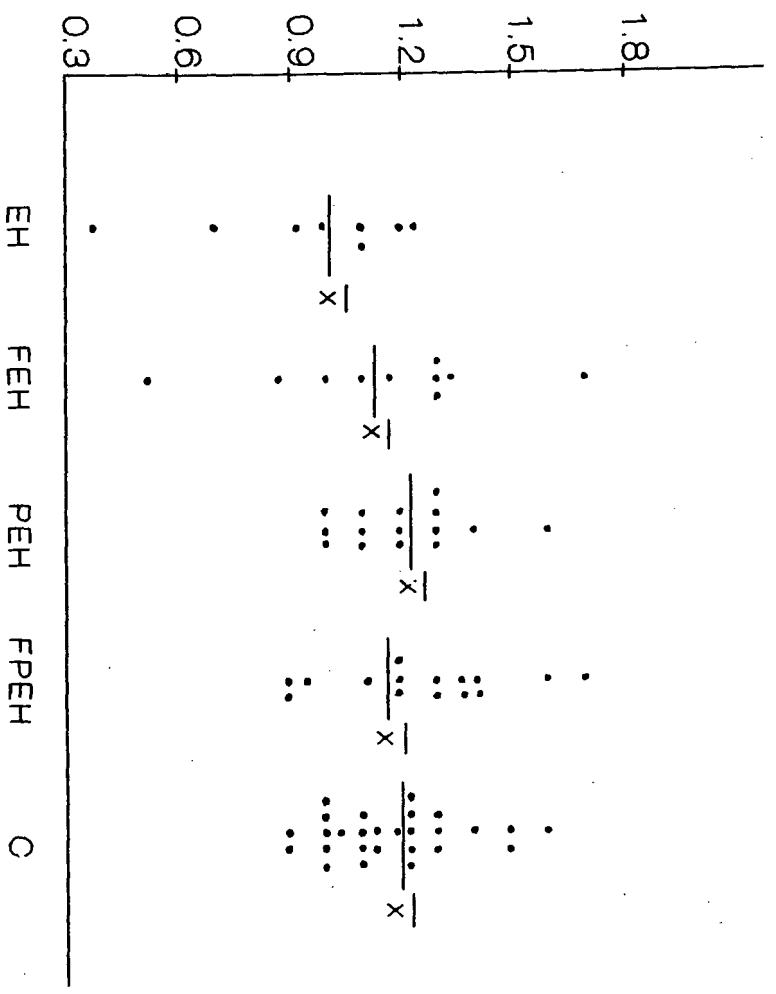


FIGURA 9. RELACION DE BANDAS 1 + 2 / 3





**D I S C U S S I O N**

## VIII. DISCUSION

Las espectrinas 1 y 2 y la banda 3 en condiciones normales han mostrado una relación de 1 o semejante (6), en el presente trabajo se realizó una estimación semicuantitativa de estas tres proteínas, con el fin de investigar la deficiencia de espectrina en la membrana eritrocitaria de pacientes con EH o con sospecha de EH (PEH). Se utilizó el método de elución con piridina de las proteínas teñidas con azul de comassie en geles de poliacrilamida; en nuestras manos la piridina eluyó completamente el colorante y prueba de ello es que los valores obtenidos en el grupo control mostraron poca dispersión.

Este método permitió distinguir en el grupo EH dos pacientes con deficiencia de espectrina y dos familiares ( grupo FEH), mamá de un afectado y papá de otro, lo que confirma un patrón de herencia autosómico dominante. En el grupo PEH ningún paciente mostró deficiencia de espectrina. Si analizamos como un solo grupo EH y PEH (23 propositi), podemos pensar que la deficiencia de espectrina es poco común en nuestra población, sin embargo, cuando la EH está claramente definida, existe una alta probabilidad de encontrarla.

Es importante señalar que existen métodos más finos (p. ej. radioinmunoanálisis) para cuantificar espectrinas (2), por lo que podríamos estar subestimando a los pacientes que presentarían sólo deficiencia moderada. El método empleado en el presente trabajo no permite identificar alteraciones cualitativas de las espectrinas o de otras proteínas ( p. ej. diferencias en movilidad electroforética, defectos de

asociación etc.) que repercutieran en su función alterando el citoesqueleto.

En la literatura se han descrito alteraciones en otras proteínas de la membrana como causa de EH (ver punto número 9); el análisis visual de las bandas no reveló anormalidades en P 1, P 2, P 3, P 4.1, P 4.2, P 5, P 6 y P 7 en ninguno de los grupos estudiados.

Finalmente, aunque se ha creído que el defecto primario de la EH se encuentra en la membrana, el conocimiento del defecto molecular que afecta a la célula no se ha definido aún satisfactoriamente (12).

C O N C L U S I O N E S

## IX. CONCLUSIONES

1. El método es reproducible y permite la identificación de deficiencia de espectrinas.
2. El método permite el análisis del patrón de bandeo.
3. La deficiencia de espectrina se encontró en 2 de 8 pacientes con EH y 2 de 10 familiares (FEH) analizados.
4. El patrón de herencia en los casos encontrados con deficiencia de espectrina mostró ser autosómico dominante.
5. No se encontró deficiencia de espectrina en los grupos PEH y FPEH.
6. El hecho de que 6 de 8 pacientes con EH no presentaron deficiencia de espectrina sugiere que este defecto no es la causa más frecuente de EH en nuestra población.

B I B L I O G R A F I A

## B I B L I O G R A F I A

1. Boivin P. Congenital hemolytic anemia due to abnormalities of erythrocyte membrane. *Sangre* 1988; 49-56
2. Agree P, Casella JF, Zinkham WH, Miller C. Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature* 1985;314:380-383
3. Palek J. Hereditary Spherocytosis. In *Hematology*. Williams WJ, Beutler E, et al. (eds.) Chap.5;558-568 McGraw Hill 4th. edition USA 1990
4. Eber S.W, Armbrust R. and Schroter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: Relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J. of Pediatrics* 1990;117:409-415
5. Lux S.E; Becker P. Disorders of the red cell membrane skeleton. In *The Metabolic Basis of inherited disease* Scriver CH, et al (eds.) Chap.95;2367-2386 McGraw Hill Sixth edition USA 1989
6. Palek J. and Lambert S. Genetics of the Red Cell Membrane Skeleton. *Sem. Hematol.* 1990;27:290-332
7. Shohet SB, and Beutler E. The red cell membrane. In *Hematology*. Williams WJ, Beutler E, et al. (eds.) Chap.36;368-377 McGraw Hill 4th. edition USA 1990
8. Cohen CM. The Molecular Organization of the Red cell Membrane Skeleton. *Sem Hematol.* 1983;20:141-158
9. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptide of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochemistry* 1971;10:2606-2617
10. Low P.S, Willardson B.M, Mohandas N, Rossi M, Shoet S. Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability. *Blood.* 1991;77:1581-1586
11. Rybicki A.C, Heath R, Wolf J.F, Lubin B, Schwartz R.S. Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a coombs negative hemolytic anemia. *J. Clin. Invest.* 1988;81:893-900
12. Ideguchi H, Junji N, Nawata H. A genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis. *B. J. of Haematology.* 1990; 74:347-353

13. Knowles W, Marchesi S, and Marchesi V. Spectrin: Structure, function, and abnormalities. *Sem. Hematol* 1983;20:159-174
14. Yoshino H, Minari O. Characterization of the lateral interaction between human erythrocyte spectrin subunits. *J. Biochem* 1991;110:553-558
15. Sahr K.E, Laurila P, Leszek K. The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid  $\alpha$ -spectrin. *The Journal of Biol. Chem.* 1990;265:4434-4443
16. Winkelmann J.C, Chang J, Tse W.T. Full-length sequence of the cDNA for Human Erythroid  $\beta$ -spectrin. *The Journal of Biol. Chem.* 1990; 265:11827-11832
17. Bennett V, Lambert S. The spectrin skeleton: from red cells to brain. *J. Clin. Inves.* 1991;87:1483-1489
18. Davis L.H, Bennett V. Mapping the binding sites of human erythrocyte ankyrin for the anion exchanger and spectrin. *J. of Biol. Chem.* 1990;265:10589-10596
19. Berga L, Aguilar JL, Reverter JC. Deformabilidad eritrocitaria y anemias hemolíticas. *Sangre.* 1988; 97-106
20. Mohandas N, Chasis JA, Shohet S. The Influence of Membrane Skeleton on Red Cell deformability, Membrane material properties and Shape. *Sem.Hematol.* 1983;20:225-242
21. Sheetz MP. Membrane Skeletal Dynamics: Role in modulation of red cell deformability, movility of transmembrane proteins and shape. *Sem. Hematol.*1983;20:175-183
22. Lecomte MC, Fao C, Gautero H, Boivin P. Severe recessive poikilocytic anaemia with a new spectrin  $\alpha$  chain variant. *B. J. of Haematol.* 1990;74:497-507
23. Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Camaschella C. Ankyrin deficiency in dominant hereditary spherocytosis: report of three cases. *B. J. of Haematol.* 1991;78:551-554
24. Costa F, Agree P, Watkins P. Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane-skeleton protein ankyrin. *N.E Journal of medicine* 1990;323:1046-1050,
25. Coetzer T.L, Lawler J, Palek J. Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary



26. Hirono A, Forman L and Beutler E. Enzymatic Diagnosis in non-spherocytic hemolytic Anemia. *Medicine* 1988; 67:110-11
27. Mejía A. Comunicación Personal
28. Alvarez C. Estudio Electroforético y espectrofotométrico de las proteínas de la membrana del eritrocito en esferocitosis hereditaria. Tesis de maestría en Genética Humana. Escuela de Graduados. Universidad de Guadalajara. 1989
29. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of haemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys* 1983; 100:119
30. Laemli IK. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
31. Fenner C, Traut R, Mason D, and Wikman-Coffelt J. Quantification of Coomassie Blue stained proteins in polyacrilamide gels based on analyses of eluted dye. *Anal. Biochem.* 1975;63:595-602

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica II,  
de la División de Genética, Unidad de Investigación Biomédica  
de Occidente, IMSS. Bajo la Dirección de la M. en C.  
Bertha Ibarra Cortés.